

UCH - FC  
Biotecnología  
P 153



FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE

**EFFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA EXPRESION DE REELINA Y LA  
ACTIVIDAD DE CDK5, Y SUS IMPLICANCIAS EN LA CONDUCTA ANSIOSA Y  
CONSOLIDACION DE LA MEMORIA**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**ISMAEL JOSE PALACIOS GARCIA**

Director de Seminario de Título: Dr. Christian González Billault

Co-Directora de Seminario de Título: Dr. Francisco Aboitiz Domínguez

Agosto, 2013

Santiago – Chile



### INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Sr. Ismael José Palacios García

#### **“EFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA EXPRESION DE REELINA Y LA ACTIVIDAD DE CDK5, Y SUS IMPLICANCIAS EN LA CONDUCTA ANSIOSA Y LA CONSOLIDACION DE LA MEMORIA”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología molecular.

Dr. Christian González Billault

Director Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul del Dr. Christian González Billault.

Dr. Francisco Aboitiz Domínguez

Co-Director Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul del Dr. Francisco Aboitiz Domínguez.  
Sello circular de la Facultad de Ciencias U. de Chile, con el texto "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL" y "U. DE CHILE" rodeado por una línea con estrellas.

Comisión de Evaluación

Dra. Magdalena Sanhueza Tohá

Presidente Comisión

Firma manuscrita en tinta azul de la Dra. Magdalena Sanhueza Tohá.

Dr. Juan Carlos Letelier Parga

Evaluador

Firma manuscrita en tinta azul del Dr. Juan Carlos Letelier Parga.



***"Creating a world in which healthy qualities of mind are investigated and valued".***

## BIOGRAFÍA

Eran las 12.00 AM, cuando al parecer ya estaba preparado para salir al mundo, fueron tan solo 15 minutos los que tarde en salir del lugar que había sido mi hogar durante los 9 meses de mi desarrollo. Así fue como en la madrugada del domingo 8 de noviembre hace 25 años, comencé esta experiencia de la vida. Mis primeros años, los recuerdo en amplios campos de la periferia cordillerana de Santiago, jugando con caballos, perros y plantas,



era callado, pensativo e imaginativo. Descubrir cosas al parecer era lo que mas me entretenía, la incertidumbre de no saber algo y luego saberlo me gustaba mucho. Extrañamente mis primera experiencias académicas intelectuales no fueron de lo mas agradables, el hecho de querer saberlo todo, me convertía en una persona bastante miedosa, razón por la cual mi primer día de colegio fueron solo lagrimas, sin embargo, al pasar del tiempo fui descubriendo mis amplias capacidades sociales y me di cuenta que aprender era algo que desde el comienzo de mi razón fue fundamental para mi. Ya a mediados de la básica, incorpore un factor fundamental de mi vida, el deporte y en particular, el futbol, el cual llena y me aporta la claridad y vitalidad que hoy por hoy me caracterizan. Fue en la media cuando me di cuenta que la biología era lo que me apasionaba, entender como funcionaba la vida era lo mío, sin embargo, con el paso del tiempo y gracias a la mezcla de interrogantes metafísicas, espirituales y biológicas, descubrí, que el cerebro, la mente y la relación del cuerpo con estas entidades, iban a ser el tema al cual le dedicaría mi vida y pasión. En conjunto y gracias a mis experiencias de vida, mi entorno y mi realidad, podría decir que me considero una persona sumamente feliz, lleno de ideas y sueños, en donde el equilibrio es mi

principal referente a seguir, mantener activo, mi lado intelectual, espiritual, social, deportivo-físico, artístico-musical se que me llevaran a lo mas alto de la plenitud.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecerle a la existencia por brindarme una vida, en la cual la sanidad física y mental prima para mí y mis cercanos. Además quiero agradecerle por darme la oportunidad de estudiar y desarrollarme intelectual e íntegramente en todos los aspectos de la vida.

Quiero agradecerles a mis padres, que de manera ecuánime contribuyeron a mi formación y desarrollo, agradecer a mi madre por su amor infinito e incondicional, a mi padre por entregarme su espíritu y sabiduría. A ambos por acompañarme, protegerme y amarme en cada momento de mi vida.

A mi hermano Juanpa, por ser cómplice en todas las dificultades que la vida nos ha puesto, y por la enorme admiración que en mi genera. A mi hermanita MaRy, por ser tan especial y espontanea, por recordarme día a día que la vida es para disfrutarla. A mi hermanito Pelo, por su inocencia, paz y enorme curiosidad, por recordarme que cada día se pueden aprender cosas nuevas. A la Pame, por su constante apoyo, dedicación, esfuerzo y comprensión. Tu silenciosa presencia nunca dejó de ser importante.

A mis hermanos de la vida, mis amigos, mis compañeros de experiencias, viajes, fiestas, infinitas charlas, noches de cantos y días de cerro. Les agradezco por siempre estar ahí, entenderme, respetarme y preocuparse, por ser tan especiales y unicos, por saber que tengo muchos yo en este planeta. Ninguno se me olvidara (el orden no implica nivel de importancia), Manu, SebaHee, Neco, Vicho, Tincho, Yoni, Benji, Elio, Bear, Litro, Gordein, Pablein, Spit, More, Twix, Huaso, Peta, Rai, Toumas, Rafa. Lo mismo va para las amiguitas que con su temura y amor han llenado mi vida de colores, matices y

aprendizajes :) Tani, Chichi, Maquita, Pelut, Cristi, Jaci, Sofi, Alice, Cotito, Cami, Javi, Pau, Feñi, Frani, Angelin.

A la música, por acompañar mí día a día, lograr hacerme sonreír sin motivo, por emocionar todo mi cuerpo. Gracias Pink Floyd, Yes y especialmente a Juan Pez, por hacerme vibrar, respirar, nadar, sonreír y vivir mas pleno que nunca.

Mis primeros y mejores años universitarios en bachillerato, junto a grandes personas que contribuyeron de gran manera en mi desarrollo intelectual, Pipin, Dieguifero, Momo, Chama, Pauli, Carli, Ire, Nati, Vale, Dani, Pípe y Hemi

Compañeros Blotec, tanto tiempo juntos, tardes y noches de estudio, clases eternas, aprendizaje y crecimiento. Bea, Clío, Mati, Talo, Pablo, Rolo, Arito. A mis amigos Bachitec, los cuales siempre fuimos algo distintos, más relajados y felices, Pampa, Vale, Nelo y Hemi. Además quisiera agradecer a todos los profesores, que con cada una de sus clases aportaron con granito de arena para mi formación.

A Cathy, por ser mi compañera de vida durante gran parte de la carrera, y por seguir siendo tan importante en mi vida, por todo lo que me cuidó, enseñó y entregó. Porque a pesar de todo, siempre estas ahí, y lo seguirás estando. Gracias por mostrarme tus sueños y recibir los míos. LO LOGRAREMOS.

Al futbol, mi gran hobby y pasión, por liberar mi mente y mantenerme saludable y activo, al equipo de Ciencias, especialmente al lucho, por enseñarme lo que es el compromiso y el amor desinteresado, a todo el equipo especialmente a Chilo, Marito, Chico, Peru y Hemi.

Agradecer a los laboratorios de biología del conocer, al Dr. Letelier y a Elisa, por instruirme por primera vez en el mundo de la Neurociencia. Al laboratorio de

Neurociencias, a Ariel, al Dr. Montiel y a la Dra. Díaz, por ayudarme a sacar adelante este proyecto, aconsejarme y enseñarme de manera real y concreta como funciona la ciencia. Al laboratorio de dinámica celular y neuronal, a Daniel B, Erick, Daniel H, David, Dr. Utreras, Pablo, Monse y Seba, por su apoyo, buena onda, consejo y enseñanza en momentos de duda o crisis. A la Cristi, por su cariño y enseñanzas. Especialmente a Mauro y Felipe, por su amistad, entendimiento y consejos, por lograr hacer de la rutina laboral algo más entretenida y diferente.

Al Kiko (Dr. Aboitiz), por su escuela, por confiar en mis capacidades y entregarme un proyecto tan interesante. Por darme la libertad de tomar mis propias decisiones, y darme un consejo preciso en los momentos que me estaba equivocando. A Christian (Dr.Gonzalez), por abrirme las puertas de su laboratorio, por creer en mis propuestas, aconsejarme y brindarme la posibilidad de indagar en múltiples proyectos y técnicas. Por confiar en mis capacidades y hacerme parte de publicaciones científicas. A ambos por guiar mi seminario de título y creer en mis capacidades como persona y científico.

Finalmente quiero volver a agradecerle a la vida, y al camino espiritual que me mostró, el cual me permite sonreír cada día, con una intensión positiva, focalizada y amorosa, que me permite amar a todos los que me rodean y por sobre todo al sueño científico espiritual que ya he comenzado a cumplir. GRACIAS.



## INDICE

BIOGRAFÍA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE ABREVIACIONES.....	xii
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCION.....	3
3.1. Estrés y sus implicancias en el cerebro.....	4
3.2. Efectos del estrés en el desarrollo.....	8
3.3. Aspectos generales de Reelina.....	12
3.4. Reelina en el neurodesarrollo.....	14
3.5. Un poco de Cdk5.....	18
3.6. Reelina en el cerebro adulto.....	20
3.7. Reelina, CDK5 y su relación con enfermedades psiquiátricas.....	21
4. HIPOTESIS.....	23
5. OBJETIVO GENERAL.....	23
6. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
7. METODOLOGIA.....	24
7.1. Animales y protocolo de estrés por inmovilización.....	24
7.2. Procesamiento de los animales.....	25
7.2.1. Perfusión y preparación de las secciones para histología.....	25
7.2.2. Cultivo celular.....	26
7.3. Histología.....	27

7.3.1. Inmunohistoquímica.....	27
7.3.2. Análisis de inmunohistoquímica mediante el método del disector.....	27
7.3.3. Tinción de Nissl.....	28
7.4. Extracción proteica, electroforesis y Western Blot desde tejido y cultivo celular ..	29
7.5. Ensayo de actividad quinasa.....	30
7.6. Test conductuales.....	31
7.6.1. Actividad motora.....	31
7.6.2. Laberinto en cruz elevado.....	31
7.6.3. Test de evitación pasiva.....	32
7.6.4. Test de Morris.....	34
7.7. Recuperación de Reelina exógena a partir de células HEK y tratamiento en cultivo celular.....	35
7.8. Fosforilación de Tau en condiciones de sobreactividad e inhibición de Cdk5.....	36
7.9. Análisis de datos.....	36
8. RESULTADOS.....	37
8.1. Confirmación del estrés en la madre luego del tratamiento de inmovilización.....	37
8.2. Efectos del estrés prenatal en la morfología de la corteza.....	38
8.3. Inmunoreactividad de Reelina en la capa I de la corteza en individuos estresados prenatalmente.....	39
8.4. Niveles de Reelina y mDab1 en extractos corticales de individuos estresados prenatalmente.....	41
8.5. Tratamiento de cultivo neuronal con Reelina purificada durante 1 y 6 horas.....	43
8.6. Efectos del estrés prenatal sobre la actividad de Cdk5.....	44
8.7. Prevalencia de los efectos del EP tras 5 días <i>in vitro</i> .....	48
8.8. Actividad motora y comportamiento ansioso en individuos EP.....	50

8.9. Respuesta de los individuos EP frente a pruebas de memoria y aprendizaje asociado a eventos de condicionamiento adverso.....	52
9. DISCUSION.....	54
9.1. Efectos del estrés prenatal en la expresión de Reelina, mDab1 y en la actividad de Cdk5 <i>in vivo</i> .....	56
9.2. Efectos del estrés prenatal en la expresión de Reelina, mDab1 y en la actividad de Cdk5 <i>in vitro</i> .....	61
9.3. Impacto del EP en la actividad motora, memoria y aprendizaje.....	63
10. CONCLUSIÓN, MODELO PROPUESTO Y PROYECCIONES.....	67
11. REFERENCIAS.....	71

#### INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA).	6
<b>Figura 2</b>	Efectos del estrés prenatal en el feto.	9
<b>Figura 3</b>	Reelina y sus fragmentos proteolíticos.	14
<b>Figura 4</b>	Laminación cortical de un individuo silvestre y Reeler.	16
<b>Figura 5</b>	Funciones de Reelina en desarrollo y cerebro adulto.	21
<b>Figura 6</b>	Mapa de las zonas corticales analizadas.	28
<b>Figura 7</b>	Imágenes representativas de: (A) Caja utilizada para medir la actividad motora total y locomoción. (B) Laberinto de cruz elevado	32
<b>Figura 8</b>	Esquema del test de evitación pasiva.	34
<b>Figura 9</b>	Esquema simplificado de la actuación esperada tras el entrenamiento en el laberinto de Morris.	35
<b>Figura 10</b>	Adquisición del estrés por parte de la madre	38

<b>Figura 11</b>	<b>Análisis histológico de la morfología cortical.</b>	<b>39</b>
<b>Figura 12</b>	<b>Microfotografía de un tejido Control y EP tras inmunohistoquímica contra Reelina.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 13</b>	<b>Cuantificación de la reactividad de Reelina en la capa 1 de individuos Control y EP.</b>	<b>41</b>
<b>Figura 14</b>	<b>Efectos del EP en la expresión de Reelina y mDab1 en extractos de corteza.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 15</b>	<b>Efectos del tratamiento con Reelina en la expresión de mDab1.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 16</b>	<b>Efectos del EP en la expresión de Cdk5 y p35 en extractos de corteza.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 17</b>	<b>Fosforilación de Tau dependiente de Cdk5.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 18</b>	<b>Efectos del EP en la fosforilación de Tau</b>	<b>47</b>
<b>Figura 19</b>	<b>Ensayo de actividad quinasa.</b>	<b>47</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Prevalencia de los efectos producidos por el EP en Reelina y mDab1 luego de 5 DIV.</b>	<b>49</b>
<b>Figura 21</b>	<b>Prevalencia de los efectos producidos por el EP en la actividad de Cdk5 luego de 5 DIV.</b>	<b>50</b>
<b>Figura 22</b>	<b>Respuesta motora y comportamientos ansiosos en los individuos EP.</b>	<b>52</b>
<b>Figura 23</b>	<b>Consolidación de la memoria y memoria visuo-espacial de individuos adultos EP</b>	<b>54</b>
<b>Figura 24</b>	<b>Modelo propuesto investigación realizada.</b>	<b>70</b>

## INDICE DE ABREVIACIONES

<b>ACTH</b>	Hormona corticotrofina
<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>ALS</b>	Esclerosis lateral amiotrófica
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>CDK</b>	Quinasas pequeñas dependientes de ciclina
<b>CONICYT</b>	Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de corticotrofina
<b>D</b>	Dorsal
<b>D-L</b>	Dorso-lateral
<b>D-M</b>	Dorso-medial
<b>E(#)</b>	Día gestacional (#)
<b>EP</b>	Estrés prenatal
<b>GC</b>	Glucocorticoides
<b>HPA</b>	Hipotalámico-hipofisario-adrenal
<b>mDab1</b>	Proteína adaptadora disabled 1
<b>mRNA</b>	Acido ribonucleico mensajero
<b>NT-3</b>	Neurotrofina 3
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PC</b>	Capa cortical
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PP</b>	Preplaca
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>ZM</b>	Zona marginal

## 1. RESUMEN

El estrés prenatal es un factor de riesgo en el desarrollo de condiciones neuropsiquiátricas como la depresión y la esquizofrenia. Más aún, estos efectos pueden perdurar hasta la adultez causando predisposición a adquirir trastornos de tipo emocional y cognitivo. La proteína extracelular reelina y componentes de su vía de señalización como Cdk5 juegan un rol fundamental en la correcta laminación y maduración sináptica, estos se expresan durante el desarrollo cortical, desregulaciones a este nivel han sido asociadas con condiciones mal adaptativas. En este estudio realizamos un protocolo de estrés prenatal (EP) en ratas preñadas durante los últimos 10 días del embarazo. En un grupo, los fetos fueron sacrificados y analizados por inmunohistoquímica *in vivo* y por Western blot *in vivo* e *in vitro*. Un segundo grupo de animales fueron mantenidos hasta la adultez (P60) momento en el cual se le realizaron pruebas conductuales, las cuales incluyen actividad locomotora, el laberinto en cruz elevado, el test de "Evitación pasiva" y el test "Laberinto de Morris". Las neuronas positivas para Reelina en la capa cortical I conocidas como neuronas de Cajal-Retzius, disminuyeron en las cortezas frontal, parietal y occipital de los individuos EP, el mismo resultado fue apreciado mediante Western Blot *in vivo* e *in vitro*, por otro lado, se apreció una disminución significativa en la actividad de Cdk5 mientras que la citoarquitectura cortical de los individuos EP se mantuvo invariante. Los individuos EP adultos expusieron un aumento excesivo en la actividad locomotora y conducta ansiosa, y dificultades en la consolidación de la memoria luego de una situación aversiva. Estos resultados manifiestan los efectos del EP en la población de neuronas Cajal-Retzius, y la resistencia de estos efectos en el comportamiento adulto, promoviendo el EP como un modelo prometedor en el estudio de las enfermedades neuropsiquiátricas.

## 2. ABSTRACT

Prenatal stress is a risk factor to develop neuropsychiatric conditions like depression, bipolar disorders and schizophrenia. Moreover, the effects of stress during pregnancy can endure from postnatal life until adulthood, causing predisposition to cognitive and emotional disturbances. The extracellular protein reelin and components of its signaling pathway like Cdk5 play critical roles on cortical lamination and synaptic maturation, it is expressed during cortical development and its dysregulation has been associated to maladaptive conditions. In the present study, we performed a protocol of prenatal restraint stress (PNS) in pregnant rats during the last 10 days of pregnancy. In one group, fetuses were sacrificed and analyzed by immunohistochemistry *in vivo*, and Western Blot *in vivo* and *in vitro*. A second group of animals was maintained until adulthood for behavioral testing at P60 including locomotor activity, rearing, elevated plus maze, passive avoidance conditioning and Morris water maze. Immunoreactive reelin positive neurons in cortical layer I, known as Cajal-Retzius neurons decrease in frontal, parietal and occipital cortices in PNS E20 fetuses, we obtain the same result analyzing by Western blot, *in vivo* and *in vitro*. We appreciate clear changes on Cdk5 activity. The same PNS adult rats displayed excessive spontaneous locomotor activity, high anxiety levels measured with the elevated plus-maze test and difficulties in memory consolidation after an aversive situation. No significant visuo-spatial memory impairment was detected. These results highlight the effects of prenatal stress on Cajal-Retzius population, and the endurance of behavioral consequences in the adult, promoting PNS as a promising model for the study of neuropsychiatric diseases.

### 3. INTRODUCCION.

Las enfermedades mentales son aquellas que involucran alteraciones en los procesos cognitivos y afectivos del individuo, y se originan principalmente por desregulaciones en el funcionamiento normal del cerebro. Sin embargo, su etiología podría estar determinada por factores de origen biológico, genético, ambiental, familiar o psicosocial. Algunos de los trastornos mentales más prevalentes en el mundo actual son la depresión y la esquizofrenia. Si bien existen numerosos estudios que intentan entender dichas enfermedades en su totalidad, aún hay abundante información que se mantiene incierta.

Hoy en día la depresión es el desorden mental más común en adultos, afectando a 121 millones de personas en el mundo. Se caracteriza por un estado de tristeza, pérdida de interés del placer, sentimiento de culpa, baja autoestima, problemas de sueño y apetito, disminución de la energía y mala concentración. Estos síntomas generalmente conducen a la incapacidad del individuo de hacerse cargo de sus responsabilidades diarias y, en estados crónicos, puede terminar en el suicidio. Por su parte, la esquizofrenia es una enfermedad mental que afecta a 24 millones de personas en el mundo, en su mayoría entre 15 y 35 años. Entre sus características se encuentran la desorganización del pensamiento, lo que afecta el lenguaje y la percepción de sí mismo, además puede incluir experiencias sicóticas que van desde la sensación de escuchar voces, hasta generar ilusiones. A pesar de que existen tratamientos para ambas patologías, sólo el 25% y menos del 50% de los afectados respectivamente, pueden optar a uno ([http://www.who.int/mental\\_health](http://www.who.int/mental_health)). Además, los medicamentos que se utilizan con mayor frecuencia, como son la Fluoxetina para la depresión y la

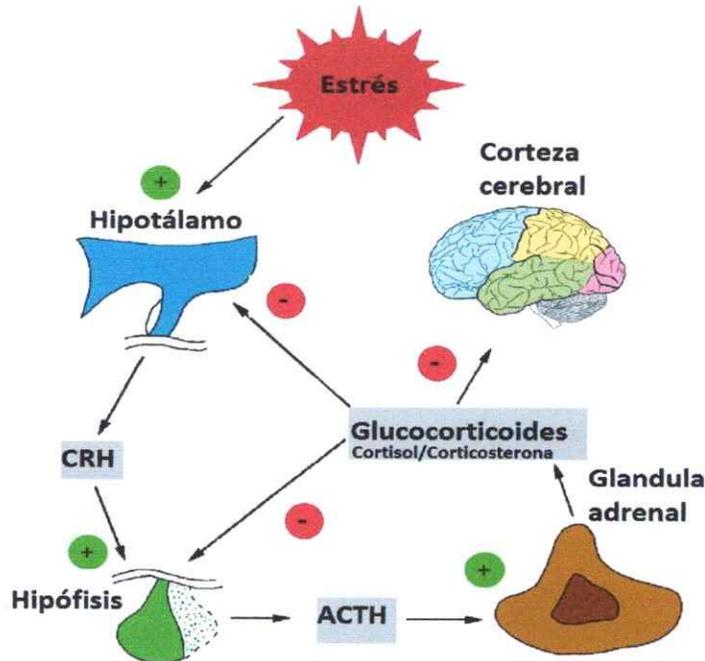
Clorpromazina para esquizofrenia, si bien controlan la enfermedad, no la curan ni previenen, de manera análoga, generan abundantes contraindicaciones: entre ellas destacan las irregularidades en la masa corporal y el sueño, temblores espontáneos, nerviosismo, y dependencia química (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus>).

Por estas razones, existe un auge por entender la etiología, manifestación y prevalencia de dichas enfermedades. Un factor que se ha propuesto como fundamental en la generación de las patologías mencionadas es el estrés (Calabrese et al., 2009; Andrus et al., 2010; Dayan et al., 2010). Más aún, cuando el estrés es provocado durante la gestación, se ha demostrado que los factores moleculares producidos por la madre en respuesta a estrés, pueden atravesar la placenta, llegando al feto, lo que altera negativamente su desarrollo. De esta forma, el estrés prenatal es propuesto como un factor que genera vulnerabilidad y predisposición a la adquisición de trastornos asociados al cerebro (Suchecki and Palermo Neto, 1991; Baumann et al., 1993; Charil et al., 2010).

### **3.1 Estrés y sus implicancias en el cerebro.**

El estrés puede definirse como una respuesta o cambio de la función biológica (fisiológica o psicológica) para adaptarse a un agente físico, químico o psicógeno. Este estrés puede generar respuestas adaptativas, lo que se conoce como *eustress*, o bien, un desacoplamiento con el entorno cuando el evento es lo suficientemente abrumador y prolongado, lo que se denomina *distress* (Selye, 1976). Entre las respuestas adaptativas del cuerpo encontramos: aceleración del ritmo cardíaco y respiratorio, redireccionamiento del flujo sanguíneo hacia los músculos, corazón y cerebro, aumento en la atención, entre otras (Chrousos and Gold, 1992).

Los modelos animales que se han utilizado para la generación del estrés incluyen inmovilización, cambios de temperatura y luz, sonido, dolor, nado forzado y apiñamiento. Dependiendo de la intensidad y duración del protocolo, éste se puede clasificar como estrés crónico, agudo o por repetición. Los protocolos mencionados anteriormente intentan reproducir en el animal situaciones de estrés psicosocial o por catástrofe (terremoto, avalancha, guerras mundiales), y tienen en común la activación del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal (HPA) (Charil et al., 2010). Este eje se activa inicialmente en la región hipotalámica del cerebro luego de algún evento estresante, dando lugar a la secreción de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH). Esta hormona puede viajar a la hipófisis y favorece la liberación de la hormona corticotrofina (ACTH). ACTH por su parte, puede viajar a las glándulas adrenales, promoviendo la liberación de glucocorticoides (GC) (cortisol en humanos, corticosterona en murinos) desde la corteza adrenal (Tsigos and Chrousos, 2002). Los GC son los principales efectores del eje, los cuales regulan la homeostasis de todo el cuerpo y son los mediadores de la respuesta frente al estrés. Además, estas hormonas, una vez que la respuesta frente al estrés cesa, regulan negativamente la expresión de CRH y ACTH, desde el hipotálamo y la hipófisis, respectivamente, apagando el HPA (Fig.1)(Canny et al., 1989).



Adaptado de Miller y Callaghan. Ageing Research reviews. 2004

**Fig.1: Activación del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal (HPA):** Un evento estresante desencadena la activación del HPA, iniciado por el hipotálamo que secreta CRH y provoca la liberación de ACTH por parte de la hipófisis. Finalmente la ACTH induce la liberación de glucocorticoides por parte de las glándulas adrenales.

Los efectos del estrés en condiciones no fisiológicas han sido estudiados mediante los protocolos previamente mencionados o mediante la adición directa de glucocorticoides, CRH y agonistas a los receptores de corticoides. Las estructuras más afectadas incluyen el hipocampo, la corteza y regiones límbicas como la amígdala.

Se ha descrito que la administración prolongada de GC provoca retracción dendrítica apical y una disminución del 20% en la arborización dendrítica en las neuronas piramidales de la zona CA3 (Watanabe et al., 1992). Cuando la exposición a los GC es mayor aún, se observan daños más severos como la muerte celular y gliosis,

en estas mismas neuronas (Sapolsky et al., 1985). Sumado a esto, en el giro dentado se aprecia supresión de la neurogénesis, lo que en conjunto con las aberraciones en las neuronas de la zona CA3, provocan deficiencias en la memoria episódica, espacial y contextual (McEwen, 1999). Por otro lado, se demostró que el estrés provoca un aumento en la arborización dendrítica en las neuronas del complejo basolateral de la amígdala, sugiriendo un aumento en la plasticidad sináptica en esta región (Vyas et al., 2002). La corteza cerebral también se ve afectada por el estrés. Aquí, se aprecia una disminución en el largo dendrítico apical de las neuronas de la corteza auditiva (Bose et al., 2010) y alteraciones en la densidad y morfología de espinas dendríticas (Michelsen et al., 2007). Además, se demostró que la corteza prefrontal sufre una reorganización sináptica (Holmes and Wellman, 2009) y es un blanco fundamental de las fibras nerviosas activadas por estrés provenientes de la amígdala (Arnsten, 2009). Dichos efectos morfológicos en todos los casos van acompañados de trastornos de ansiedad, memoria y aprendizaje.

Molecularmente, el estrés provoca en el hipocampo una disminución en los niveles del mRNA del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y un aumento en los niveles del mensajero de la neurotrofina-3 (NT-3) (Smith et al., 1995). El efecto contrario se aprecia en la corteza frontal, donde el mensajero de BDNF aumenta en ratas estresadas (Bland et al., 2005). Además, se aprecia que factores de transcripción como NF-KB y Pax-6 disminuyen (Auphan et al., 1995; Gesina et al., 2004), mientras que otros como Egr-1 aumentan (Revest et al., 2005).

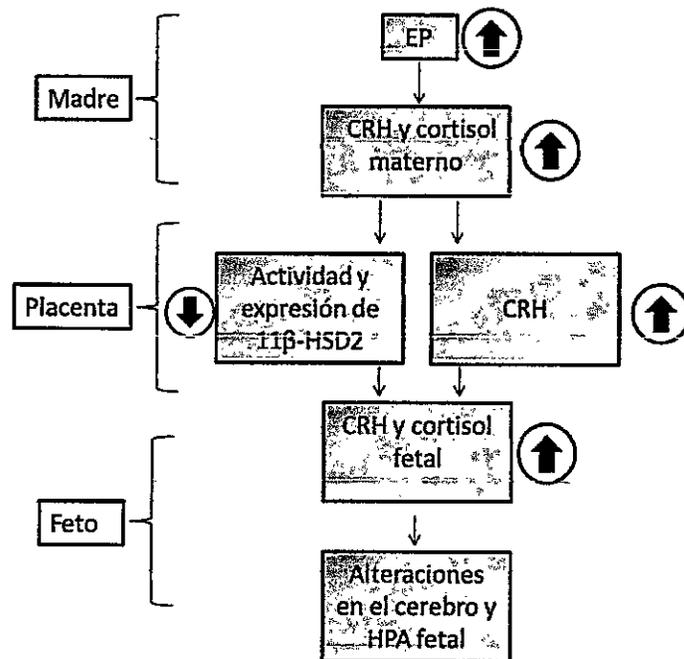
De este modo, se aprecia que el estrés, mediado por la activación del HPA, provoca cambios morfológicos que tienen que ver fundamentalmente con el desarrollo y

la conectividad dendrítica, y altera la expresión de factores claves en el desarrollo neuronal, como son las neurotrofinas y los factores de transcripción. Dichos antecedentes hacen pensar que los efectos producidos por el estrés en el cerebro adulto, al recapitularse durante la gestación podrían perfectamente afectar el desarrollo cerebral.

### **3.2 Efectos del estrés en el desarrollo.**

Cuando hablamos de estrés en el desarrollo, o estrés prenatal (EP), nos referimos al estrés que puede traspasarle la madre a la cría cuando ésta se encuentra en su útero. Como se mencionó anteriormente, el estrés está dado principalmente por una activación del HPA, que tiene como efector final los GC. Una rata preñada posee niveles de corticosterona basalmente altos; a estos niveles, la corticosterona puede atravesar la placenta, favorecer el crecimiento del feto, e inducir la producción de ciertas enzimas como los surfactantes pulmonares. Si producto de un evento estresante, los niveles de corticosterona aumentan aún más, pueden llegar al feto en concentraciones inadecuadas, alterando su desarrollo y crecimiento. Cabe destacar que existe una CRH placentaria, la cual a diferencia de la CRH hipotalámica, es favorecida en presencia de cortisol. De esta forma un aumento en el HPA de la madre promueve la producción de CRH placentaria, la cual llega al cerebro del feto en altas concentraciones alterando así su desarrollo. Sumado a esto, el cortisol materno inactiva a la enzima  $11\beta$ -HSD2, que es una barrera natural placentaria contra los GC, aumentando más aún la exposición de éstos a la placenta y el feto (Fig.2). Entre los daños observados, destacan la disminución del volumen total y la arborización dendrítica en el hipocampo y la disminución de la densidad de espinas dendríticas y arborización dendrítica de las neuronas piramidales de

la corteza cerebral, sumado a esto, se han logrado apreciar daños en la amígdala, hipotálamo y cerebelo. Por su parte, la placenta es un órgano fundamental en el mantenimiento de la homeostasis fetal, ya que cumple funciones entre las que destacan el suministro de nutrientes y oxígeno. Producto del EP, estas funciones pueden verse afectadas, dando lugar a daño oxidativo y al aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Estos daños han sido fuertemente asociados con desórdenes en el desarrollo del sistema nervioso y por ende con la generación de enfermedades mentales como la esquizofrenia (Charil et al., 2010).



Adaptado de Charil y cols. Brain research reviews. 2010

**Fig.2: Efectos del estrés prenatal en el feto:** El estrés materno provoca un aumento en los niveles de CRH y una disminución de 11β-HSD2 en la placenta, lo cual genera un aumento del cortisol fetal y alteraciones en el cerebro de éste.

Ha sido demostrado por múltiples abordajes que el EP afecta el correcto desarrollo del feto. Por un lado, se ha descrito que el volumen hipocampal se reduce en alrededor un 12% y que la neurogénesis postnatal en el giro dentado disminuye en un 32% en primates no humanos estresados prenatalmente (Coe et al., 2003). El mismo resultado se observa en roedores estresados prenatalmente, en ellos la proliferación neuronal del hipocampo disminuye en un 60% a 10 días postnatal (Kawamura et al., 2006). Sumado a esto, se aprecia una disminución del 73% de la arborización dendrítica con un 50% de pérdida de sinapsis en la zona CA1, en ratas EP de 90 días (Barros et al., 2006). Cabe mencionar que estos ensayos fueron reproducidos *in vitro*, donde la aplicación de agonistas y antagonistas de los receptores de glucocorticoides produjeron una disminución en el largo y arborización dendrítica para el caso de los agonistas, y un aumento de estos parámetros para los antagonistas, demostrando que los efectos del estrés en la morfología dendrítica son mediados por glucocorticoides (Fujioka et al., 2006). En la corteza, por su parte, se observa un 46% de reducción en la arborización dendrítica acompañado de un 52% de pérdida de sinapsis (Barros et al., 2006), además se aprecia una reducción de la densidad de espinas dendríticas de un 20% en la neuronas piramidales de la corteza orbito frontal y anterior cingulada (Murmu et al., 2006; Michelsen et al., 2007). Finalmente, se aprecia una disminución del 20% en el volumen de los núcleos de la amígdala y una disminución de un 25% del número de neuronas de éstos (basolateral, central y lateral) (Kraszpulski et al., 2006).

En la edad adulta, el estrés prenatal puede producir comportamientos ansiosos (Vallee et al., 1997; Green et al., 2011), disminución de la plasticidad sináptica (Ulupinar et al., 2011), y deficiencias en el aprendizaje y la memoria (Vallee et al., 1997; Lemaire et al., 2000; Wu et al., 2007)

Las evidencias mostradas anteriormente demuestran que el EP provoca trastornos en el desarrollo de las estructuras cerebrales, lo cual podría mantenerse en el tiempo afectando capacidades cognitivas superiores como son la memoria y el aprendizaje. Complementando dichos estudios existen evidencias que pretenden explicar estos fenómenos desde el punto de vista molecular.

Varios estudios demuestran que el EP puede aumentar la metilación global del ADN, mecanismo molecular que en la mayoría de los casos termina con el apagamiento de genes, tanto en la corteza como en el hipocampo (Mychasiuk et al., 2011). Corroborando lo anterior, otro grupo logró demostrar lo mismo, pero en una fracción neuronal específica que tiene relación con la enfermedad de esquizofrenia como lo son las interneuronas GABAérgicas (Matrisciano et al., 2012). Ambas evidencias proponen al EP como un inductor del silenciamiento génico, lo cual concuerda con el estudio realizado en 2007 por el grupo de M Weinstock, que demuestra que en individuos afectados por EP ocurre un apagamiento de genes involucrados en sinapsis, como sinaptofisina y sinaptotagmina (Bogoch et al., 2007). De manera similar, mediante el análisis de genes involucrados en muerte celular, otro grupo demuestra que el EP promueve la apoptosis intrínseca, ya que desfavorece la inhibición de calpaina-2 y caspasa-8 (Baquedano et al., 2011). Además del apagamiento de genes, el EP puede mediar la actividad de proteínas regulando sus fosforilaciones. Se demostró que en individuos que habían sido estresados prenatalmente, la fosforilación en Ser9, una señal inhibitoria para la actividad de GSK3- $\beta$ , estaba disminuida en la corteza frontal, vinculando este cambio en la actividad de la quinasa con la depresión (Szymanska et al., 2009). Por otro lado, se demostró en un modelo de estrés en adulto un aumento en la actividad de la quinasa Cdk5 en el hipocampo en los individuos estresados, medido a

través de la localización de su activador p35, ubicado mayoritariamente en la membrana celular (Zhu et al., 2012).

Modificaciones en la actividad de ambas quinasas han sido asociadas con enfermedades neuropsiquiátricas, además, son parte de una ruta de señalización que termina en la modulación de la dinámica del citoesqueleto. Sin embargo, es necesario entender cuáles son las señales que regulan río arriba la activación de estas moléculas para comprender mejor los mecanismos moleculares involucrados en enfermedades neuropsiquiátricas. Una proteína que podría ser fundamental en el origen de las disfunciones previamente descritas, que esta implicada en los procesos involucrados en la dinámica del citoesqueleto y que es uno de los elementos iniciales de la ruta de señalización que termina con la modulación de las quinasas previamente mencionada (GSK3- $\beta$  y Cdk5), es la glicoproteína Reelina.

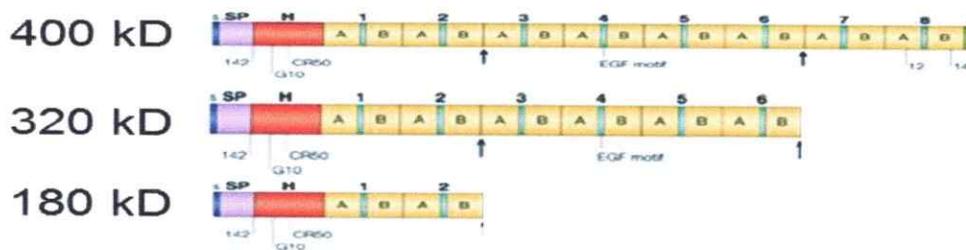
### **3.3 Aspectos generales de Reelina**

Reelina es una glicoproteína de matriz extracelular de ~ 400kD, expresada en mamíferos durante el neurodesarrollo principalmente por las neuronas de Cajal-Retzius (CR), ubicadas en la zona marginal de la corteza e hipocampo (Alcantara et al., 1998), y en las neuronas granulares del cerebelo (Tissir and Goffinet, 2003). En estadios adultos, las neuronas de CR degeneran en el hipocampo y corteza (Ringstedt et al., 1998) limitando la producción y secreción de Reelina a las interneuronas GABAérgicas (Pesold et al., 1998). Entretanto, la expresión de Reelina en el cerebelo adulto continúa siendo exclusiva de las neuronas granulares (Lacor et al., 2000). Además, durante el desarrollo existe producción de Reelina en estructuras como el hipotálamo, el bulbo

olfatorio, en ganglios basales y en la amígdala, en este último, la expresión continúa en la adultez pero a bajas concentraciones (Alcantara et al., 1998).

El gen codificante para Reelina se ubica en el cromosoma 7q22 de humanos y en el cromosoma 5 de ratones (DeSilva et al., 1997). El mensajero que se genera posee 65 exones correspondientes a 450 Kb del ADN genómico (Royaux et al., 1997). Se ha descrito que la zona de inicio de la transcripción es rica en nucleótidos CG, los cuales en conjunto con el exón 1 forman una gran isla CpG (Chen et al., 2002). La presencia de esta isla sugiere que la expresión de Reelina puede ser regulada por metilación de su promotor. Este punto fue demostrado en dos trabajos consecutivos, en los cuales a través de la adición de inhibidores de la enzima ADN metiltransferasa e histona deacetilasa se produce una disminución en la metilación del promotor de Reelina, provocando un aumento en la expresión de la proteína (Mitchell et al., 2005; Kundakovic et al., 2007). Sumado a las regulaciones epigenéticas, el gen de Reelina tiene múltiples elementos *cis* los cuales incluyen zonas de reconocimiento para factores de transcripción involucrados en el neurodesarrollo como Sp1, Tbr-1 y Pax6, y factores de transcripción involucrados en la transducción de señales desde el citoplasma al núcleo como CREB y NF- $\kappa$ B (Royaux et al., 1997; Grayson et al., 2006).

Reelina posee 3461 aminoácidos, en ella se reconoce un segmento inicial constituido por un péptido señal seguido por un motivo con similitud a F-spodina, luego 8 repetidos A-EGF-B, y finalmente la región C-terminal rica en aminoácidos básicos (Tissir and Goffinet, 2003). Además, puede sufrir un clivaje proteolítico en el comienzo del tercer o séptimo repetido (A-EGF-B), resultando en distintos subtipos de la proteína (Fig.3) (Lambert de Rouvroit et al., 1999).



Adaptado de Tissir y Goffinet. *Natura Reviews*. 2003

**Fig.3: Reelina y sus fragmentos proteolíticos:** Reelina sufre una escisión proteolítica dando origen a un fragmento de 320 kD y a otro de 180 kD.

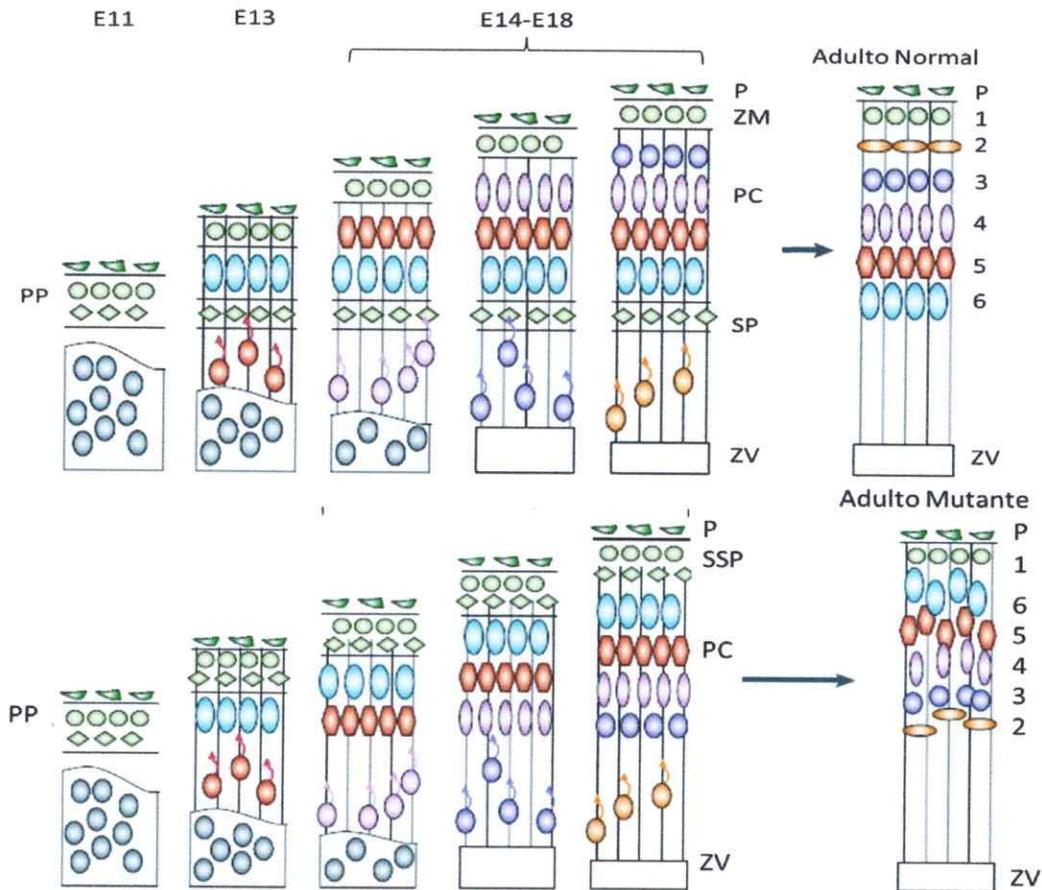
El rol de este clivaje proteolítico se mantiene incierto. Por un lado, se demostró que la correcta función de Reelina es independiente al clivaje y, por otro, que el rol sería más bien facilitador, permitiendo la liberación del fragmento central que se mantiene unido a la matriz extracelular por medio de las regiones amino y carboxilo terminal, ejerciendo de este modo su función en zonas aledañas a su secreción (Lambert de Rouvroit et al., 1999; Jossin et al., 2004; Jossin et al., 2007).

### 3.4 Reelina en el neurodesarrollo.

En el día gestacional 11 (E11) de rata, neuronas post-mitóticas de la futura corteza cerebral migran desde la zona ventricular hasta la superficie pial (P), dando origen a las preplaca (PP). A partir del día E13, otro grupo de neuronas migran hasta alcanzar la preplaca, causando la división de ésta y dando origen a la zona marginal (ZM) y a la subplaca (SP). Las neuronas que causan la ruptura de la preplaca dan origen a la capa cortical (PC). Durante los días E14-E18, cuatro grupos de neuronas postmitóticas migran a través de la subplaca y de las capas corticales ya establecidas, llegando a la zona marginal, donde producto de su encuentro con Reelina detienen su migración. Este proceso se define como migración radial a través de un mecanismo de

“adentro hacia afuera”, donde las neuronas que migran primero quedan ubicadas en las capas más profundas de la corteza (Gupta et al., 2002). Además, la migración puede ser o no dependiente de la glía radial, adoptando el nombre de locomoción o translocación nuclear, respectivamente (O'Rourke et al., 1992).

El ratón Reeler (mutante espontáneo para la proteína Reelina) (D'Arcangelo et al., 1996), posee una clara disrupción de las capas corticales, dado que las neuronas que migran fallan en su posicionamiento, ubicándose en las capas menos superficiales y contrarrestando el modelo “adentro hacia afuera” descrito previamente (Ogawa et al., 1995). De esta manera, producto que las neuronas que migran posteriormente durante el desarrollo quedan en las capas más profundas, se observa una inversión de las capas corticales. Sumado a dicha inversión, se aprecia que las neuronas que se han posicionado no logran interconectarse de la manera correcta ni formar la arquitectura cortical adecuada (Fig.4) (Frotscher, 1997; Curran and D'Arcangelo, 1998; Gupta et al., 2002; Tissir et al., 2002).



Adaptado de Gupta y cols. Nature Reviews. 2003

**Fig.4: Laminación cortical de un individuo silvestre y Reeler:** Un individuo silvestre posee una laminación cortical que se forma en base a un mecanismo de "adentro hacia afuera", el mutante Reeler posee una inversión de las capas corticales, en donde las neuronas que migran con posterioridad quedan posicionadas en las capas mas profundas.

Por otro lado, el Reeler muestra una organización aberrante de las células de Purkinje, las cuales continúan dispuestas en capas subcorticales. Dicha desorganización aumenta en la primera semana post-natal, causando una desaparición de la capa de células de Purkinje y una disminución de la capa granular, ambos sucesos traen consigo una disminución en el tamaño cerebelar (Goffinet et al., 1984). Por su parte, el hipocampo Reeler presenta un giro dentado no compactado y la capa de neuronas

piramidales quebrantada y desorganizada (Stanfield and Cowan, 1979). Cabe destacar que el heterocigoto Reeler, el cual posee 50% menos de Reelina, posee una fenotipo diferente al Reeler, dado que no presenta inversión de las capas corticales ni disminución en el tamaño cerebral (Tueting et al., 1999; Badea et al., 2007). A pesar de esto, el heterocigoto presenta menor cantidad de espinas dendríticas (Liu et al., 2001), menor arborización y largo dendrítico, (Niu et al., 2004) además de comportamiento ansioso (Tueting et al., 1999). Dado que dichas características son propias de trastornos como la esquizofrenia, el ratón heterocigoto Reeler se posiciona como modelo para esta enfermedad (Costa et al., 2002).

Reelina realiza su acción a través de la unión al receptor VLDLR y ApoER2. Además, posiblemente su unión a los receptores CNR y  $\alpha 3\beta 1$  cumpla algún tipo de función, sin embargo sólo el doble mutante VLDLR y ApoER2 fenocopia al Reeler. La unión de Reelina permite la agrupación de los receptores y la fosforilación de la proteína adaptadora disabled 1 (mDab1), a través de las tirosinas quinasas de la familia Src (SFKs), Src y Fyn. La fosforilación de Dab1 en sus 4 sitios, permite el reclutamiento y activación de otras quinasas, lo cual da lugar a una cascada de señalización (Gupta et al., 2002; Knuesel, 2010). Esta cascada comienza con la activación de PI3K, y PI3K puede, por un lado, activar a AKT, la cual inhibe a GSK3- $\beta$ , favoreciendo la estabilización de microtúbulos (Onishi et al., 2007) y por otro lado fosforilar a LIMK a través de cdc42, lo cual termina con inhibición de cofilina, implicada en la dinámica de actina (Chai et al., 2009). Además, la fosforilación de Dab1 favorece la activación de Rap1 (Ballif et al., 2004) y la fosforilación de MAP1B (Gonzalez-Billault et al., 2005), implicadas en la estabilidad de actina y microtúbulos, respectivamente (Fig.5A).

Otra quinasa que se sugiere estar modulada por Reelina es Cdk5. Se demostró que Reelina puede inducir la expresión de Egr-1 vía Erk1/2 (Simo et al., 2007), siendo Egr-1 el factor de transcripción que regula la expresión de p35, el activador endógeno de Cdk5. Por otro lado, datos no publicados de nuestro laboratorio, demostraron que la adición de Reelina exógena en cultivos corticales produce un aumento en la expresión de p35, y por ende una sobreactividad de Cdk5.

### **3.5 Acerca de Cdk5**

Cdk5 es miembro de la familia de serina/treonina quinazas pequeñas dependientes de ciclina (CDK), expresada mayoritariamente en el sistema nervioso central. Para tener actividad enzimática, Cdk5 requiere de la unión a sus activadores, p35 y p39. Se ha demostrado que ambos activadores están enriquecidos en la membrana plasmática, debido a una meristoilación en sus amino-terminales, y co-localizan con Cdk5 cuando ésta se sobre-expresa. Cabe destacar además que gran parte de los sustratos de Cdk5 son transmembrana o asociados a proteínas de membrana (Dhavan and Tsai, 2001). Por otro lado, se han identificado los factores de transcripción que regulan tanto la expresión de Cdk5 como de sus activadores, siendo estos  $\delta$ FOSB (Chen et al., 2000) y Egr-1 (Simo et al., 2007), respectivamente. Cdk5 realiza sus funciones a través de la fosforilación de múltiples sustratos implicados en diferentes funciones. Entre las funciones más importantes destacamos: 1) Desarrollo del sistema nervioso, 2) Sinapsis.

#### *1) Desarrollo del sistema nervioso*

Ratones deficientes en Cdk5 mueren antes o justo al nacer, debido a severas disrupciones en las principales estructuras laminadas como la corteza, el cerebelo y el

hipocampo (Ohshima et al., 1996). Por otro lado, Cdk5 en una manera dependiente de Rac, induce una disminución en la actividad de PAK1 producto de su hiperfosforilación, induciendo una modulación del citoesqueleto de actina. (Nikolic et al., 1998). Además, Cdk5 posee como sustrato proteínas como Tau (Paudel et al., 1993) y MAP1B (Gonzalez-Billault et al., 2005), implicadas en la modulación y estabilización de microtúbulos.

#### *Rol en sinapsis*

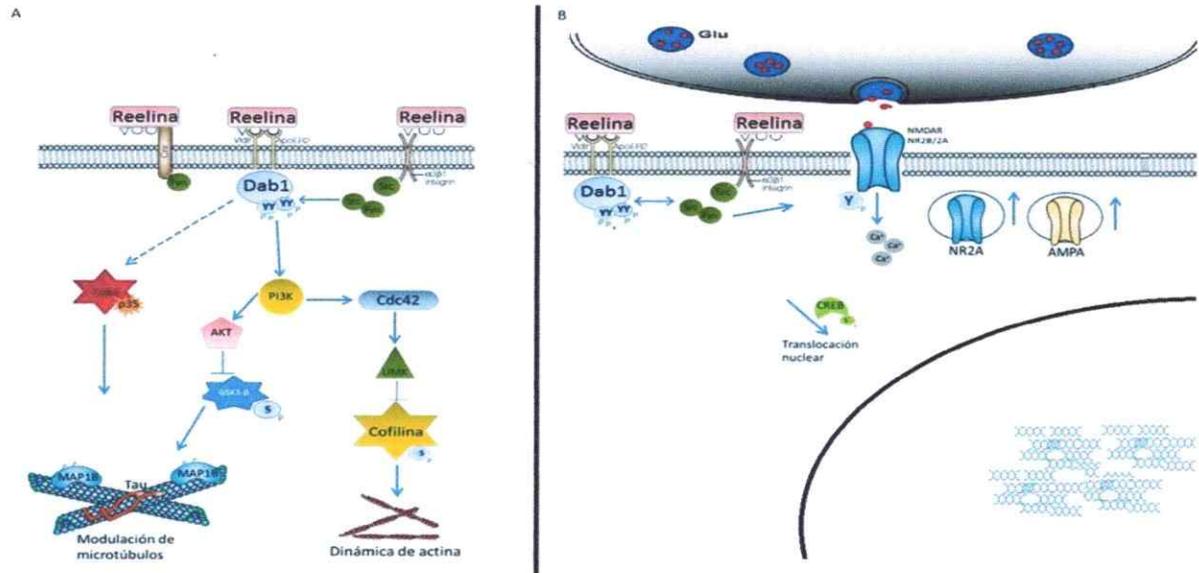
Dado que Cdk5/p35 son altamente expresados en el cerebro adulto, su rol ha sido vinculado a sinapsis. Componentes del compartimiento pre sináptico, como sinapsina y MUNC18 son sustratos de Cdk5; producto de la fosforilación de éstos, la exocitosis y neurosecreción se ve altamente modulada (Matsubara et al., 1996; Fletcher et al., 1999). Por otro lado, se ha visto que Cdk5 puede activar a ERBB y de este modo favorecer la expresión dependiente de neuroregulina de los receptores de acetilcolina (Fu et al., 2001). Finalmente cabe mencionar que Cdk5 puede fosforilar a DARPP-32, un modulador específico de la señalización dopaminérgica y se ha demostrado que una inhibición de Cdk5 provoca un aumento en la respuesta dopaminérgica (Bibb et al., 1999).

Tras revisar algunos aspectos de esta quinasa que podría estar modulada por la vía dependiente de Reelina, volveremos a Reelina para conocer las funciones que posee en el cerebro adulto.

### 3.6 Reelina en el cerebro adulto

A pesar que Reelina ha sido relacionada principalmente con procesos vinculados al neurodesarrollo, en los últimos años han surgido numerosos estudios que le atribuyen funciones en el cerebro adulto, entre las que destacan: el desarrollo de dendritas y espinas dendríticas (Niu et al., 2008; Rogers et al., 2011), modulación de la sinaptogénesis (Borrell et al., 1999), modulación de la plasticidad sináptica (Borrell et al., 1999; Chen et al., 2005; Herz and Chen, 2006; Qiu et al., 2006; Ventruti et al., 2011) y liberación de neurotransmisores (Hellwig et al., 2011).

El mecanismo por el cual Reelina podría modular la sinapsis no está del todo descrito. La información que hay hasta la fecha propone que Reelina, a través de la unión con ambos receptores apoR2 y VLDLR, y en conjunto con el complejo activado Dab1-src/fyn, facilita la fosforilación de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA. Esto favorece el influjo de calcio en la neurona postsináptica y la inserción de la subunidad Glur1 de los receptores AMPA, así como la fosforilación y translocación nuclear de CREB, involucrado en la formación de espinas dendríticas (Knuesel, 2010). Asimismo, se reduce el número de sinapsis silentes, facilitando el intercambio de la subunidad NR2B por la NR2A de los receptores NMDA (Qiu and Weeber, 2007). De esta forma, Reelina modula la plasticidad sináptica involucrada en procesos de memoria y aprendizaje en individuos adultos (Fig.5B).



**Fig.5: Funciones de Reelina en desarrollo y cerebro adulto:** En el neurodesarrollo Reelina desencadena una ruta de señalización que involucra proteínas adaptadores y quinasas y termina en la modulación del citoesqueleto. En el cerebro adulto, Reelina favorece el influjo de calcio a través de los receptores NMDA modulando así la sinapsis y el desarrollo dendrítico.

Además, estudios con mutantes Reeler demuestran que molecularmente tanto marcadores presinápticos (SNARE, SNAP25) (Hellwig et al., 2011) como postsinápticos (PSD-95, PTEN) disminuyen (Ventruti et al., 2011), provocando fallas en la liberación de neurotransmisores, de la captación de éstos por la neurona postsináptica, y por ende de la función sináptica propiamente tal.

### 3.7 Reelina, CDK5 y su relación con enfermedades siquiátricas

Debido a la importancia que tiene Reelina en la correcta estructuración y laminación del cerebro durante el desarrollo, y en la conectividad neuronal y sinaptogénesis durante la adultez, su disfunción ha sido directamente relacionada con la generación o predisposición a adquirir una enfermedad neuropsiquiátrica como la depresión y esquizofrenia, o una enfermedad neurodegenerativa como el Alzheimer (Knuesel, 2010) (Bórquez, 2013).

Las evidencias que corroboraron esta relación de manera más concreta, fueron obtenidas a través de estudios con cerebros humanos provenientes de pacientes que habían fallecido de dichas enfermedades.

La corteza prefrontal e hipocampo de pacientes con esquizofrenia y desórdenes bipolares, que presentaban estados psicóticos, fue analizada luego que éstos fallecieran. La investigación reveló niveles disminuidos de Reelina en los sujetos enfermos en comparación a los sanos (Fatemi et al., 2000; Guidotti et al., 2000). Otro estudio realizado en cerebros provenientes de esquizofrénicos proporcionó ideas sobre el mecanismo molecular por el cual Reelina disminuía, ya que reveló que el promotor de Reelina se encontraba metilado, y que dicho suceso era responsable del silenciamiento génico (Abdolmaleky et al., 2005). Por otro lado, una disminución de Reelina en el hipocampo de pacientes con Alzheimer ha sido correlacionada con el grado de severidad de la enfermedad (Chin et al., 2007).

Por su parte Cdk5 también ha sido relacionado con enfermedades del sistema nervioso, como el Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Dhavan and Tsai, 2001). Una hiperactividad de Cdk5 ha sido asociada con neuronas que poseen ovillos neurofibrilares, corroborando la hipótesis que Cdk5 podría contribuir a la formación de dichos ovillos a través de la hiperfosforilación de Tau (Pei et al., 1998). Por otro lado, hiperactividad de Cdk5 ha sido observada en ratones que expresan la versión mutada para la proteína superóxido dismutasa 1 (Sod<sup>G37R</sup>), mutación presente en individuos con ALS familiar (Nguyen et al., 2001).

A lo largo de la introducción hemos evidenciado, en primera instancia, los efectos del estrés en el cerebro adulto y en desarrollo, haciendo énfasis en las

alteraciones que provoca en la organización, estructuración y funcionamiento de éste. En segunda instancia, estudiamos la proteína Reelina, la cual es clave en los mecanismos de regulación del citoesqueleto y en el correcto desarrollo del sistema nervioso. Alteraciones en la proteína Reelina, lo cual incluye disfunciones en moléculas río abajo de ella como mDab1 y Cdk5, provocan efectos que se correlacionan con los apreciados bajo estrés prenatal. De este modo surgen las siguientes preguntas: ¿Puede el estrés prenatal afectar la expresión de Reelina y en consecuencia su vía de señalización? De ser afirmativa la respuesta, ¿Dicha disminución puede generar efectos a largo plazo tales que en la adultez se vean afectados parámetros conductuales del individuo?. Para responder estas preguntas se plantea la siguiente hipótesis.

#### **4. HIPOTESIS**

El estrés prenatal provoca una disminución en la expresión de Reelina, afectando componentes río abajo de ella, como la actividad de Cdk5. Adicionalmente, dichos efectos se mantienen a largo plazo alterando parámetros conductuales y cognitivos del individuo en estadios adultos.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto del estrés prenatal sobre la expresión de Reelina y elementos río abajo de ella, mediante técnicas celulares, histológicas y bioquímicas, y evaluar si dichos efectos se correlacionan con problemas motores, de aprendizaje y memoria en individuos juveniles.

## **6. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar el efecto del estrés prenatal sobre la expresión de la glicoproteína Reelina en la corteza cerebral de ratas E20, mediante histología y Western-Blot
2. Estudiar el efecto del estrés prenatal sobre la actividad de Cdk5, a través del análisis de fosforilación de sus sustratos.
3. Evaluar si los efectos del estrés prenatal se mantienen luego que los cerebros de dichos individuos permanecieran 5 DIV en cultivo celular.
4. Evaluar consolidación de la memoria y la conducta ansiosa de individuos juveniles estresados prenatalmente.

## **7. METODOLOGIA**

### **7.1 Animales y protocolo de estrés por inmovilización**

Ratas Sprague-Dawley con 10 días de preñez (E10), (n=16) fueron situadas en grupos de a 4, bajo un ciclo de 12 horas luz/oscuridad (inicio luz a las 7:00 A.M) a temperatura controlada y con acceso *ad-libitum* a agua y comida. Las ratas fueron asignadas a dos grupos al azar; el grupo control (n=8), y el grupo estrés (n=8). Adicionalmente, se utilizaron 3 ratas preñadas E16, para el experimento de los efectos de Reelina exógena en la degradación de Dab1

El estrés por inmovilización fue realizado entre los días embrionarios 11 y 20 (E11-E20), tal como describe Vyas y cols.(Vyas et al., 2002). El grupo estrés sufrió inmovilización una vez al día, por dos horas, desde las 10 AM, hasta las 12 PM. Las cajas de inmovilización fueron realizadas por nosotros y poseen dimensiones de 18 cm

de largo, y 6 de ancho y alto. Éstas no permiten el movimiento del animal, sin embargo, ellos pueden respirar sin problemas, y defecar y orinar sin estar en contacto con sus desechos. Los animales control fueron manipulados, pero no inmovilizados. Se realizó un seguimiento de la ganancia de peso en las madres desde el día E11 hasta el E20.

Todos los procedimientos relacionados con la mantención y la experimentación de animales, fueron acorde a la pauta de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) y por el comité de cuidado animal de la Pontificia Universidad Católica de Chile

## **7.2 Procesamiento de los animales**

Al día E20, se seleccionaron al azar 6 ratas preñadas de cada grupo, para realizar análisis histológicos, celulares y bioquímicos en su descendencia. De estas 6, 3 de cada grupo fueron seleccionadas para histología y otras 3 para cultivo celular y bioquímica. Las otras dos ratas preñadas de cada grupo, fueron mantenidas hasta dar a luz y su descendencia fue utilizada para estudios conductuales. Por su parte las crías de las 3 ratas E16 fueron extraídas y utilizadas para cultivo celular.

### **7.2.1 Perfusión y preparación de las secciones para histología**

Las ratas elegidas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital, y perfundidas trascardiácamente con 500 ml de suero salino 0,9%, seguido por 300 ml de paraformaldehído frío 4% (PFA) en Buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4. Al mismo tiempo de la perfusión se colectaron las glándulas suprarrenales y las crías. Las glándulas suprarrenales fueron masadas, y los cerebros embrionarios post-fijados durante un día en PFA 4% en PBS pH 7,4, luego del proceso de fijación los cerebros

embrionarios fueron cortados con un vibrátomo (Leyca VT 1000S) en secciones coronales de 70  $\mu\text{m}$ . Las secciones fueron mantenidas a 4°C en PBS 1X, pH 7,4, hasta realizar las tinciones.

### **7.2.2 Cultivo celular**

Ratas preñadas (E20 y E16), fueron sacrificadas, y las crías fueron extraídas y mantenidas en PBS 1X frío. Después de obtener los cerebros y diseccionar la corteza, el tejido se fragmentó e incubó con HBSS - EDTA Tripsina 1%(10:1) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con HBBS y se disgregó suavemente con una pipeta Pasteur, en medio de plaqueo (DMEM 10% HS). Finalmente se determinó el número de neuronas por contaje en un hemocitómetro y se sembraron placas P60 (experimento cultivo de neuronas provenientes de madres control v/s estrés) y P100 (experimento de los efectos de Reelina exógena en la degradación de mDab1); a una densidad de cerca de 800 mil células y 4 millones de células en DMEM 10% HS, respectivamente y se incubó durante 1 hora y media a 37°C. Luego de este intervalo de tiempo, se cambió el medio de plaqueo por el medio neurobasal suplementado con B27, glutamina 2mM, piruvato 1mM, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomicina. Posteriormente las placas se mantuvieron en incubador humidificado a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO2 durante 5 DIV (experimento cultivo de neuronas provenientes de madres control v/s estrés) y 2 DIV (experimento de los efectos de Reelina exógena en la degradación de mDab1).

## **7.3 Histología**

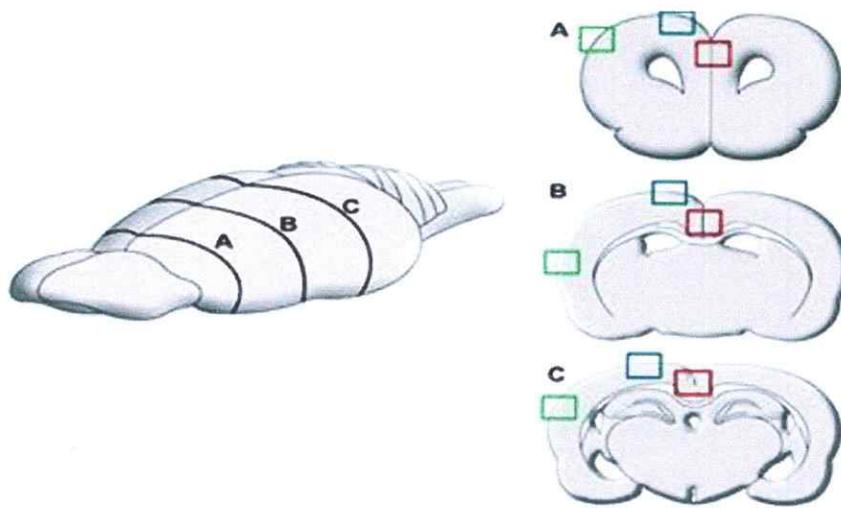
### **7.3.1 Inmunohistoquímica**

Para la inmunohistoquímica de reelina, se seleccionaron cortes cerebrales de la zona frontal, parietal y occipital de cada individuo. Inicialmente se inactivó la peroxidasa endógena, mediante dos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente (TA) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6% en PBS. Luego de 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X pH 7,4, las secciones fueron inmersas en solución de bloqueo (IHC Select Detection Systems, Millipore) durante dos horas a TA e incubadas con el anticuerpo primario monoclonal anti-Reelina (1:1000, Millipore) por una noche a 4 °C. Luego de 5 lavados con PBS, las secciones fueron incubadas 1 hora a TA con el anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado (IHC Select Detection Systems, Millipore), después de los lavados correspondientes los cortes se incubaron por una hora a TA con Estreptavidina-HRP (IHC Select Detection Systems, Millipore). Finalmente, la reacción fue revelada usando diaminobenzidina (1:400, IHC Select Detection Systems, Millipore), durante 10 minutos. Las secciones fueron lavadas en agua destilada y montadas.

### **7.3.2 Análisis de inmunohistoquímica mediante el método del disector.**

Las neuronas inmunoreactivas fueron cuantificadas en 9 zonas diferentes de cada grupo: Dorso-Lateral (D-L), Dorso-Medial (D-M) y Dorsal (D), de la corteza frontal, parietal y occipital (Fig. 6), usando el método del fraccionador óptico como describe (Cruz-Orive and Weibel, 1990). El cuadro de conteo del disector óptico tiene dimensiones de 0.08 mm x 0.08 mm, y la altura considerada es de 0.01 mm. El conteo propiamente tal fue

realizado en doble ciego de 5 campos al azar de los 10 campos posibles del disector óptico. En todos los casos, sólo se consideró la capa más exterior del tejido, correspondiente a las neuronas de Cajal Retzius. El número final de neuronas fue determinado como el promedio de ambos conteos en ciego, y considerando un volumen del disector de  $6.4 \times 10^{-5}$  mm.



**Fig.6: Mapa de las zonas corticales analizadas:** Las zonas Dorsal (cuadrado azul), Dorso-medial (cuadrado rojo) y Dorso-lateral (cuadrado verde), fueron analizadas en la corteza frontal (A), parietal (B) y occipital (C).

### 7.3.3 Tinción de Nissl

Para la tinción de Nissl, se seleccionaron cortes cerebrales de la zona frontal, parietal y occipital de cada individuo. Los tejidos fueron sumergidos 40 minutos en cloroformo, posterior a eso fueron pasados por la batería de tinción que consta de: 2 minutos en alcohol al 100%, 2 minutos en alcohol 95%, 3 minutos en alcohol 70%, 3 minutos en alcohol 50%, 3 minutos en agua destilada, 30 segundos a 1 minuto en solución Nissl, luego se deshidrataron los tejidos siguiendo el camino inverso a la hidratación, es decir, partir introduciendo el tejido 3 minutos en agua destilada, y

terminar sumergiéndolos durante 2 minutos en alcohol al 100%, pasando por los pasos intermedios antes mencionados. Finalmente, los tejidos fueron dejados durante una noche en solución de Xilol, luego secados, montados y cubiertos.

#### **7.4 Extracción proteica, electroforesis y Western Blot desde tejido y cultivo celular**

Se preparó buffer de extracción proteica RIPA (Ripa (2X), inhibidores de proteasas Roche (7X), PMSF (100 mM), NaF (100 mM), caliculina A, ortovanadato de sodio (100X), y H<sub>2</sub>O). Para la extracción proteica desde tejido cerebral, se agregaron 150 µL, de buffer RIPA al hemisferio derecho de cada cerebro E20 y se disgregó con la pipeta P200, seguido por una jeringa de 1 mL. Una vez que el tejido fue homogenizado, se dejó reposar durante 10 minutos en hielo y luego se centrifugó a 4°C durante 20 minutos a 14000 rpm. Tras la centrifugación se rescató el sobrenadante. Para la extracción proteica desde placa, ésta se lavó dos veces con PBS 1X, pH 7,4 para eliminar todo el medio de mantención. Luego se agregaron 100 µL y 150 µL de Buffer RIPA para las placas P60 y P100, respectivamente. Finalmente, las células y proteínas fueron desprendidas de la placa mecánicamente raspando con el “Scraper” y centrifugadas a 4°C durante 20 minutos a 14000 rpm. En ambos casos la concentración proteica se determinó a través del método de Bradford (Bradford, 1976).

Para el Western Blot, se realizaron geles de poliacrilamida al 6%, 10% y al 12% dependiendo de la proteína a analizar. 30 µg de proteínas fueron concentradas en el gel concentrador durante 30 minutos a 80 V, y luego separadas en el gel separador a 120 V, por distintos tiempos, dependiendo la proteína a observar. Tras la electroforesis, se realizó la transferencia en húmedo de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa por 1

hora 30 minutos a 330 mA para proteínas grandes, y por 1 hora a 300 mA, para proteínas pequeñas. Tras la transferencia, se bloqueó con leche de vaca 5% TBS 1X, TWEEN 0,05% y se incubó con el anticuerpo primario diluido en leche de vaca 1% TBS 1X, TWEEN 0,05% durante una noche a 4°C (anti-Reelina 1:1000, Millipore; anti-Dab1 1:1000, Santa cruz; anti-p35 1:1000, Santa cruz; anti-CDK5, 1:1000, Santa cruz; anti-PHF-1. 1:3000, donado por Peter Davis, Albert Einstein College of Medicine, NY, USA; anti-Tubulina 1:10000, Sigma). Tras la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 5 lavados de 6 minutos con TBS 1X, TWEEN 0,05% y se incubó con el anticuerpo secundario durante 2 horas a TA (anti-RATON 1:5000 Jackson; anti-CONEJO 1:5000 Jackson). Luego de la incubación se realizaron 5 lavados de 6 minutos con TBS 1X, TWEEN 0,05%. El revelado de la membrana se hizo usando el kit de ECL (Pierce Thermo Scientific) y films radiográficos (Fujifilm).

#### **7.5 Ensayo de actividad quinasa**

200 µg de proteína previamente homogenizados en tampón T-per (Thermo Scientific) e inhibidores de proteasas (Roche), fueron inmunoprecipitados con 12 µl de anti-Cdk5(C-8) (Santa Cruz), durante 2 horas a 4°C, en agitación. Luego se agregaron 35 µl de proteína G (Santa Cruz) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación. Los inmunoprecipitados fueron lavados 3 veces con PBS 1X por medio de centrifugaciones a 2500 rpm por 5 minutos. Tras los lavados se lavó por última vez con tampón quinasa 1X (TQ) (20 mM Tris·HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA), y se resuspendió en 10 µl del mismo. El ensayo quinasa se llevó a cabo añadiendo 5 µCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (0.5 mM) a una mezcla que incluye: 4 µl de mezcla de ensayo quinasa (TQ5X mas DTT y ATP frío) mas 5 µl de histona H1 (1 mg/ml) y 11 µl de

inmunoprecipitado, e incubándola durante 45 minutos a 30°C. Finalmente la reacción se detuvo agregando buffer de carga (5X) e hirviendo por 5 minutos a 100°C. 25µl del producto de la reacción fueron separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%. Los resultados fueron revelados mediante la exposición de los geles por 2 o más horas en films.

## **7.6 Test conductuales**

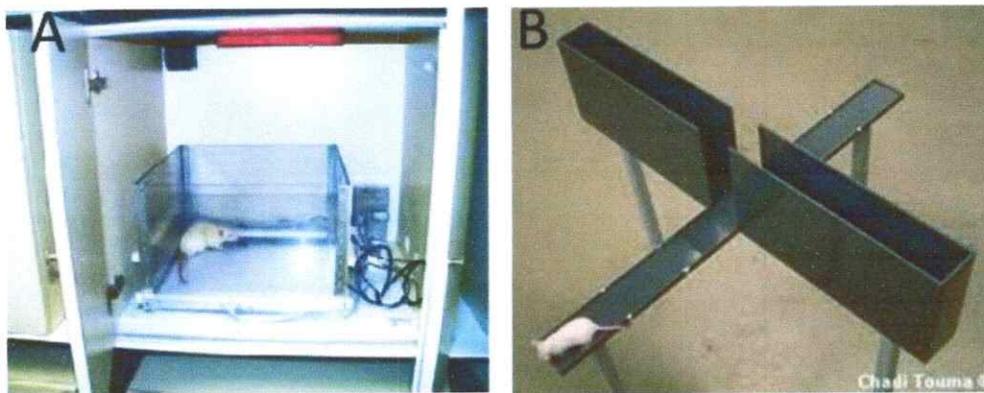
### **7.6.1 Actividad Motora**

Las ratas de cada grupo fueron colocadas individualmente en una caja plexiglás (30 •30 • 30 cm), luego la actividad motora total y la locomoción fueron monitoreadas durante un periodo de 30 minutos y evaluadas. El piso de la caja es una plataforma de actividad (Lafayette Instrument Co., Lafayette, IN, USA) conectada a un contador electromecánico. Con el objetivo de evitar la influencia de sonidos molestos, la plataforma fue colocada al interior de una cámara insonorizada. Cada animal fue observado continuamente a través de una cámara de video Sony conectada a un grabador de video (Sony Corporation, México DF, México). Los resultados fueron expresados como un puntaje tras 30 minutos de observación (Fig.7A).

### **7.6.2 Laberinto en cruz elevada.**

Seguido de los análisis de actividad motora espontánea, se midieron los niveles de ansiedad utilizando el test Laberinto en cruz elevado. Cada rata fue situada independientemente en el laberinto en cruz elevado, el cual consta de dos brazos abiertos (50 x 10 cm cada uno), dos brazos cerrados (50 x 10 x 20 cm cada uno), y una plataforma central (10 x 10 cm), todo esto elevado 100 cm del suelo. La orientación de

los brazos es tal que los brazos similares quedan enfrentados uno con el otro (Fig. 7B). Al comienzo de cada ensayo, los animales fueron situados en la plataforma central mirando hacia un brazo cerrado. Durante un periodo de 5 minutos se registró: (i) el número de entradas al brazo abierto; (ii) el número de entradas al brazo cerrado; (iii) el tiempo total en el brazo abierto; (iv) el tiempo total en el brazo cerrado. La entrada a un brazo se consideró exclusivamente si el animal se encontraba con sus cuatro patas al interior de él. Todos los ensayos fueron realizados entre las 10.00 y 14.00 horas.

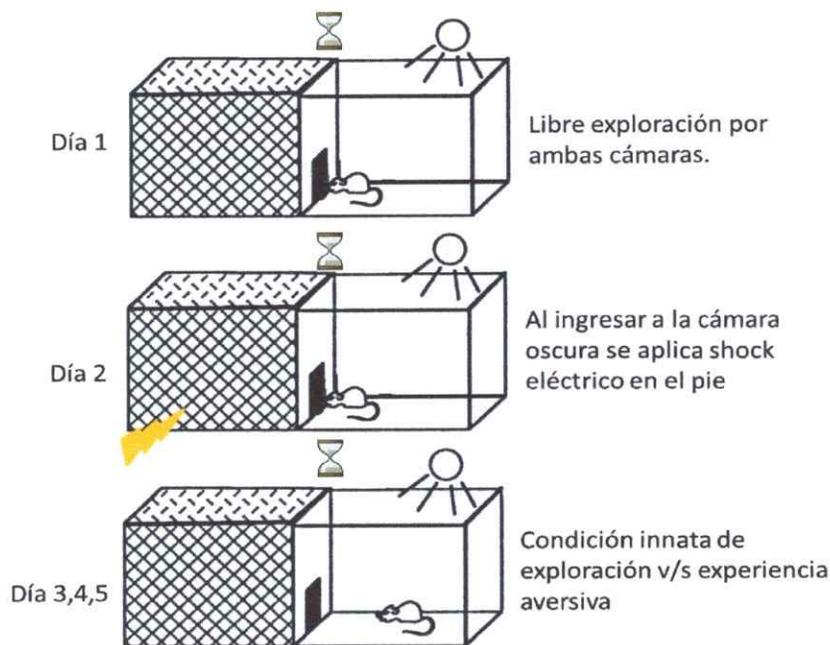


**Fig.7: Imágenes representativas de:** (A) Caja utilizada para medir la actividad motora total y locomoción. (B) Laberinto de cruz elevado.

### 7.6.3 Test de Evitación pasiva

El ensayo fue llevado a cabo al interior de una caja de dos cámaras (Lafayette Instrument Co, IN, USA) compuesta por dos unidades de medición de acero inoxidable separadas por una puerta manual de tipo guillotina. Cada cámara está equipada con una rejilla de choque eléctrico de 18 barras, conectada a una fuente de poder que genera pulsos eléctricos (Master Shock Supply, Lafayette Instrument). Una de las cámaras se mantuvo iluminada mientras que la otra estaba oscura (Fig.8). En cada

ensayo la rata fue colocada en la cámara iluminada a espaldas de la puerta, y se midió el tiempo que demoraba en ingresar a la cámara oscura. El día 1, la rata fue colocada en la cámara libremente, para que se habituara, una vez que entraba a la cámara oscura, se esperó 30 segundos y se removió. En el día 2 comenzó el entrenamiento de evitación pasiva, en donde el animal era situado en la cámara iluminada, una vez que éste ingresaba a la cámara oscura, la puerta se cerraba y se aplicaba un pulso eléctrico de 0.35mA en las patas del animal durante 2 segundos a través de la grilla del suelo. Inmediatamente después del pulso eléctrico la rata era removida de la cámara. El día 3, 4 y 5 se procedió con la prueba de retención, la cual consistía en una prueba sin descarga eléctrica, en donde se medía el tiempo que demoraba la rata en ingresar a la cámara oscura, con un máximo de 300 segundos. Este test está basado en el conflicto entre la evitación incondicionada de una cámara iluminada y la evitación condicionada de una descarga eléctrica. Los resultados fueron presentados como medias de latencia, las cuales sirven como un indicador de la retención de cada grupo por día.

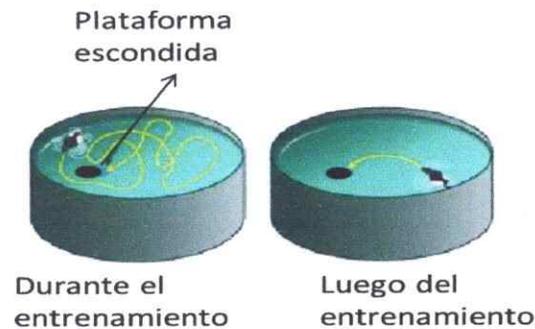


**Fig.8: Esquema del test de evitación pasiva.** El día 1 la rata puede explorar libremente ambas cámaras, el día 2 se somete a un shock eléctrico de pie al ingresar a la cámara oscura. Los consecutivos días 3, 4 y 5 (post shock), la rata se somete a una contradicción que contrapone su condición innata a la exploración v/s el aprendizaje adquirido por la experiencia aversiva generada por el shock eléctrico.

#### 7.6.4 Test de Morris

El test de Morris es un método utilizado para evaluar memoria y aprendizaje espacial en roedores, descrito por Morris en el 1984 (Morris, 1984). El aparato consiste en una piscina circular negra llena de agua hasta 20 cm bajo el borde (150 cm diámetro, 50 cm de profundidad, 22° C de temperatura). La piscina está dividida en 4 cuadrantes de igual área. Además, se coloca una plataforma circular de plexiglás (10 cm de diámetro), en el centro del cuadrante norte (la orientación fue asignada arbitrariamente), dicha plataforma sobresale por 2 cm la superficie del agua y tiene el mismo color de la piscina, con el objetivo de dificultar que fuera visualizada por el individuo (Fig.9). El

test completo tuvo una duración de 5 días, con 5 entrenamientos por día separados de 20 minutos de descanso. En cada ensayo, la rata fue colocada en el agua, mirando uno de los puntos cardinales (norte, sur, este, oeste), y tuvo la posibilidad de encontrar la plataforma en un máximo de 120 segundos. El tiempo que la rata tardó en encontrar la plataforma fue registrado y asignado como latencia. Después de estar 20 segundos en la plataforma, la rata fue tomada cuidadosamente, y retornada a su caja, en la cual pudo secarse y calentarse mediante una lámpara de calor. Los resultados fueron expresados como tiempo de latencia en el desempeño de nado por día para cada grupo



**Fig.9:** Esquema simplificado de la actuación esperada tras el entrenamiento en el laberinto de Morris. Los primeros días de entrenamiento se espera que la rata demore varios minutos en encontrar la plataforma escondida, sin embargo avanzado el entrenamiento la rata debería encontrar la plataforma sin nadar en vano.

### **7.7 Recuperación de Reelina exógena a partir de células HEK y tratamiento en cultivo celular.**

Se utilizó la línea celular HEK-293T (proveniente de riñón humano embrionario), la cual fue previamente transfectada establemente con un plásmido que contiene un gen que codifica para el cADN de la glicoproteína de matriz extracelular Reelina (HEK-293T Reelina), inducible por privación de suero. Como control se

utilizaron células HEK-293T transfectadas con el mismo plasmidio pero sin el gen de Reelina. Ambas líneas celulares (HEK-293T, Reelina, HEK-293T, Control) fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 5 ó 10% FBS, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, geneticina (G418) 250 µL/mL (como medio de selección sólo para las células transfectadas) en placas de cultivo de 100 mm a 37°C, hasta alcanzar una densidad de 80 a 90%. Una vez alcanzada dicha densidad, el medio suplementado fue removido y se agregó DMEM 0% suero. Al final de los siguientes 3 días el medio fue colectado y renovado por uno nuevo. Tras el tercer día de recolección las células fueron descartadas. El medio "Reelina" y "Control", fue concentrado 10 veces mediante centrifugaciones a 3000 G con filtros Amicon de 100kD.

Los medios Reelina y Control se aplicaron independientemente por 1 y 6 horas en cultivo de neuronas corticales de 2DIV provenientes de embriones de 16 días de gestación (Experimento de los efectos de Reelina exógena en la degradación de Dab1). Tras el tratamiento, las proteínas totales fueron extraídas como se describe en 6.4

### **7.8 Fosforilación de Tau en condiciones de sobreactividad e inhibición de Cdk5.**

Neuroblastomas de ratas (N2A), fueron crecidos en medio DMEM suplementado con 5 % FBS, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, en placas de cultivo de 60 mm a 37°C, hasta alcanzar una densidad de 80 a 90%. Alcanzada la densidad, se co-transfectó con polilisina (2:1, polilisina: ADN) 4 µg de ADN con los vectores pBI-p35/EGFP y tTA en una relación de 3:1, en la placa "Cdk5 ON", y se incubó en medio de transfección (DMEM 0%) por 5 horas a 37°C. Al cumplir el tiempo, se cambió el medio por DMEM 5% FBS 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y se agregó 4µl de Roscovitina 20µM a la placa "Cdk5 off",

luego de 24 horas se realizaron extractos proteicos como se detalla en 6.4. Las muestras se analizaron cargando 40  $\mu$ g de proteínas en geles de poliacrilamida, los cuales fueron revelados para: p35 y PHF-1.

## **7.9 Análisis de datos**

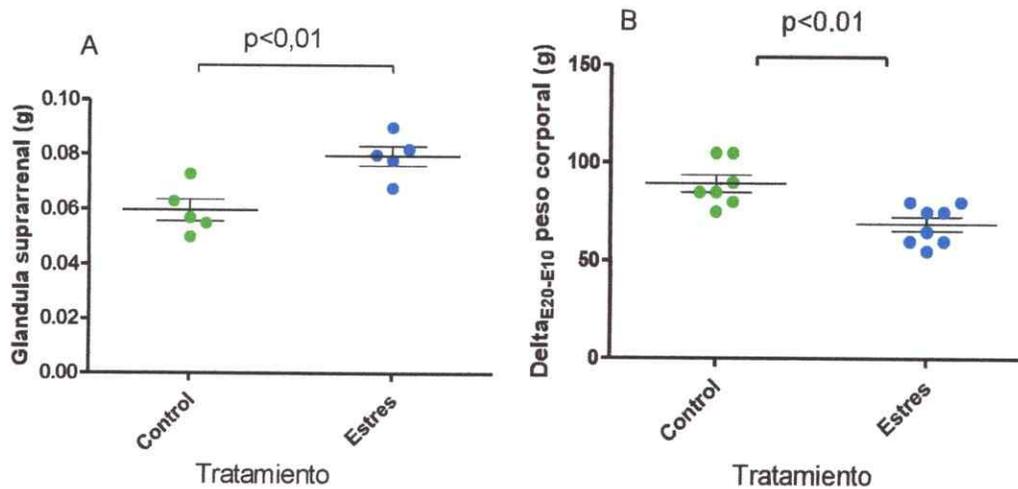
Para todos los tratamientos medimos la respuesta del EPN, comparando los animales estrés versus los control. Los valores fueron expresados como el promedio  $\pm$  error medio. Para el análisis de inmunohistoquímica, se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney, que funciona con datos que no poseen distribución normal. Los ensayos conductuales fueron analizados a través del test de ANOVA. Finalmente los Western Blot fueron cuantificados con el procesador de imágenes de libre uso Image J, y la estadística fue realizada mediante el test de Student. El valor  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. Tanto la estadística como los gráficos fueron realizados con GraphPad Prism 5

## **8. RESULTADOS**

### **8.1 Confirmación del estrés en la madre luego del tratamiento de inmovilización.**

Las ratas preñadas fueron inmovilizadas durante los días E11 hasta el día E20, por dos horas diarias. La generación de estrés en las madres fue confirmada mediante la medición del peso de las glándulas suprarrenales y la ganancia de peso corporal durante los días que se efectúa el protocolo. Se observó que el peso de las glándulas suprarrenales fue un 25% mayor en las madres estresadas en relación a las madres Control (Fig. 10A, Control:  $0.0596 \pm 0.003$  (gr) , Estrés:  $0.07958 \pm 0.003$  (gr), N=5,

$p < 0,01$ ). La ganancia de peso total fue determinada como la diferencia de peso entre los días E20-E10, y se pudo apreciar que las ratas estresadas aumentaron un 30% menos de peso que las ratas Controles (Fig. 10B, Control:  $89.29 \pm 4.42$  (gr),  $N=7$ , Estrés:  $68.75 \pm 3.50$  (gr),  $N=8$ ,  $p < 0,01$ ). Ambos resultados confirman la presencia del estrés en la madre.

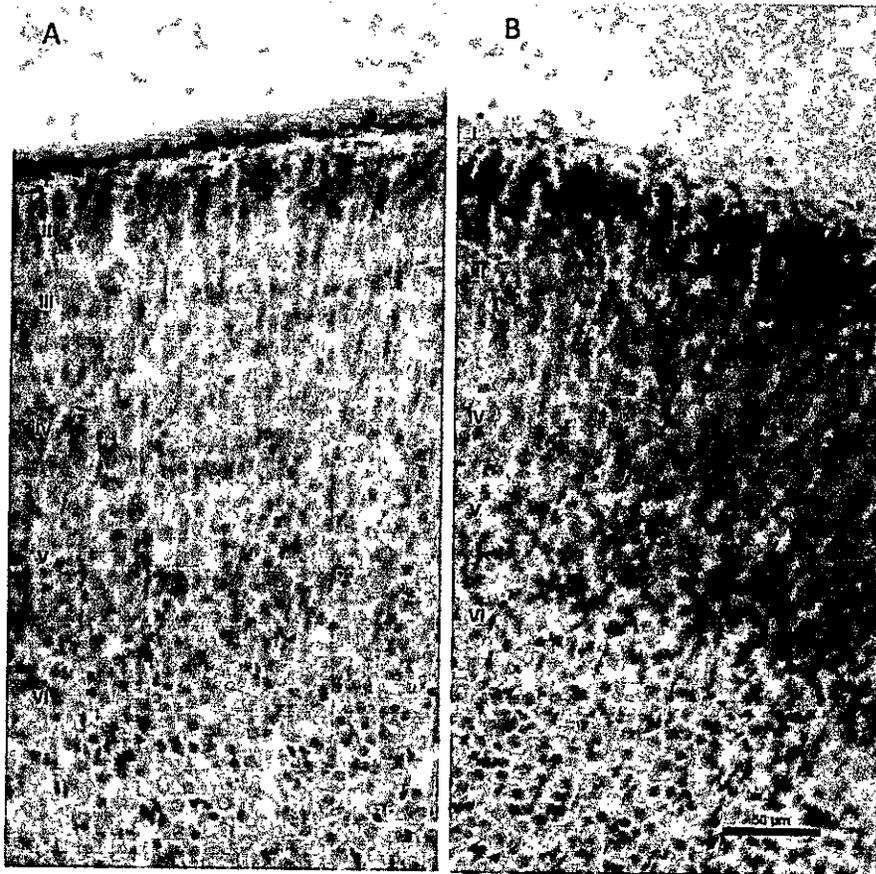


**Fig.10: Generación de estrés en la madre:** Se utiliza el peso de las glándulas suprarrenales y la ganancia de peso corporal en las madres para demostrar la adquisición del estrés. Las glándulas suprarrenales fueron más pesadas en los individuos estresados (A), de manera análoga, estas madres tuvieron una menor ganancia de peso corporal entre los días E10-E20 (B).

## 8.2 Efectos del estrés prenatal en la morfología de la corteza

Una vez confirmada la adquisición de estrés por parte de la madre, los cerebros embrionarios se procesaron y se analizó la morfología de las capas corticales mediante la tinción de Nissl. La tinción de Nissl evidenció una organización y arquitectura normal de la corteza en ambos grupos, se lograron diferenciar todas las capas corticales dispuestas de forma paralela, entre las zonas pial y ventricular (Fig.11A, 11B). Este

resultado se puede apreciar en la corteza frontal, parietal y occipital (sólo se muestra corteza frontal).

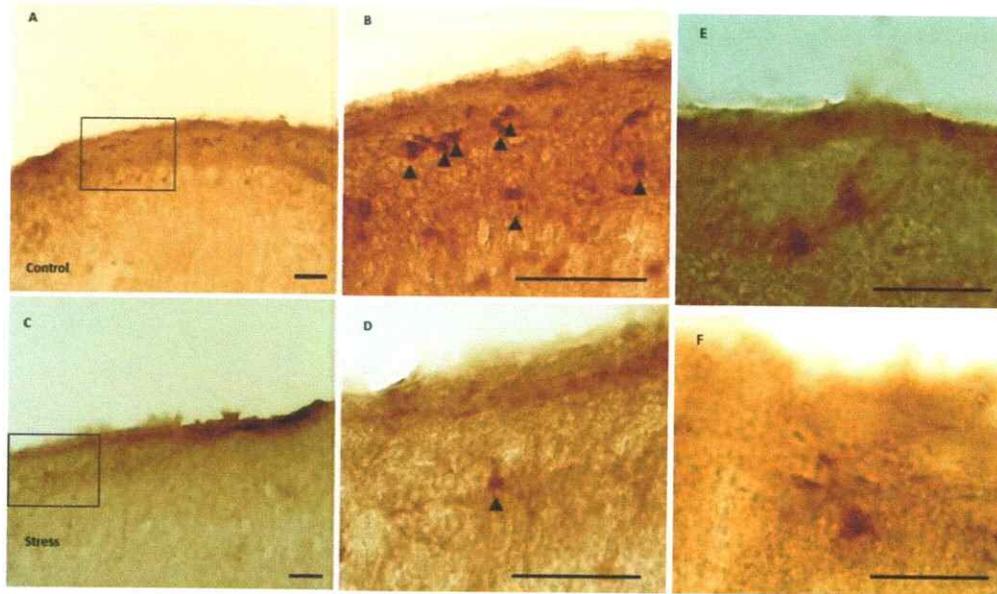


**Fig.11: Análisis histológico de la morfología cortical:** Se realizó la tinción de Nissl para analizar las distintas capas corticales. No se aprecian diferencias en la laminación cortical de los individuos EP (B) en relación a los Controles(A). Se logran distinguir las capas corticales desde la I a la VI.

### **8.3 Inmunoreactividad de Reelina en la capa I de la corteza en individuos estresados prenatalmente.**

Tras corroborar que no existían diferencias en la morfología cortical, se procedió a analizar si el estrés prenatal generaba algún efecto en la producción de Reelina en la zona marginal. Se apreció que los cerebros provenientes de embriones estresados

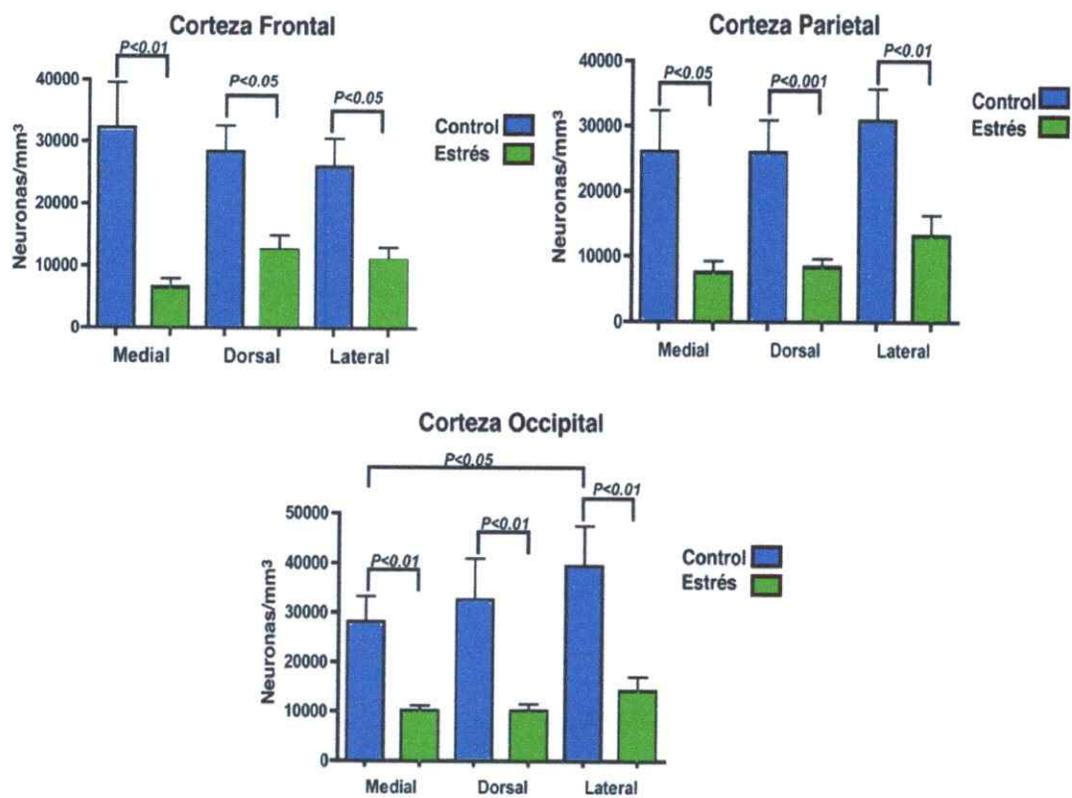
prenatalmente presentan menos células positivas para reelina, en todas las zonas cuantificadas (Fig.13). Éstas incluyen: la zona dorsal, dorso-medial y dorso-lateral, de la corteza frontal, parietal y occipital (ver Fig.6). En los tejidos del grupo Control, se aprecian grupos de neuronas ubicadas paralelas a la zona pial, a diferencia de los tejidos del grupo EP, en donde se aprecian sólo neuronas aisladas (Fig.12A-D). El criterio para considerar una marca positiva se basó en intensidad y morfología de la marca (Fig.13E-F).



**Fig 12: Microfotografía de un tejido Control y EP tras inmunohistoquímica contra Reelina:** Se muestran cortes histológicos de la corteza occipital a 10X y 40X de un individuo Control (A-B) y uno EP (C-D), adicionalmente se aprecia una neurona positiva para Reelina a 100X de un individuo Control y EP (E-F). En el grupo Control se aprecian grupos neuronales ubicados paralelamente a la superficie pial, mientras que en grupo EP se aprecian neuronas aisladas. Barra: 50 $\mu$ m en A,B,C,D, 25 $\mu$ m en E y F.

El conteo neuronal propiamente tal reveló que la zona más afectada fue la corteza frontal dorso-medial con una disminución del 79% (Fig.13A, N: Control=8 cortes, Estrés=6 cortes,  $p<0.01$ ). Análogamente, la corteza dorso-lateral parietal fue la

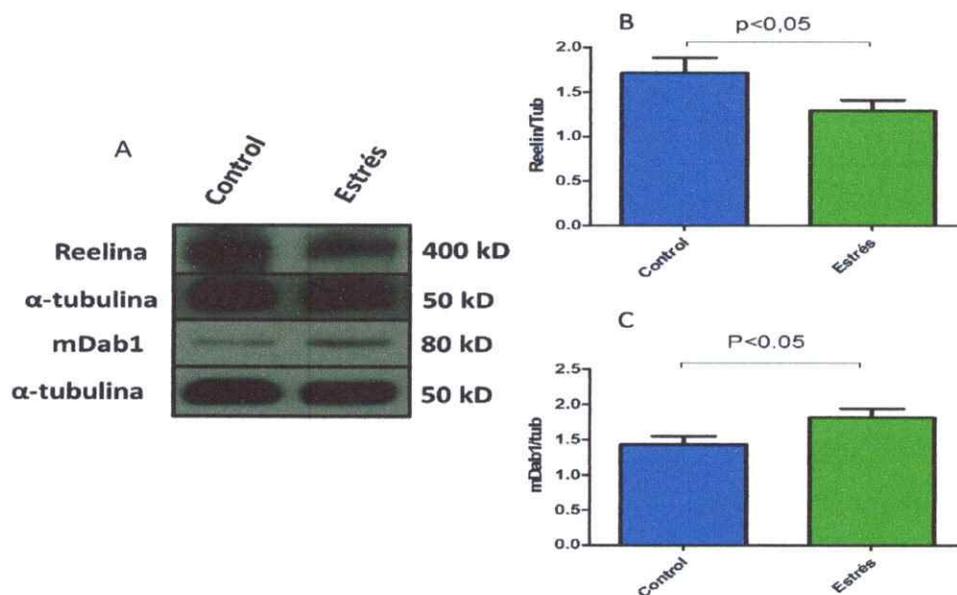
menos afectada con un porcentaje de disminución del 58% (Fig.13B, N: Control=8 cortes, Estrés=7 cortes,  $p<0.01$ ). Aparte de las diferencias apreciadas entre los grupos, se logró ver que al interior de la corteza occipital del grupo Control, la zona dorso-lateral posee un 28% más señal que la zona dorso-medial (Fig.13C, N: dorso-lateral=6, dorso-medial=6,  $p<0.05$ ).



**Fig.13:** Cuantificación de las células reactivas a reelina en la capa 1 de individuos Control y EP. Se apreció una disminución en las neuronas positivas para Reelina de los individuos EP en todas las zonas cuantificadas, incluyendo las zonas medial, dorsal y lateral de la corteza frontal, parietal y occipital.

#### 8.4 Niveles de Reelina y mDab1 en extractos corticales de individuos estresados prenatalmente.

Una vez demostrado por histología que la expresión de Reelina disminuye en la zona marginal, se corroboró dicho resultado mediante el ensayo bioquímico “Western blot”. Además, se analizó la expresión de la proteína adaptadora mDab1, implicada en la ruta de señalización de Reelina; de este modo se verificó si los efectos provocados por el estrés prenatal sobre Reelina podrían desencadenar efectos río abajo de ella. Los resultados muestran que los individuos estresados prenatalmente poseen un 33% menos de la versión completa de Reelina (400kD) en comparación a los individuos Control (Fig.14B, Control:  $1.719 \pm 0.17$ , EP:  $1.292 \pm 0.12$ , N=12,  $p<0,05$ ). Por otro lado, se apreció que los niveles de mDab1 fueron un 27% más altos en los individuos del grupo EP, en comparación con los Controles (Fig.14C, Control:  $1.434 \pm 0.12$ , N=12, EP:  $1.815 \pm 0.13$  N=15,  $p<0,05$ ). Tras las observaciones anteriores, se concluye que el estrés prenatal provoca una disminución de la cantidad total de Reelina en la corteza cerebral. Dicha disminución va acompañada con un aumento en los niveles totales de mDab1, de este modo, no sólo se está viendo afectada la proteína Reelina, sino componentes de su ruta de señalización.

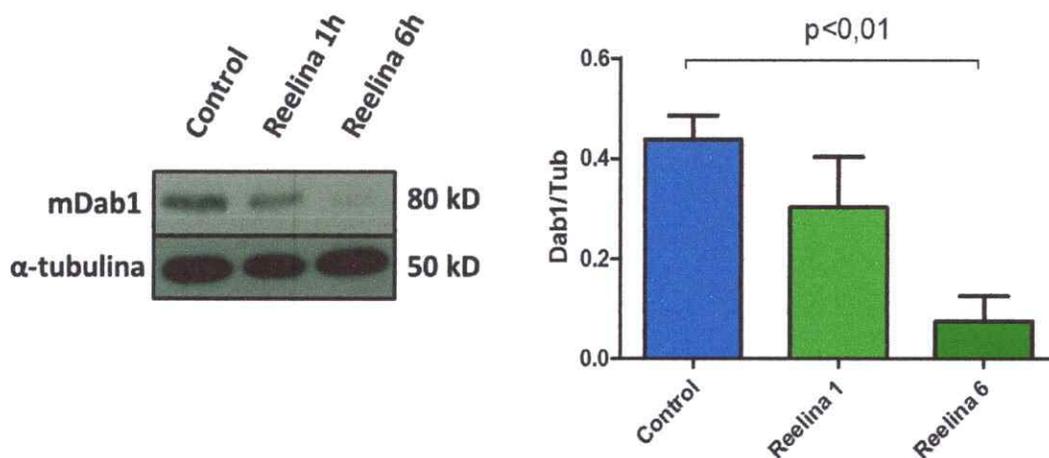


**Fig.14: Efectos del EP en la expresión de Reelina y mDab1 en extractos de corteza:** Se realizaron western blot contra Reelina y mDab1. En A se muestra un resultado representativo para un par de muestras, en B y C se muestra los resultados tras la cuantificación de los niveles de Reelina y mDab1, respectivamente. Se aprecia una disminución en los niveles de Reelina y un aumento en los de mDab1.

### **8.5 Tratamiento de cultivo neuronal con Reelina purificada durante 1 y 6 horas.**

Luego de apreciar que el estrés prenatal genera una disminución en la cantidad de Reelina, y que esa disminución se acompaña de un aumento de los niveles de mDab1, se procedió a investigar si la disminución de Reelina era responsable de dicho aumento. Para estudiar esto, se trataron neuronas cultivadas durante 2 días *in vitro* con Reelina purificada, durante 1 y 6 horas.

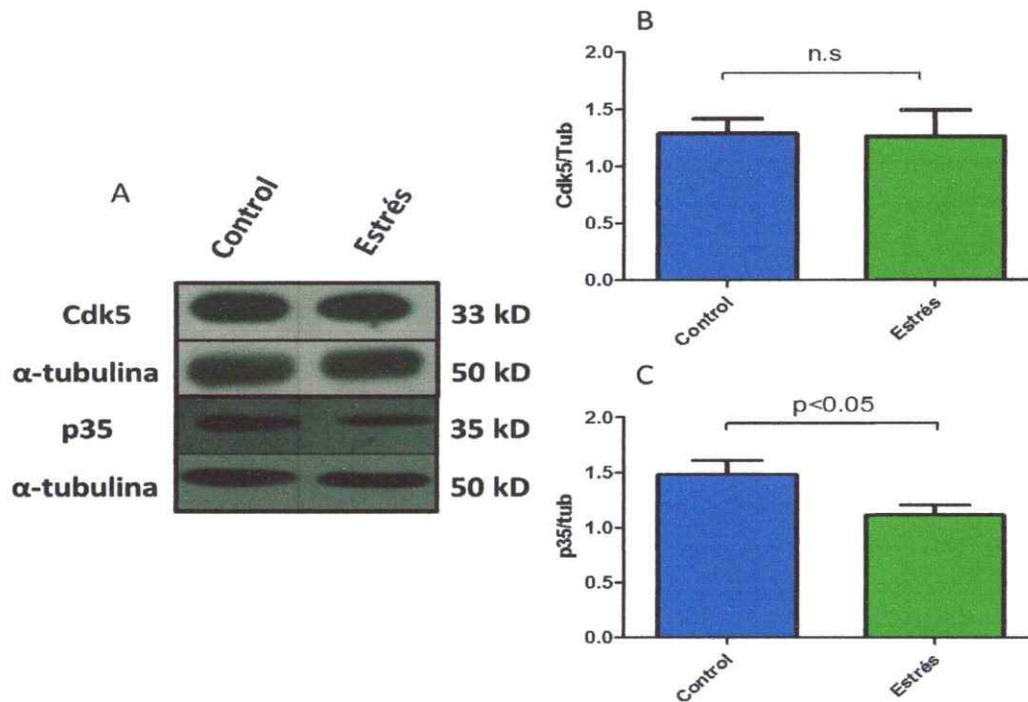
Los resultados indican que al tratar con Reelina durante una hora, los niveles de mDab1 muestran una tendencia a disminuir, sin embargo esa variación no es significativa (Fig.15, Control:  $0.4372 \pm 0.05$ , N=3, Reelina 1h:  $0.3018 \pm 0.11$  N=3,  $p=0,29$ ). La disminución de mDab1 se hace estadísticamente significativa cuando se realiza el tratamiento con Reelina durante 6 horas (Fig.15, Control:  $0.4372 \pm 0.05$ , N=3, Reelina 6h:  $0.07490 \pm 0.05$  N=3,  $p<0,01$ ). De esta observación se concluye que la cantidad de Reelina es inversamente proporcional a la cantidad de mDab1, lo cual es congruente con lo observado anteriormente, en donde producto del estrés prenatal, se observa una disminución de Reelina, y que esa disminución provoca que los niveles de mDab1 se mantengan elevados.



**Fig.15: Efectos del tratamiento con Reelina en la expresión de mDab1:** Luego de tratar con Reelina exógena cultivos corticales durante 1 y 6 horas, se cuantificaron los niveles totales de mDab1. Se aprecia que en la medida que aumenta el tiempo con Reelina, la expresión de mDab1 disminuye.

### 8.6 Efectos del estrés prenatal sobre la actividad de Cdk5.

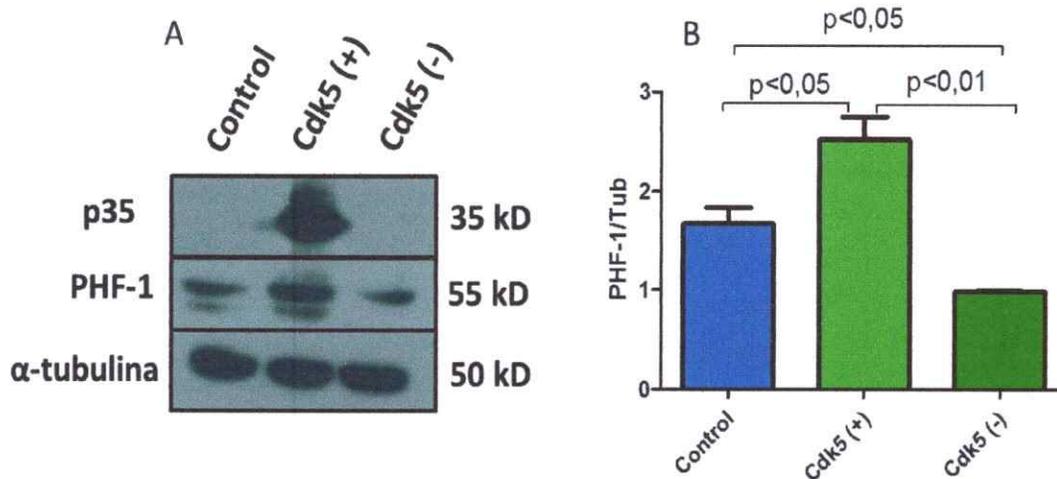
Una vez demostrado que el EP provoca una disminución en la cantidad de Reelina, y que dicho suceso se acompaña con un aumento en los niveles de mDab1, fue de interés estudiar si la quinasa Cdk5, la cual ha sido relacionada con proteínas como Reelina y mDab1, sufre algún cambio en su actividad. Para ello, en primer lugar, se estudiaron los niveles corticales tanto de la quinasa como de su activador principal p35. Se logró apreciar que los niveles totales de Cdk5 no se ven afectados si comparamos los individuos Control con los EP (Fig.16B, Control:  $1.294 \pm 0.13$ , EP:  $1.269 \pm 0.23$ , N=8,  $p=0,9274$ ). Por otro lado, se pudieron apreciar diferencias en los niveles corticales de p35, siendo un 33% menor en los individuos EP con respecto a los Controles (Fig.16C, Control:  $1.484 \pm 0.13$ , EP:  $1.114 \pm 0.09$ , N=8,  $P<0,05$ ).



**Fig.16: Efectos del EP en la expresión de Cdk5 y p35 en extractos de corteza:** Se realizaron western blot contra Cdk5 y p35. En A se muestra el resultado representativo para un par de muestras, en B y C se muestran los resultados tras la cuantificación de los niveles de Cdk5 y p35. No se observan cambios en los niveles de Cdk5, pero sí una disminución en los niveles de p35 en los individuos EP.

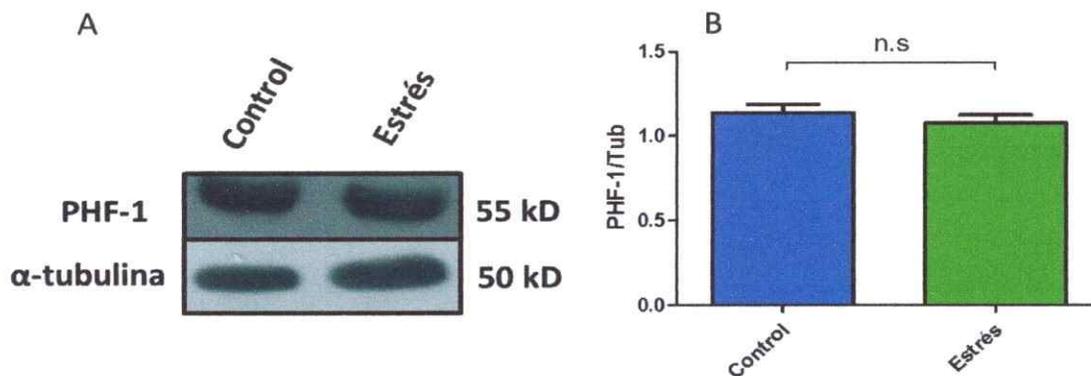
Continuando con el análisis de la actividad de Cdk5, se procedió a estudiar la fosforilación de Tau. Antes de analizar qué sucedía en las condiciones Control y EP, se realizó un ensayo molecular transfectando neuroblastomas de rata (N2A) con el activador p35, lo que produce una sobreactividad de Cdk5, o agregando Roscovitina, un inhibidor farmacológico de la actividad de la quinasa. En dichas condiciones, se analizó la fosforilación de Tau en el epítipo PHF-1, correspondiente a la versión fosforilada de la Ser-396. En primer lugar, se apreció que la transfección con los vectores pBI-p35/EGFP y tTA, efectivamente causó la sobreexpresión de p35 (Fig.17A). En condiciones de sobreactividad de Cdk5, el epítipo PHF-1 se vio aumentado en un 51%

(B, Control:  $1.670 \pm 0.16$ , Cdk5 (+):  $2.524 \pm 0.23$ , N=3), mientras que en la condición de Cdk5 apagado, se apreció una disminución del 42% (B, Control:  $1.670 \pm 0.17$ , Cdk5 (-):  $0.9831 \pm 0.01$ , N=3), ambos casos en comparación al Control.



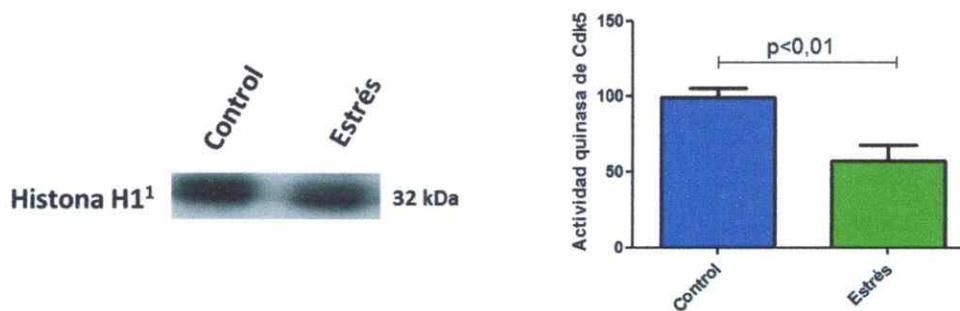
**Fig.17: Fosforilación de Tau dependiente de Cdk5:** Se analizó la fosforilación de Tau en su epítipo PHF-1, en condiciones Control, Cdk5 (+) y Cdk5 (-). La condiciones Cdk5 (+) se obtuvo sobreexpresando p35 con los vectores pBI-p35/EGFP y tTA, mientras que la condición Cdk5 (-) se obtuvo inhibiendo la quinasa con Roscovitina. Se apreció que PHF-1 aumenta significativamente en la condición Cdk5 (+) y disminuye en la condición Cdk5 (-).

Tras estudiar los efectos de la actividad de Cdk5 en la fosforilación de Tau en su epítipo PHF-1, analizamos si dicha fosforilación se vio afectada en los cerebros EP. No se apreciaron diferencias significativas en PHF-1 en los cerebros EP en relación a los Controles (Fig.18B, Control:  $1.137 \pm 0.05$ , EP:  $1.074 \pm 0.05$ , N=7).



**Fig.18: Efectos del EP en la fosforilación de Tau:** Se realizaron western blot contra PHF-1. En A se muestra el resultado representativo para un par de muestras, en B se muestran los resultados tras la cuantificación de los niveles de PHF-1. No se aprecian diferencias significativas.

Para concluir con el análisis de la actividad de Cdk5, se realizó un ensayo de actividad quinasa. Para esto se inmunoprecipitó Cdk5 y se le agregó su sustrato Histona-H1 en presencia de ATP radioactivo, marcado con  $P^{32}$ . Tras el experimento se observó que en los individuos estresados prenatalmente la actividad quinasa de Cdk5 es un 42% menor que en los controles (Control:  $99.60 \pm 5.53$  N=5, EP= $57.25 \pm 10.8$  N=4,  $p < 0,01$ )(Fig.19).

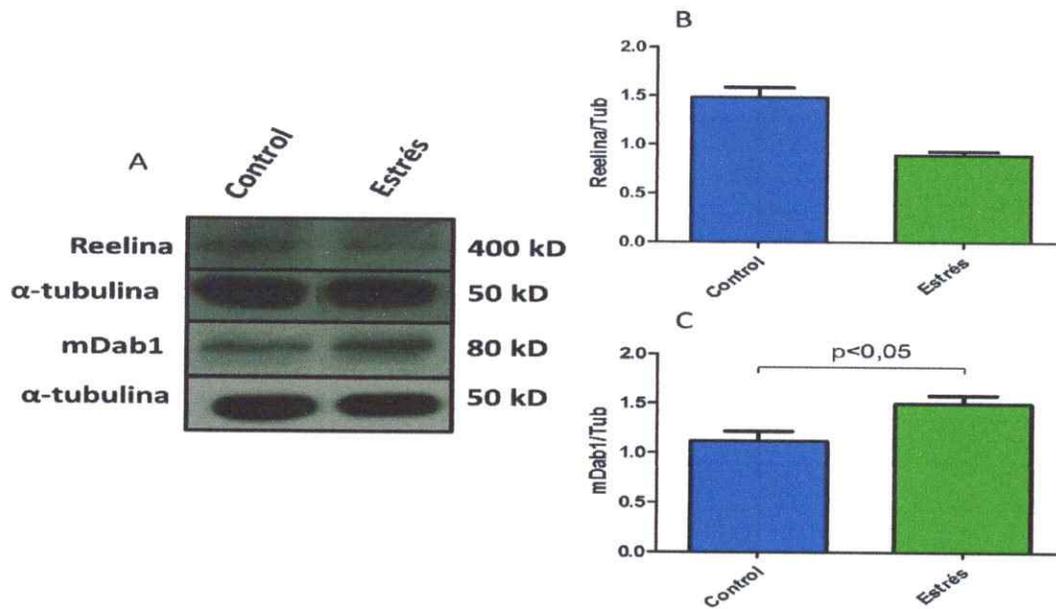


**Fig.19: Ensayo de actividad quinasa:** Se realizó un ensayo de actividad quinasa para analizar la actividad de Cdk5 a través de la fosforilación de histona H1, los individuos EP poseen menor actividad quinasa de Cdk5 que los controles.

Tras el set de experimentos se logró concluir que la actividad de Cdk5 disminuye producto del EP. Dado que tanto p35 como la actividad quinasa disminuye significativamente.

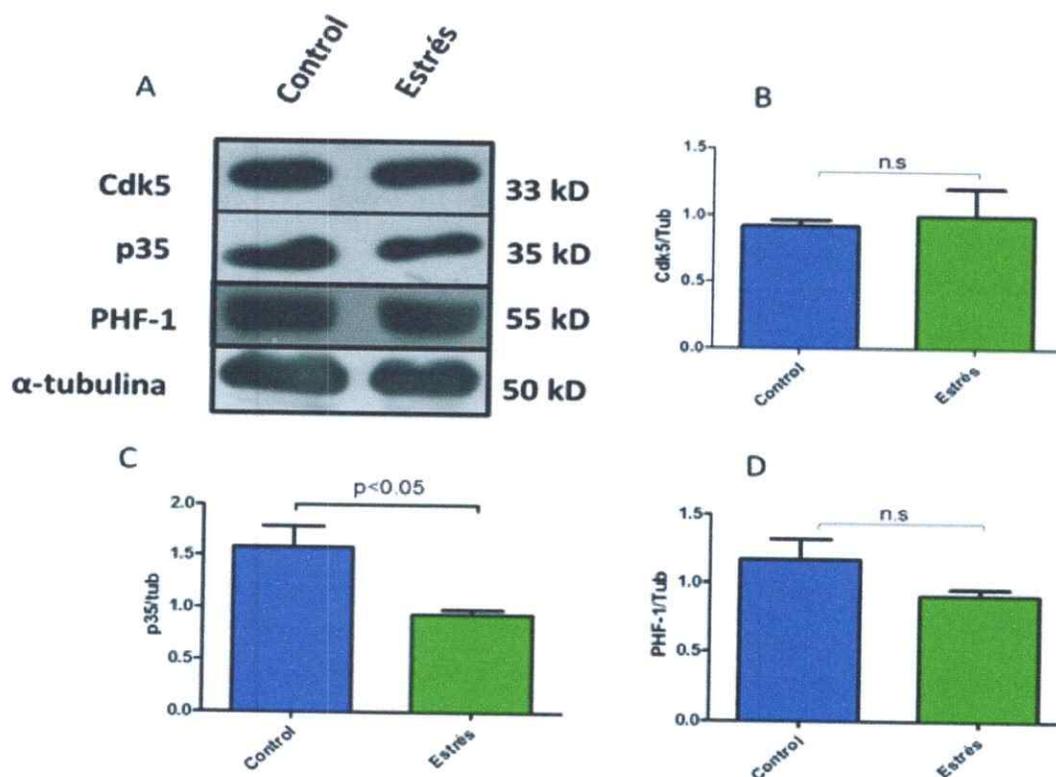
### **8.7 Prevalencia de los efectos del EP tras 5 días *in vitro*.**

De los resultados anteriores se pudo concluir que el estrés prenatal causaba efectos en la expresión y actividad de ciertas proteínas, lo cual se analizó mediante ensayos de inmunohistoquímica y analizando extractos proteicos. Mediante cultivo celular de neuronas EP, se analizó si dichos efectos prevalecían en la placa de cultivo. Tras mantener neuronas EP durante 5 días *in vitro*, se realizaron extractos. Se observó que los efectos en la expresión de Reelina y mDab1 fueron similares a los reportados anteriormente para extractos totales derivados de cerebro. Reelina disminuyó un 65% (Fig.20B, Control:  $1.484 \pm 0.1036$ , EP:  $0.8940 \pm 0.03922$ , N=2) y mDab1 aumentó un 34% (Fig.20C, Control:  $1.119 \pm 0.09797$ , EP:  $1.499 \pm 0.08474$ , N=3,  $P < 0,05$ ) en cultivo de individuos EP respecto a cultivos de individuos Control.



**Fig.20: Prevalencia de los efectos producidos por el EP en Reelina y mDab1 luego de 5 DIV:** Se analizó si los efectos del EP se mantenían luego de realizar un cultivo cortical con dichos cerebros, en A se muestra el resultado representativo para un par de muestras. Los efectos se mantuvieron tanto en la expresión de Reelina (B), como en la de mDab1 (C)

Con respecto a la actividad de Cdk5, se logró observar, al igual que en los extractos derivados de cerebro, que los niveles de Cdk5 no variaron (Fig.21B, Control:  $0.9197 \pm 0.04$ , EP:  $0.9951 \pm 0.21$ , N=3), mientras que los de p35 disminuyeron en un 68% (Fig.21C, Control:  $1.577 \pm 0.22$ , EP:  $0.9370 \pm 0.04$ , N=3,  $p < 0,05$ ) en los EP respecto a los Control. Analizando la fosforilación Tau en Ser-396, notamos resultados algo diferentes a lo observado en los extractos derivados de cerebro, y similares a lo apreciado en el ensayo con las células N2A, ya que, a pesar de que las diferencias no fueron significativas, se apreciaron tendencias más marcadas, las cuales se reflejan en una disminución del 29% en la marca contra el epítoto PHF-1, en los individuos EP respecto a los Control (Fig.21D, Control:  $1.165 \pm 0.16$ , EP:  $0.9058 \pm 0.05$ , N=3,  $p=0,18$ ).



**Fig.21: Prevalencia de los efectos producidos por el EP en la actividad de Cdk5 luego de 5 DIV:** Se analizó si los efectos del EP se mantenían luego de realizar un cultivo cortical con dichos cerebros, en A se muestra el resultado representativo para un par de muestras. En B, C y D, se muestra la cuantificación de los resultados de Cdk5, p35 y PHF-1. Se aprecia que los resultados se mantuvieron luego de realizar el cultivo, sin embargo las diferencias fueron más marcadas.

Tras el análisis de las muestras Control y EP cultivadas durante 5 DIV, se logró concluir que los resultados observados mediante el análisis de los extractos de tejido se pudieron reproducir en esta condición. Más aún, en la mayoría de los casos los efectos observados se vieron exacerbados en la placa de cultivo.

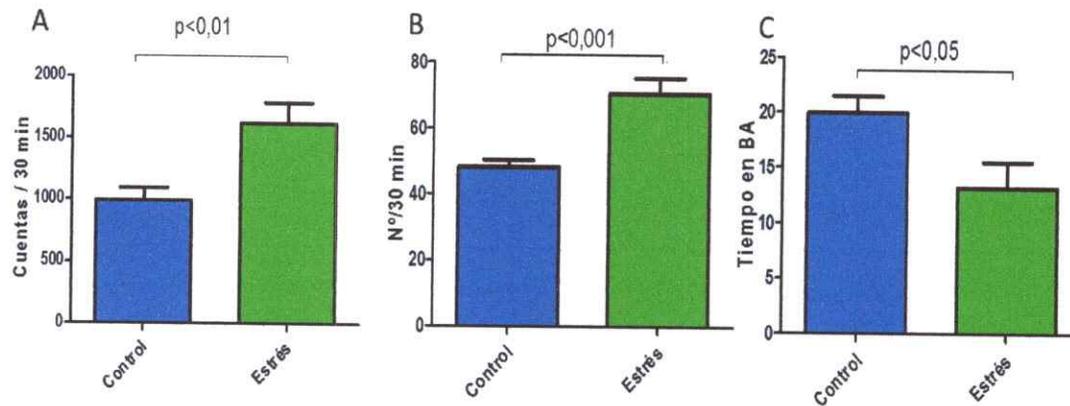
### 8.8 Actividad motora y comportamiento ansioso en individuos EP.

Los resultados expuestos previamente demuestran, por medio de análisis histológicos, celulares y bioquímicos, que el estrés prenatal afecta la expresión de

Reelina en la corteza cerebral, observándose una disminución de ésta. Relacionado con esta disminución, observamos por un lado una acumulación mDab1 y, por otro lado, una disminución en los niveles de p35, acompañado con variaciones en la fosforilación de sustratos de Cdk5, lo que sugiere una disminución en la actividad de ésta.

Considerando que tanto Reelina como Cdk5 han sido involucrados en procesos cognitivos superiores y que su disfunción está relacionada con enfermedades neuropsiquiátricas, fue de interés evaluar si sumado a lo observado en el plano celular-molecular, el estrés prenatal causaba alguna alteración en el comportamiento de individuos juveniles. Se estudió la ansiedad a través del seguimiento de la actividad motora en una caja de registro y del test de Laberinto en cruz elevado. Tras el seguimiento en la caja de registro, se observó que las ratas EP poseen 63% más de locomoción total (Fig.22A, Control:  $988.5 \pm 99.95$  cuentas, EP:  $1616 \pm 169.1$  cuentas, N=11,  $p < 0,01$ ) y un 45% más de levantadas en dos patas (Fig.22B, Control:  $48.18 \pm 2$  N=11,  $70.55 \pm 4$  N=11,  $p < 0,001$ ). Con respecto al test de laberinto en cruz elevada, se observó que las ratas EP estuvieron un 50% menos tiempo en el brazo abierto en relación a las ratas Control (Fig. 22C, Control:  $19.95 \pm 1.5$  (seg), EP:  $13.22 \pm 2.3$  (seg), N=11,  $P < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos tras las 3 mediciones, indican que los individuos que sufrieron estrés prenatal poseen conductas ansiosas.



**Fig.22: Respuesta motora y comportamientos ansiosos en los individuos EP:** Individuos adultos EP fueron sometidos a un análisis de la actividad motora y del comportamiento ansioso. Se aprecia que los individuos EP poseen una mayor locomoción total (A), mayor cantidad de levantadas en 2 patas (B) y menor tiempo en el brazo abierto del laberinto en cruz elevado (C)

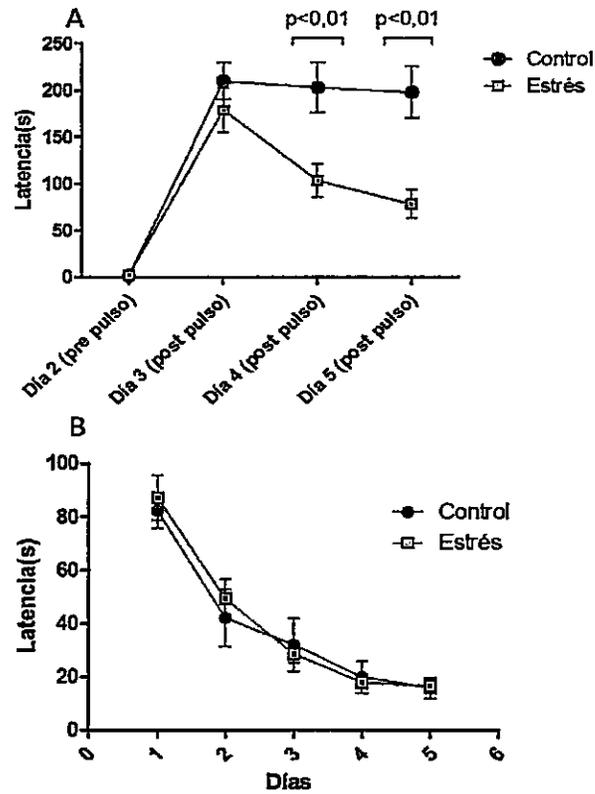
### 8.9 Respuesta de los individuos EP frente a pruebas de memoria y aprendizaje asociado a eventos de condicionamiento adverso.

Finalmente, se estudió las consecuencias sobre el aprendizaje y la memoria de sufrir estrés gestacional. Para esto se realizaron los test de “Evitación Pasiva” y el “Laberinto de Morris”. En el test “Evitación pasiva”, se observó que previo al pulso eléctrico, las ratas de ambos grupos ingresaban libremente a la cámara oscura, y el tiempo que demoraban en ingresar no sobrepasaba los 10 segundos. El día posterior al pulso eléctrico, las ratas demoraron sustancialmente más tiempo en ingresar a la cámara oscura, sin diferencias significativas entre grupos. Hay casos en donde las ratas ni siquiera entraron en los primeros 5 minutos, tiempo necesario para dar por finalizado el experimento. El día 4 (post-pulso), las ratas Controles continuaron demorando la misma cantidad de tiempo en ingresar a la cámara oscura, sin embargo las ratas del grupo EP comenzaron a ingresar un 96% más rápido, conducta atribuida a la no consolidación de

la memoria (Fig.23A, Control:  $202.8 \pm 26.9$  (seg), EP:  $103.4 \pm 17.6$  (seg), N=9,  $P<0,01$ ). Al cabo de 3 días luego del pulso eléctrico, las diferencias entre grupos se volvieron más significativas aún, en donde las ratas EP ingresaron un 152% más rápido que las ratas Controles. Cabe destacar que las ratas Controles continuaron demorándose la misma cantidad de tiempo, y que esta variación se debió exclusivamente a las ratas EP (Fig.23A, Control:  $197.7 \pm 27.5$  (seg), EP:  $78.22 \pm 15.2$  (seg), N=9,  $P<0,01$ ).

Con respecto al laberinto de Morris, se apreció que a medida que pasaron los días de entrenamiento, ambos grupos demoraron menos tiempo en encontrar la balsa. Esta disminución no es diferencial entre grupos, ya que el día 1 los individuos de ambos grupos demoraron alrededor de 80 segundos en encontrar la balsa y, tras 5 días de entrenamiento, tanto el grupo Control como el grupo EP lograron encontrar la plataforma en un tiempo promedio de 20 segundos (Fig.23B).

Finalmente, se logró concluir que los individuos estresados prenatalmente tienen deficiencias la consolidación de la memoria en situaciones de condicionamiento aversivo, pero no se apreciaron falencias en la memoria espacial.



**Fig.23: Consolidación de la memoria y memoria visuo-espacial de individuos adultos EP.** Se realizó el test de evitación pasiva y laberinto de Morris. Se apreció una falla en la consolidación del aprendizaje y memoria en los individuos EP, luego de recibir un pulso eléctrico (A), de manera análoga no se apreciaron diferencias significativas en la memoria visuo-espacial, dado por la búsqueda de la balsa en el laberinto de Morris (B).

## 9. DISCUSIÓN

Reelina es producida principalmente en la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo (Curran and D'Arcangelo, 1998), y se ha descrito que disfunciones de esta proteína en la corteza están involucradas en enfermedades como la depresión, desórdenes bipolares y esquizofrenia (Guidotti et al., 2000). Esta región regula y modula la mayoría de las funciones cognitivas superiores, las cuales están generalmente

afectadas en las enfermedades neuropsiquiátricas (Miller and Cohen, 2001). Además, muchos estudios evidencian la conexión entre la amígdala, que es el principal sensor de las experiencias estresantes (Gray and Bingaman, 1996) y la corteza cerebral, de este modo, información proveniente de la amígdala puede afectar la estructura y función cortical (Arnsten, 2009). El mecanismo molecular subyacente a dichos desórdenes aún se mantiene incierto, sin embargo se demostró que ratas estresadas prenatalmente presentan una disminución en la versión inactiva de Gsk3- $\beta$  en la corteza frontal, pero no en el hipocampo, sugiriendo que sólo la corteza está siendo afectada por los efectos patogénicos de esta proteína (Szymanska et al., 2009).

Debido a estas evidencias, el presente estudio estuvo centrado principalmente en la corteza cerebral. El objetivo principal fue evaluar los efectos del EP en la expresión de Reelina y actividad de Cdk5 de ratas E20 y en un modelo *in vitro*, por un lado. Por otro lado, se realizaron pruebas motoras, de memoria y aprendizaje con el fin de identificar los efectos a largo plazo del EP.

Los resultados indican que el EP provoca los siguientes efectos en la corteza de ratas E20: 1) Disminución en los niveles de Reelina; 2) Aumento en los niveles de mDab1; 3) Disminución en la actividad de Cdk5, y los siguientes efectos en ratas adultas: 4) Alteraciones en la respuesta motora y aumento en las conductas ansiosas; 5) Deficiencias en consolidación de la memoria asociado a situaciones adversas. Además, los puntos 1,2 y 3, fueron reproducidos *in vitro*, modelo en el cual las diferencias se vieron más exacerbadas.

### **9.1 Efectos del estrés prenatal en la expresión de Reelina, mDab1 y en la actividad de Cdk5 *in vivo*.**

El análisis de la inmunohistoquímica reveló una clara disminución de Reelina en la capa I de la corteza de ratas E20, la disminución fluctuó entre los 50-80%, dependiendo de la zona analizada (Fig.13). Este resultado fue corroborado mediante Western blot, sin embargo la diferencia fue muchos menos marcada (Fig.14B). Esto podría deberse a diferencias en la sensibilidad de la técnica o porque en los experimentos de inmunohistoquímica sólo se analizó la capa I, a diferencia de los Western blot en donde se utilizó la corteza completa. Teniendo en cuenta que en el estadio E20 la producción de Reelina se limita en gran parte a la capa I (Alcantara et al., 1998), el haber considerado toda la corteza puede haber atenuado las diferencias. Además, en el análisis de la inmunohistoquímica sólo se consideraron positivas, las células que tuvieran una marca clara e intensa (Fig.12E-F), de este modo, muchas células que poseían marca tenue fueron descartadas para disminuir la posibilidad de falsos positivos. Tras este resultado, se podría predecir la ocurrencia de dos cosas. 1) La disminución sitio específica de Reelina podría provocar una clara inversión de las capas corticales. 2) Las capas corticales se mantienen bien organizadas, sin embargo ocurriría fallas en la consolidación de las conexiones sinápticas.

Analizando la anatomía de los tejidos, se observa que a pesar que los animales EP poseen una disminución de Reelina en las neuronas de CR, la laminación cortical aparece normal en ellos (Fig.12). Esto se contrapone a lo observado en el animal Reeler, el cual presenta una clara desorganización de las capas corticales (Fig.4) (Gupta et al., 2002). Nuestro modelo está más cerca de imitar al heterocigoto Reeler, que presenta

50% menos de Reelina y un fenotipo neuroanatómico intermedio en relación al homocigoto Reeler, sin presentar una disrupción en la laminación cortical. (Pappas et al., 2001; Badea et al., 2007). De este modo, aunque no existan fallas en la laminación cortical, es posible que las conexiones sinápticas estén alteradas, lo cual se podría ver evidenciado en experimentos de microscopía electrónica (no realizado en este trabajo) o en experimentos conductuales que impliquen consolidación de memoria y aprendizaje (a discutirse mas adelante).

La disminución de Reelina producto del estrés se explicaría por un mecanismo epigenético, dado principalmente por un aumento en la metilación global del ADN (Tsankova et al., 2007) y en particular de su promotor (Qin et al., 2011), acompañado por la disminución de factores de transcripción implicados en su síntesis como Nf- $\kappa$ B y Pax-6 (Auphan et al., 1995; Gesina et al., 2004). Si bien estas evidencias apoyan nuestra hipótesis y resultados, éstos se contraponen con lo demostrado por (Lussier et al., 2009), trabajo en el cual concluyen que el estrés por inmovilización no produce una disminución en las células positivas para Reelina en el hipocampo de ratas adultas. La explicación a estos resultados contrapuestos podría darse a través de evidencias que demuestran que los efectos de los glucocorticoides y el estrés no son homogéneos en todo el cerebro, siendo éstos en muchos casos opuestos entre la corteza y el hipocampo. Un ejemplo de esto es la respuesta del BDNF frente a agentes estresantes que provocan la liberación de GC, el cual disminuye en el hipocampo (Smith et al., 1995; Jacobsen and Mork, 2006), aumenta en la glándula pineal (Dagnino-Subiabre et al., 2006) y en la corteza aumenta según algunos autores (Bland et al., 2005) y disminuye según otros (Issa et al., 2010). Tomando el último dato sobre el BDNF en la corteza, cabe mencionar que se demostró que un aumento progresivo de BDNF en los primeros días

post-natales, va acompañado con la desaparición de las células positivas para Reelina (Ringstedt et al., 1998), de este modo, un aumento indiscriminado de este factor de crecimiento durante el desarrollo, provocado por experiencias estresantes (Bland et al., 2005), podría favorecer la disminución de la glicoproteína. Sin embargo, estos datos aún no pueden consolidarse como una explicación a los eventos observados debido a la falta de consenso respecto a los efectos de los GC sobre la expresión de BDNF en la corteza.

Siguiendo la ruta de señalización de Reelina y con el fin de corroborar los efectos del EP, se analizó la expresión de mDab1, proteína que sufre múltiples fosforilaciones en tirosina dependientes de Reelina (Gonzalez-Billault et al., 2005) y media una serie de funciones como se aprecia en la figura 5A. Nuestros resultados muestran un aumento de mDab1 en los individuos EP (Fig.14C). En el 2004 (Bock et al., 2004) demostró que mDab1 sufre degradación mediada por proteosoma luego de ser activada por Reelina, como mecanismo de apagamiento de la señal. Además, al agregar Reelina por 6 horas a neuronas en cultivo, se logró apreciar la desaparición casi por completo de mDab1 (Fig.15). Esta información es congruente con los datos obtenidos, pues los individuos EP que poseen menos Reelina mantendrían niveles de mDab1 menos fosforilados y por ende ésta no iría a degradación y se acumularía, que es precisamente lo que apreciamos. El aumento en los niveles de mDab1 en conjunto con la disminución de Reelina, indican y reafirman que la ruta mediada por Reelina efectivamente se está viendo afectada, y de manera negativa. Esto favorece la hipótesis sobre la falla en la conectividad sináptica provocada por el EP y la baja de Reelina, dado que mDab1 contribuye y está directamente implicado en procesos de conectividad y plasticidad sináptica (ver Figura 5). Para hacer más consistente los efectos del EP sobre la ruta guiada por Reelina, se analizó la proteína quinasa Cdk5, la cual también

está directamente relacionada con la función sináptica y la modulación del citoesqueleto. En primera instancia se apreció una disminución en los niveles de p35 en los individuos EP (Fig.16C), lo cual es congruente con datos no publicados de nuestro laboratorio en donde se aprecia que adición de Reelina en neuronas en cultivo induce el aumento de los niveles de p35. Adicionalmente, ha sido previamente demostrado que tanto los factores de transcripción EGR-1 como CREB aumentan cuando la vía de Reelina está activa, y de este modo favorecen la producción de p35 (Simo et al., 2007; Diaz-Ruiz et al., 2008). De manera análoga, se demostró que la adición de GC genera un aumento en la expresión de EGR-1 en el hipocampo (Revest et al., 2005), lo cual estaría indicando que el estrés favorece la activación de Cdk5, contrarrestando nuestros resultados. Al igual que en el caso anterior, esta contraposición puede estar justificada por el efecto diferencial región específica de los GC, es decir, que lo que se observa en el hipocampo puede ser opuesto a lo que sucede en la corteza.

Dado que la cantidad de p35 está directamente ligada con la actividad de Cdk5 (Contreras-Vallejos et al., 2012; Utreras et al., 2012), la disminución de este factor nos sugiere fuertemente que la actividad de la quinasa podría estar afectada. Adicionalmente, se evaluaron los niveles de fosforilación de Tau, específicamente en su epítotope PHF-1, ya que se ha propuesto que este epítotope es dependiente de Cdk5 (Baumann et al., 1993). Sin embargo, los datos son variables, ya que algunos autores concluyen que la actividad de Cdk5 favorece la fosforilación de PHF-1 (Patrick et al., 1999), mientras que otros concluyen lo contrario (Hallows et al., 2003). Para poder saber cuál era la correlación entre Cdk5 y PHF-1 de manera más certera, se realizó un ensayo sobreactivando e inhibiendo la actividad de Cdk5 en células N2A, y se observaron los niveles de PHF-1. Apreciamos que a mayor actividad de Cdk5, se

observa una mayor cantidad de PHF-1, de manera análoga, inhibiendo la quinasa los niveles de PHF-1 disminuyen (Fig.17). Esto nos indica que efectivamente la fosforilación de Tau en PHF-1 es directamente proporcional a la actividad de Cdk5. Cuando analizamos los extractos corticales, no notamos diferencias significativas en la fosforilación de Tau comparando individuos EP con Control (Fig.18). Este resultado se puede discutir desde distintas perspectivas, en primer lugar, puede que el EP no afecte homogéneamente a cada una de las crías, por lo tanto, producto de la dispersión de datos es necesario un número mucho mayor de muestras para lograr ver un efecto más claro. En segunda instancia, la información existente indica que, si bien el epítipo PHF-1 es dependiente de Cdk5, no es exclusivo para esta quinasa. De esta forma, aunque la actividad de Cdk5 esté afectada, los resultados podrían estar enmascarados por la acción de otra quinasa, como por ejemplo Gsk3- $\beta$  (Liu et al., 2006). En conclusión, podemos decir que a pesar que las evidencias sugerían variaciones en la fosforilación de Tau, la cual demostró ser dependiente de Cdk5 (Fig.17), estas variaciones no se apreciaron.

Dado que los experimentos anteriores no lograron responder nuestra pregunta de manera consistente, se realizó un ensayo de actividad quinasa, en el cual se estudió la incorporación de fósforo 32 en Histona H1, mediado por Cdk5 que había sido previamente inmunoprecipitada. Los resultados mostraron una disminución de la actividad en los individuos EP, en comparación a los controles (Fig.19). Lo cual indica que la disminución de Reelina podría estar afectando componentes río abajo, como lo son quinasas como Cdk5, dado que estas quinasas son proteínas efectoras de los procesos que hemos venido mencionando como la modulación del citoesqueleto y sinapsis, podemos generar un vínculo directo entre un suceso como el estrés prenatal, su consecuencia más directa que en este caso sería la disminución de Reelina, y los efectos

en una proteína efectora como lo es Cdk5. Tras estas evidencias, pensar que los individuos EP podrían tener fallas en procesos que implican conectividad sináptica como memoria y aprendizaje, se hace mas posible.

## **9.2 Efectos del estrés prenatal en la expresión de Reelina, mDab1 y en la actividad de Cdk5 *in vitro*.**

A pesar que se demostró que el EP afecta la ruta guiada por Reelina, existen muchas moléculas efectoras que podrían ser importantes en dicho proceso. Con el fin de indagar con mayor detalle en el proceso propiamente tal, se elaboró un modelo *in vitro*, el cual es sumamente útil e innovador en el tema, favoreciendo un entendimiento mas completo y detallado del EP sobre la ruta de señalización de Reelina.

Como se ha mencionado a lo largo del trabajo, existen evidencias que señalan que Reelina se regula por metilación de su promotor. Se ha demostrado además que esta regulación también se da en neuronas corticales en cultivo celular, mediado específicamente por la enzima DNA metiltransferasa (Noh et al., 2005). Teniendo en cuenta esta evidencia y sabiendo que las metilaciones pueden ser modificaciones permanentes en el tiempo, incluso de una generación a otra, fue de interés realizar cultivos corticales con cerebros provenientes de animales EP, y analizar si los efectos se mantenían luego de 5 DIV. En todos los casos el efecto fue más marcado que lo apreciado *in vivo*, ya que incluso se lograron apreciar diferencias en la fosforilación de Tau. Esta exacerbación de los resultados puede deberse a que al momento de realizar el cultivo se utilizó toda la camada, lo cual incluye alrededor de 10 embriones, Considerando 3 camadas por condición alcanzamos un total de 30 embriones Controles y 30 EP, número bastante mayor que lo utilizado para los análisis de los extractos, que

eran alrededor de 10 por condición. El analizar toda la camada elimina el efecto “azar” de justo escoger una cría que no fue tan afectada por el EP, de esta forma, el efecto global del tratamiento se logra apreciar mucho más marcado. Esta aproximación nos da pie para pensar que los efectos que se producen en relación al estrés y la expresión de Reelina pueden mantenerse en el tiempo y afectar parámetros del individuo en distintos momentos de su desarrollo. Además, cabe destacar que es primera vez que se demuestra que el efecto del EP se mantiene en la placa de cultivo neuronal de corteza. Este experimento es fundamental en los estudios sobre estrés, ya que revela la permanencia del efecto luego del cultivo. A futuro se pueden realizar experimentos con uso de antagonistas de los receptores de Reelina y con Reelina exógena, además de posibilitar la observación de la morfología de dendritas, axones y conexiones sinápticas de individuos bajo el protocolo utilizado. Además, da pie a pensar que los efectos en el animal pueden ser mantenidos en el tiempo, razón por la cual la hipótesis propuesta sobre el EP y las falencias en la conectividad y plasticidad sináptica, podrían ser apreciadas en el individuo adulto estresado prenatalmente.

### **8.3 Impacto del EP en la actividad motora, memoria y aprendizaje**

Los efectos del EP en el cerebro en desarrollo, que posiblemente se mantienen en el tiempo de vida del individuo, se pueden ver explicitados en estudios conductuales. Dado que no se apreciaron falencias en la laminación cortical, los efectos diferenciales observados en individuos EP en relación a los Control, podrían deberse a falencias en las primeras conexiones sinápticas durante el desarrollo y a lo largo de la adquisición de experiencias durante la vida juvenil-adulta.

En concordancia con reportes previos, encontramos que las ratas EP muestran mayor actividad motora en comparación a los individuos Control, lo que incluye la exploración total de la zona y las levantadas en dos patas (Deminiere et al., 1992; Poltyrev et al., 1996; Lehmann et al., 2000; Ordyan and Pivina, 2003; Estanislau and Morato, 2006). Esto indica que el tiempo utilizado en el protocolo fue suficiente para producir cambios persistentes, que se manifiestan en el comportamiento de las ratas (Peters, 1986; Emack et al., 2008; Martinez-Tellez et al., 2009). En el laberinto en cruz elevado, los animales EP mostraron un comportamiento ansioso, pasando menos tiempo en el brazo abierto. Esto es consistente con estudios anteriores que indican que el EP es un generador de comportamientos ansiosos cuando las ratas son expuestas a lugares nuevos (Poltyrev et al., 1996; Vallee et al., 1997; Richardson et al., 2006; Baker et al., 2009). En este caso los circuitos involucrados en la motivación, miedo y ansiedad se encuentran afectados (Circuitos Corteza-Amígdala), razón por la cual el individuo presenta las conductas previamente descritas.

La evaluación de la memoria y aprendizaje mostró que ambos grupos lograron condicionarse en el test de evitación pasiva. Sin embargo, contrario al grupo Control, los individuos EP fueron incapaces de retener el condicionamiento luego de 4 a 5 días post-pulso eléctrico, indicando deficiencias en la consolidación de la memoria. Si bien los individuos lograron adquirir el conocimiento de la experiencia dolorosa luego de recibir un pulso eléctrico de pie, al pasar los días, olvidaron que el hecho de entrar a la cámara oscura podría producirles una sensación adversa, razón por la cual comenzaron a ingresar casi normalmente (Fig.23A). Cuando comparamos la memoria visuo-espacial a través del laberinto de Morris, apreciamos que no se observaron diferencias entre los grupos, los individuos de ambos grupos lograron encontrar la balsa en menor tiempo a

medida que aumentaban los entrenamientos. Existe información dispareja con respecto a este punto, ya que mientras algunos autores no observan diferencias significativas en la memoria y aprendizaje espacial (Vallee et al., 1997; Aleksandrov et al., 2001; Uygur and Arslan, 2010), otros autores indican que sí existe una incapacidad en la adquisición de este parámetro (Meek et al., 2000; Yang et al., 2006; Hosseini-Sharifabad and Hadinedoushan, 2007; Wu et al., 2007; Lui et al., 2011). Estas diferencias se pueden explicar principalmente por diferencias metodológicas que incluyen tiempos y tipos de estrés y periodos gestacionales en los cuales se aplican. A pesar que solo se aprecian efectos en el test de "Evitación pasiva", las falencias en la consolidación del aprendizaje hacia una memoria establecida, sugieren que circuitos de la corteza-hipocampo pueden estar afectados o no conectando de manera correcta. Este resultado se puede correlacionar directamente con la falencia en la ruta guiada por Reelina, falencias que incluyen una menor activación de mDab1 y una disminución de la actividad de Cdk5, ambas dos implicadas en procesos de sinapsis.

Existen resultados difusos respecto a los efectos conductuales que causa la falta de Reelina, algunos autores proponen al ratón heterocigoto de Reelina como modelo de estudio para enfermedades neuropsiquiátricas, ya que posee características y comportamiento acorde a los observado para dichas patologías, sin embargo, otros autores no aprecian diferencias a lo que respecta las conductas ansiosas, problemas en la actividad motora y el aprendizaje (Salinger et al., 2003; Teixeira et al., 2011). Por otro lado, en muchos estudios correlacionan la falta de Reelina con la predisposición a adquirir una enfermedad, es decir, aparentemente la exclusiva falta de Reelina no provocaría efectos evidentes, sin embargo luego de sufrir algún evento estresante a lo largo de la vida, se produciría un desequilibrio que desemboca en un fenotipo de tipo

patológico (Laviola et al., 2009; Lussier et al., 2011). Un modelo que explica esta propuesta, es el modelo de “Dos eventos” (Two hits), este modelo propone que factores genéticos o ambientales podrían afectar el sistema nervioso central durante su desarrollo, actuando como un “primer evento”. Dichos desórdenes tempranos podrían mantenerse a largo plazo hasta que un “segundo evento” desencadene los síntomas de una enfermedad (Maynard et al., 2001; Girirajan et al., 2010). Para enfermedades como la depresión, autismo y esquizofrenia, el ratón heterocigoto Reeler ha sido utilizado como el “primer evento”, mientras que situaciones estresantes luego del nacimiento o en la adultez son propuestas como el “segundo evento”. Los resultados indican que el ratón heterocigoto Reeler con privación materna o inyecciones de corticosterona, muestra un aumento en comportamientos de tipo depresivo o esquizofrénico (Laviola et al., 2009; Lussier et al., 2011). Por su parte el heterocigoto Reeler en ausencia del evento estresante posee un fenotipo indistinguible de los animales Control (Teixeira et al., 2011). En nuestro modelo, el EP y sus efectos sobre proteínas del citoesqueleto, estarían actuando como el “primer evento” mientras que algún suceso estresante en la adultez podría actuar como “segundo evento”. Mediante esta observación podemos sustentar nuestros resultados en el test de evitación pasiva, en donde los ratones EP luego de sufrir un pulso eléctrico, situación que le causa dolor y miedo, manifiestan deficiencias en la consolidación de la memoria. Parte de la hipótesis de este trabajo era que la disminución de Reelina se acompañaba en una disminución en la actividad de Cdk5, de este modo se planteaba que los problemas de ansiedad, memoria y aprendizaje eran provocados por una disminución de Reelina, proceso que se conectaba a través de una disfunción en la actividad de Cdk5. Además, existe la posibilidad que los sucesos observados estén mediados por otras quinasas como GSK3- $\beta$ , cuya actividad esta

exacerbada en un contexto con alta cantidad de Reelina (Gonzalez-Billault et al., 2005), además de estar involucrada en procesos de ansiedad, memoria y enfermedades siquiátricas (Polter et al., 2010).

De esta forma, proponemos que el EP, a través de la disminución de Reelina, podría estar causando problemas sobre: 1) La dinámica del citoesqueleto, provocando así “errores” en la conectividad neuronal desde las primeras etapas del desarrollo. Estas anomalías podrían en primer lugar, mantenerse en el tiempo, provocando comportamientos del tipo ansioso y depresogénico y, en segundo lugar, favorecer que producto de otro evento estresante se genere algún desorden mayor como el desencadenamiento de una enfermedad neuropsiquiátrica. 2) La sinapsis, dado que mDab1 esta menos activo y se disminuye el tráfico de receptores NMDA y AMPA a la membrana post-sináptica y la translocación nuclear de CREB, desfavoreciendo así la plasticidad sináptica.

## **10 CONCLUSIÓN, MODELO PROPUESTO Y PROYECCIONES**

En el presente trabajo se evaluó el efecto del EP en la expresión de Reelina, mDab1 y en la actividad de Cdk5; se estudió si dichos efectos eran mantenidos en un modelo *in vitro* y finalmente, se analizó si el EP causaba efectos a largo plazo, alterando así parámetros motores, de memoria y aprendizaje. Los resultados revelaron una disminución de Reelina en la capa I de la corteza, acompañado de un aumento en los niveles de mDab1 y una disminución en la actividad de Cdk5. Además, todos estos efectos lograron ser reproducidos en un modelo *in vitro*. Por último, se demostró que individuos EP poseían conductas de tipo ansiosas y fallaban en la consolidación de la

memoria y aprendizaje asociada a un condicionamiento por pulso eléctrico, no se apreciaron diferencias en la memoria visuo-espacial.

Utilizando nuestros resultados en conjunto a la literatura, se propone el siguiente modelo: El EP genera un aumento en los niveles de CRH y corticosterona en el embrión (Charil et al., 2010), provocando una disminución de Reelina en la capa 1 de la corteza a través de un mecanismo epigenético que incluye metilación del promotor (Noh et al., 2005; Kundakovic et al., 2007), acetilación de histonas (Mitchell et al., 2005) y disminución en la expresión de factores de transcripción (Auphan et al., 1995; Gesina et al., 2004; Noh et al., 2005). Producto de la disminución en los niveles de Reelina, la proteína mDab1 se activa menos, razón por la cual no se va a degradación y se acumula. Estos dos sucesos desencadenan la inhibición de una ruta de señalización que termina con problemas en la dinámica del citoesqueleto de actina y microtúbulos (Gupta et al., 2002). Uno de los elementos que se ve afectado en esta ruta de señalización es la quinasa Cdk5, ya que producto de la disminución de Reelina, su activador endógeno p35 disminuye, alterando así su actividad. Todos estos efectos en conjunto desencadenan una desorganización y mala conectividad dendrítica en las primeras etapas del desarrollo, lo cual se mantiene hasta estadios adultos causando comportamientos ansiosos y deficiencias en la consolidación de la memoria (Fig.24).

Las proyecciones de este trabajo son poder relacionar más directamente la disminución de Reelina provocada por el EP, con las deficiencias de memoria y aprendizaje observadas en los individuos adultos. Para esto es necesario entrar en los mecanismos más específicos que podrían estar mediando dichos procesos. Entre las cosas que se pueden realizar encontramos los análisis de la morfología de las neuronas

EP, ensayos de recuperación de fenotipo y análisis de otras proteínas involucradas en la ruta de Reelina y que cumplen funciones en el desarrollo dendrítico y axonal, experimentos fácilmente desarrollables con la metodología *in vitro* que se desarrolló.

Para finalizar me gustaría mencionar, que a mi parecer este modelo es fácilmente extrapolable a un modelo humano, ya que el estrés por inmovilización replica dos aspectos muy evidentes de la vida cotidiana humana. 1) El hecho de sentirse sin escapatoria, en la cual los problemas son mayores que las soluciones y a pesar de buscar alternativas uno se encuentra sin salida, y atrapado por una rutina. Situaciones de este tipo son sin duda de las razones de estrés mayoritarias del ser humano hoy en día, a grandes rasgos el ratón inmovilizado tiene la misma esperanza de salir de su jaula que la persona de su realidad. 2) Diariamente gran parte de los trabajadores viaja al menos 45 minutos en la mañana y en la tarde en el Metro de Santiago, el cual generalmente te limita a un metro cuadrado o menos para poder moverte, este suceso es prácticamente lo mismo que la rata enjaulada, y más aún genera un efecto mayor ya que el ser humano es más consciente que la rata de su situación, por lo cual sus niveles de estrés pueden aumentar significativamente.

Si a esto le sumamos que el permiso prenatal de Chile es de alrededor de 45 días, y que hasta ese momento gran parte del cerebro del bebe ya se ha formado, la madre embarazada y el embrión convivirán durante todo el embarazo y desarrollo del cerebro con los 2 puntos previamente mencionados, y de esta forma algunas de los resultados vistos en este seminario podrían darse en un humano bajo estas condiciones. Es así como aparentemente muchos jóvenes nacen sanos, sin embargo a mediados de su juventud o luego de algún evento estresante (Modelo de "Dos eventos"), se le

desencadena una esquizofrenia, trastorno nervioso, depresión, etc. Los resultados de este seminario de título, aportan evidencias científicas y extrapolables de los graves efectos del EP sobre el desarrollo cerebral del individuo en gestación, y las consecuencias en la juventud que estos efectos traen consigo. Sumado a éstas, existen bastantes evidencias que aportan información similar, y en conjunto con las evidencias futuras, mi intención es modificar los sistemas de legislación con el fin de evitar que niños que al parecer son sanos, posean altas posibilidades de falencias siquiátricas y cognitivas. Cuidar la gestación es clave para que todos los seres que nacen tengan la misma posibilidad de enfrentarse al mundo, y sean igualmente competentes que sus pares.

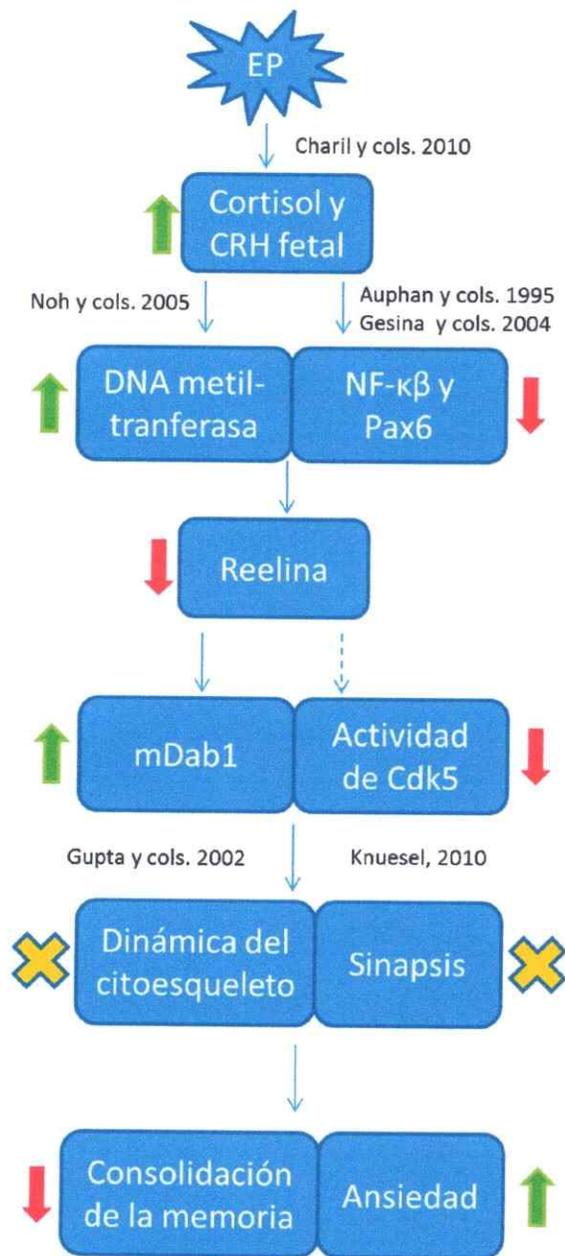


Fig.24: Modelo propuesto investigación realizada.

## 11 REFERENCIAS

1. Abdolmaleky, H. M., Cheng, K. H., Russo, A., Smith, C. L., Faraone, S. V., Wilcox, M., Shafa, R., Glatt, S. J., Nguyen, G., Ponte, J. F. et al. (2005) 'Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report', *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 134B(1): 60-6.
2. Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C. and Soriano, E. (1998) 'Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse', *J Neurosci* 18(19): 7779-99.
3. Aleksandrov, A. A., Polyakova, O. N. and Batuev, A. S. (2001) 'The effects of prenatal stress on learning in rats in a Morris maze', *Neurosci Behav Physiol* 31(1): 71-4.
4. Andrus, B. M., Blizinsky, K., Vedell, P. T., Dennis, K., Shukla, P. K., Schaffer, D. J., Radulovic, J., Churchill, G. A. and Redei, E. E. (2010) 'Gene expression patterns in the hippocampus and amygdala of endogenous depression and chronic stress models', *Mol Psychiatry*.
5. Arnsten, A. F. (2009) 'Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function', *Nat Rev Neurosci* 10(6): 410-22.
6. Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmborg, A. and Karin, M. (1995) 'Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis', *Science* 270(5234): 286-90.
7. Badea, A., Nicholls, P. J., Johnson, G. A. and Wetsel, W. C. (2007) 'Neuroanatomical phenotypes in the reeler mouse', *Neuroimage* 34(4): 1363-74.
8. Baker, S., Rees, S., Chebli, M., Lemarec, N., Godbout, R., Huta, V. and Bielajew, C. (2009) 'Effects of gestational stress: 2. Evaluation of male and female adult offspring', *Brain Res* 1302: 194-204.
9. Ballif, B. A., Arnaud, L., Arthur, W. T., Guris, D., Imamoto, A. and Cooper, J. A. (2004) 'Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 pathway in Reelin-stimulated neurons', *Curr Biol* 14(7): 606-10.
10. Baquedano, E., Garcia-Caceres, C., Diz-Chaves, Y., Lagunas, N., Calmarza-Font, I., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L. M., Argente, J., Chowen, J. A. and Frago, L. M. (2011) 'Prenatal stress induces long-term effects in cell turnover in the hippocampus-hypothalamus-pituitary axis in adult male rats', *PLoS One* 6(11): e27549.
11. Barros, V. G., Duhalde-Vega, M., Caltana, L., Brusco, A. and Antonelli, M. C. (2006) 'Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain', *J Neurosci Res* 83(5): 787-800.
12. Baumann, K., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Piwnicka-Worms, H. and Mandelkow, E. (1993) 'Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5', *FEBS Lett* 336(3): 417-24.
13. Bibb, J. A., Snyder, G. L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, A. A., Tsai, L. H., Kwon, Y. T., Girault, J. A., Czernik, A. J. et al. (1999) 'Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons', *Nature* 402(6762): 669-71.
14. Bland, S. T., Schmid, M. J., Der-Avakian, A., Watkins, L. R., Spencer, R. L. and Maier, S. F. (2005) 'Expression of c-fos and BDNF mRNA in subregions of the prefrontal cortex of male and female rats after acute uncontrollable stress', *Brain Res* 1051(1-2): 90-9.
15. Bock, H. H., Jossin, Y., May, P., Bergner, O. and Herz, J. (2004) 'Apolipoprotein E receptors are required for reelin-induced proteasomal degradation of the neuronal adaptor protein Disabled-1', *J Biol Chem* 279(32): 33471-9.

16. Bogoch, Y., Biala, Y. N., Linial, M. and Weinstock, M. (2007) 'Anxiety induced by prenatal stress is associated with suppression of hippocampal genes involved in synaptic function', *J Neurochem* 101(4): 1018-30.
17. Borrell, V., Del Rio, J. A., Alcantara, S., Derer, M., Martinez, A., D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Derer, P., Curran, T. et al. (1999) 'Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections', *J Neurosci* 19(4): 1345-58.
18. Bose, M., Munoz-Llancao, P., Roychowdhury, S., Nichols, J. A., Jakkamsetti, V., Porter, B., Byrapureddy, R., Salgado, H., Kilgard, M. P., Aboitiz, F. et al. (2010) 'Effect of the environment on the dendritic morphology of the rat auditory cortex', *Synapse* 64(2): 97-110.
19. Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem* 72: 248-54.
20. Calabrese, F., Molteni, R., Racagni, G. and Riva, M. A. (2009) 'Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders', *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1: S208-16.
21. Canny, B. J., Funder, J. W. and Clarke, I. J. (1989) 'Glucocorticoids regulate ovine hypophysial portal levels of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin in a stress-specific manner', *Endocrinology* 125(5): 2532-9.
22. Coe, C. L., Kramer, M., Czeh, B., Gould, E., Reeves, A. J., Kirschbaum, C. and Fuchs, E. (2003) 'Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys', *Biol Psychiatry* 54(10): 1025-34.
23. Contreras-Vallejos, E., Utreras, E. and Gonzalez-Billault, C. (2012) 'Going out of the brain: non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5', *Cell Signal* 24(1): 44-52.
24. Costa, E., Davis, J., Pesold, C., Tueting, P. and Guidotti, A. (2002) 'The heterozygote reeler mouse as a model for the development of a new generation of antipsychotics', *Curr Opin Pharmacol* 2(1): 56-62.
25. Cruz-Orive, L. M. and Weibel, E. R. (1990) 'Recent stereological methods for cell biology: a brief survey', *Am J Physiol* 258(4 Pt 1): L148-56.
26. Curran, T. and D'Arcangelo, G. (1998) 'Role of reelin in the control of brain development', *Brain Res Brain Res Rev* 26(2-3): 285-94.
27. Chai, X., Forster, E., Zhao, S., Bock, H. H. and Frotscher, M. (2009) 'Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3', *J Neurosci* 29(1): 288-99.
28. Charil, A., Laplante, D. P., Vaillancourt, C. and King, S. (2010) 'Prenatal stress and brain development', *Brain Res Rev* 65(1): 56-79.
29. Chen, J., Zhang, Y., Kelz, M. B., Steffen, C., Ang, E. S., Zeng, L. and Nestler, E. J. (2000) 'Induction of cyclin-dependent kinase 5 in the hippocampus by chronic electroconvulsive seizures: role of [Delta]FosB', *J Neurosci* 20(24): 8965-71.
30. Chen, Y., Beffert, U., Ertunc, M., Tang, T. S., Kavalali, E. T., Bezprozvanny, I. and Herz, J. (2005) 'Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons', *J Neurosci* 25(36): 8209-16.
31. Chen, Y., Sharma, R. P., Costa, R. H., Costa, E. and Grayson, D. R. (2002) 'On the epigenetic regulation of the human reelin promoter', *Nucleic Acids Res* 30(13): 2930-9.
32. Chin, J., Massaro, C. M., Palop, J. J., Thwin, M. T., Yu, G. Q., Bien-Ly, N., Bender, A. and Mucke, L. (2007) 'Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease', *J Neurosci* 27(11): 2727-33.

33. Chrousos, G. P. and Gold, P. W. (1992) 'The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis', *JAMA* 267(9): 1244-52.
34. D'Arcangelo, G., Miao, G. G. and Curran, T. (1996) 'Detection of the reelin breakpoint in reeler mice', *Brain Res Mol Brain Res* 39(1-2): 234-6.
35. Dagnino-Subiabre, A., Zepeda-Carreno, R., Diaz-Veliz, G., Mora, S. and Aboitiz, F. (2006) 'Chronic stress induces upregulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and integrin alpha5 expression in the rat pineal gland', *Brain Res* 1086(1): 27-34.
36. Dayan, J., Creveuil, C., Dreyfus, M., Herlicoviez, M., Baleyte, J. M. and O'Keane, V. (2010) 'Developmental model of depression applied to prenatal depression: role of present and past life events, past emotional disorders and pregnancy stress', *PLoS One* 5(9): e12942.
37. Deminiere, J. M., Piazza, P. V., Guegan, G., Abrous, N., Maccari, S., Le Moal, M. and Simon, H. (1992) 'Increased locomotor response to novelty and propensity to intravenous amphetamine self-administration in adult offspring of stressed mothers', *Brain Res* 586(1): 135-9.
38. DeSilva, U., D'Arcangelo, G., Braden, V. V., Chen, J., Miao, G. G., Curran, T. and Green, E. D. (1997) 'The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7', *Genome Res* 7(2): 157-64.
39. Dhavan, R. and Tsai, L. H. (2001) 'A decade of CDK5', *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10): 749-59.
40. Diaz-Ruiz, C., Parlato, R., Aguado, F., Urena, J. M., Burgaya, F., Martinez, A., Carmona, M. A., Kreiner, G., Bleckmann, S., Del Rio, J. A. et al. (2008) 'Regulation of neural migration by the CREB/CREM transcription factors and altered Dab1 levels in CREB/CREM mutants', *Mol Cell Neurosci* 39(4): 519-28.
41. Emack, J., Kostaki, A., Walker, C. D. and Matthews, S. G. (2008) 'Chronic maternal stress affects growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal function in juvenile offspring', *Horm Behav* 54(4): 514-20.
42. Estanislau, C. and Morato, S. (2006) 'Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects', *Int J Dev Neurosci* 24(4): 255-62.
43. Fatemi, S. H., Earle, J. A. and McMenomy, T. (2000) 'Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression', *Mol Psychiatry* 5(6): 654-63, 571.
44. Fletcher, A. I., Shuang, R., Giovannucci, D. R., Zhang, L., Bittner, M. A. and Stuenkel, E. L. (1999) 'Regulation of exocytosis by cyclin-dependent kinase 5 via phosphorylation of Munc18', *J Biol Chem* 274(7): 4027-35.
45. Frotscher, M. (1997) 'Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development', *Cell Tissue Res* 290(2): 315-22.
46. Fu, A. K., Fu, W. Y., Cheung, J., Tsim, K. W., Ip, F. C., Wang, J. H. and Ip, N. Y. (2001) 'Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction', *Nat Neurosci* 4(4): 374-81.
47. Fujioka, A., Fujioka, T., Ishida, Y., Maekawa, T. and Nakamura, S. (2006) 'Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons', *Neuroscience* 141(2): 907-15.
48. Gesina, E., Tronche, F., Herrera, P., Duchene, B., Tales, W., Czernichow, P. and Breant, B. (2004) 'Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development', *Diabetes* 53(9): 2322-9.
49. Girirajan, S., Rosenfeld, J. A., Cooper, G. M., Antonacci, F., Siswara, P., Itsara, A., Vives, L., Walsh, T., McCarthy, S. E., Baker, C. et al. (2010) 'A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay', *Nat Genet* 42(3): 203-9.

50. Goffinet, A. M., So, K. F., Yamamoto, M., Edwards, M. and Caviness, V. S., Jr. (1984) 'Architectonic and hodological organization of the cerebellum in reeler mutant mice', *Brain Res* 318(2): 263-76.
51. Gonzalez-Billault, C., Del Rio, J. A., Urena, J. M., Jimenez-Mateos, E. M., Barallobre, M. J., Pascual, M., Pujadas, L., Simo, S., Torre, A. L., Gavin, R. et al. (2005) 'A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration', *Cereb Cortex* 15(8): 1134-45.
52. Gray, T. S. and Bingaman, E. W. (1996) 'The amygdala: corticotropin-releasing factor, steroids, and stress', *Crit Rev Neurobiol* 10(2): 155-68.
53. Grayson, D. R., Chen, Y., Costa, E., Dong, E., Guidotti, A., Kundakovic, M. and Sharma, R. P. (2006) 'The human reelin gene: transcription factors (+), repressors (-) and the methylation switch (+/-) in schizophrenia', *Pharmacol Ther* 111(1): 272-86.
54. Green, M. K., Rani, C. S., Joshi, A., Soto-Pina, A. E., Martinez, P. A., Frazer, A., Strong, R. and Morilak, D. A. (2011) 'Prenatal stress induces long term stress vulnerability, compromising stress response systems in the brain and impairing extinction of conditioned fear after adult stress', *Neuroscience* 192: 438-51.
55. Guidotti, A., Auta, J., Davis, J. M., Di-Giorgi-Gerevini, V., Dwivedi, Y., Grayson, D. R., Impagnatiello, F., Pandey, G., Pesold, C., Sharma, R. et al. (2000) 'Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study', *Arch Gen Psychiatry* 57(11): 1061-9.
56. Gupta, A., Tsai, L. H. and Wynshaw-Boris, A. (2002) 'Life is a journey: a genetic look at neocortical development', *Nat Rev Genet* 3(5): 342-55.
57. Hallows, J. L., Chen, K., DePinho, R. A. and Vincent, I. (2003) 'Decreased cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activity is accompanied by redistribution of cdk5 and cytoskeletal proteins and increased cytoskeletal protein phosphorylation in p35 null mice', *J Neurosci* 23(33): 10633-44.
58. Hellwig, S., Hack, I., Kowalski, J., Brunne, B., Jarowyj, J., Unger, A., Bock, H. H., Junghans, D. and Frotscher, M. (2011) 'Role for Reelin in neurotransmitter release', *J Neurosci* 31(7): 2352-60.
59. Herz, J. and Chen, Y. (2006) 'Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity', *Nat Rev Neurosci* 7(11): 850-9.
60. Holmes, A. and Wellman, C. L. (2009) 'Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents', *Neurosci Biobehav Rev* 33(6): 773-83.
61. Hosseini-Sharifabad, M. and Hadinedoushan, H. (2007) 'Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus', *Anat Sci Int* 82(4): 211-7.
62. Issa, G., Wilson, C., Terry, A. V., Jr. and Pillai, A. (2010) 'An inverse relationship between cortisol and BDNF levels in schizophrenia: data from human postmortem and animal studies', *Neurobiol Dis* 39(3): 327-33.
63. Jacobsen, J. P. and Mork, A. (2006) 'Chronic corticosterone decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in the hippocampus, but not in the frontal cortex, of the rat', *Brain Res* 1110(1): 221-5.
64. Jossin, Y., Gui, L. and Goffinet, A. M. (2007) 'Processing of Reelin by embryonic neurons is important for function in tissue but not in dissociated cultured neurons', *J Neurosci* 27(16): 4243-52.
65. Jossin, Y., Ignatova, N., Hiesberger, T., Herz, J., Lambert de Rouvroit, C. and Goffinet, A. M. (2004) 'The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development', *J Neurosci* 24(2): 514-21.

66. Kawamura, T., Chen, J., Takahashi, T., Ichitani, Y. and Nakahara, D. (2006) 'Prenatal stress suppresses cell proliferation in the early developing brain', *Neuroreport* 17(14): 1515-8.
67. Knuesel, I. (2010) 'Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases', *Prog Neurobiol* 91(4): 257-74.
68. Kraszpulski, M., Dickerson, P. A. and Salm, A. K. (2006) 'Prenatal stress affects the developmental trajectory of the rat amygdala', *Stress* 9(2): 85-95.
69. Kundakovic, M., Chen, Y., Costa, E. and Grayson, D. R. (2007) 'DNA methyltransferase inhibitors coordinately induce expression of the human reelin and glutamic acid decarboxylase 67 genes', *Mol Pharmacol* 71(3): 644-53.
70. Lacor, P. N., Grayson, D. R., Auta, J., Sugaya, I., Costa, E. and Guidotti, A. (2000) 'Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is independent from neurotransmitter regulation', *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3556-61.
71. Lambert de Rouvroit, C., de Bergeyck, V., Cortvrindt, C., Bar, I., Eeckhout, Y. and Goffinet, A. M. (1999) 'Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase', *Exp Neurol* 156(1): 214-7.
72. Laviola, G., Ognibene, E., Romano, E., Adriani, W. and Keller, F. (2009) 'Gene-environment interaction during early development in the heterozygous reeler mouse: clues for modelling of major neurobehavioral syndromes', *Neurosci Biobehav Rev* 33(4): 560-72.
73. Lehmann, J., Stohr, T. and Feldon, J. (2000) 'Long-term effects of prenatal stress experiences and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes', *Behav Brain Res* 107(1-2): 133-44.
74. Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M. and Abrous, D. N. (2000) 'Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus', *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 11032-7.
75. Liu, F., Liang, Z., Shi, J., Yin, D., El-Akkad, E., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. and Gong, C. X. (2006) 'PKA modulates GSK-3beta- and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners', *FEBS Lett* 580(26): 6269-74.
76. Liu, W. S., Pesold, C., Rodriguez, M. A., Carboni, G., Auta, J., Lacor, P., Larson, J., Condie, B. G., Guidotti, A. and Costa, E. (2001) 'Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous reeler mouse', *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3477-82.
77. Lui, C. C., Wang, J. Y., Tain, Y. L., Chen, Y. C., Chang, K. A., Lai, M. C. and Huang, L. T. (2011) 'Prenatal stress in rat causes long-term spatial memory deficit and hippocampus MRI abnormality: differential effects of postweaning enriched environment', *Neurochem Int* 58(3): 434-41.
78. Lussier, A. L., Caruncho, H. J. and Kalynchuk, L. E. (2009) 'Repeated exposure to corticosterone, but not restraint, decreases the number of reelin-positive cells in the adult rat hippocampus', *Neurosci Lett* 460(2): 170-4.
79. Lussier, A. L., Romay-Tallon, R., Kalynchuk, L. E. and Caruncho, H. J. (2011) 'Reelin as a putative vulnerability factor for depression: examining the depressogenic effects of repeated corticosterone in heterozygous reeler mice', *Neuropharmacology* 60(7-8): 1064-74.
80. Martinez-Tellez, R. I., Hernandez-Torres, E., Gamboa, C. and Flores, G. (2009) 'Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring', *Synapse* 63(9): 794-804.
81. Matrisciano, F., Tueting, P., Dalal, I., Kadriu, B., Grayson, D. R., Davis, J. M., Nicoletti, F. and Guidotti, A. (2012) 'Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are

- associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice', *Neuropharmacology*.
82. Matsubara, M., Kusubata, M., Ishiguro, K., Uchida, T., Titani, K. and Taniguchi, H. (1996) 'Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions', *J Biol Chem* 271(35): 21108-13.
  83. Maynard, T. M., Sikich, L., Lieberman, J. A. and LaMantia, A. S. (2001) 'Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia', *Schizophr Bull* 27(3): 457-76.
  84. McEwen, B. S. (1999) 'Stress and hippocampal plasticity', *Annu Rev Neurosci* 22: 105-22.
  85. Meek, L. R., Burda, K. M. and Paster, E. (2000) 'Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning', *Physiol Behav* 71(5): 543-9.
  86. Michelsen, K. A., van den Hove, D. L., Schmitz, C., Segers, O., Prickaerts, J. and Steinbusch, H. W. (2007) 'Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress influence dendritic spine density and morphology in the rat medial prefrontal cortex', *BMC Neurosci* 8: 107.
  87. Miller, E. K. and Cohen, J. D. (2001) 'An integrative theory of prefrontal cortex function', *Annu Rev Neurosci* 24: 167-202.
  88. Mitchell, C. P., Chen, Y., Kundakovic, M., Costa, E. and Grayson, D. R. (2005) 'Histone deacetylase inhibitors decrease reelin promoter methylation in vitro', *J Neurochem* 93(2): 483-92.
  89. Murmu, M. S., Salomon, S., Biala, Y., Weinstock, M., Braun, K. and Bock, J. (2006) 'Changes of spine density and dendritic complexity in the prefrontal cortex in offspring of mothers exposed to stress during pregnancy', *Eur J Neurosci* 24(5): 1477-87.
  90. Mychasiuk, R., Ilnytsky, S., Kovalchuk, O., Kolb, B. and Gibb, R. (2011) 'Intensity matters: brain, behaviour and the epigenome of prenatally stressed rats', *Neuroscience* 180: 105-10.
  91. Nguyen, M. D., Lariviere, R. C. and Julien, J. P. (2001) 'Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions', *Neuron* 30(1): 135-47.
  92. Nikolic, M., Chou, M. M., Lu, W., Mayer, B. J. and Tsai, L. H. (1998) 'The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity', *Nature* 395(6698): 194-8.
  93. Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C. C., Sheldon, M. and D'Arcangelo, G. (2004) 'Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway', *Neuron* 41(1): 71-84.
  94. Niu, S., Yabut, O. and D'Arcangelo, G. (2008) 'The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons', *J Neurosci* 28(41): 10339-48.
  95. Noh, J. S., Sharma, R. P., Veldic, M., Salvacion, A. A., Jia, X., Chen, Y., Costa, E., Guidotti, A. and Grayson, D. R. (2005) 'DNA methyltransferase 1 regulates reelin mRNA expression in mouse primary cortical cultures', *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5): 1749-54.
  96. O'Rourke, N. A., Dailey, M. E., Smith, S. J. and McConnell, S. K. (1992) 'Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex', *Science* 258(5080): 299-302.
  97. Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagy, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H. and Mikoshiba, K. (1995) 'The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons', *Neuron* 14(5): 899-912.

98. Ohshima, T., Ward, J. M., Huh, C. G., Longenecker, G., Veeranna, Pant, H. C., Brady, R. O., Martin, L. J. and Kulkarni, A. B. (1996) 'Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death', *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20): 11173-8.
99. Onishi, K., Higuchi, M., Asakura, T., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2007) 'The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts', *Genes Cells* 12(4): 535-46.
100. Ordyan, N. E. and Pivina, S. G. (2003) 'Anxiety levels and neurosteroid synthesis in the brains of prenatally stressed male rats', *Neurosci Behav Physiol* 33(9): 899-903.
101. Pappas, G. D., Kriho, V. and Pesold, C. (2001) 'Reelin in the extracellular matrix and dendritic spines of the cortex and hippocampus: a comparison between wild type and heterozygous reeler mice by immunoelectron microscopy', *J Neurocytol* 30(5): 413-25.
102. Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. and Tsai, L. H. (1999) 'Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration', *Nature* 402(6762): 615-22.
103. Paudel, H. K., Lew, J., Ali, Z. and Wang, J. H. (1993) 'Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments', *J Biol Chem* 268(31): 23512-8.
104. Pei, J. J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Bogdanovic, N., Winblad, B. and Cowburn, R. F. (1998) 'Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration', *Brain Res* 797(2): 267-77.
105. Pesold, C., Impagnatiello, F., Pisu, M. G., Uzunov, D. P., Costa, E., Guidotti, A. and Caruncho, H. J. (1998) 'Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats', *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 3221-6.
106. Peters, D. A. (1986) 'Prenatal stress increases the behavioral response to serotonin agonists and alters open field behavior in the rat', *Pharmacol Biochem Behav* 25(4): 873-7.
107. Polter, A., Beurel, E., Yang, S., Garner, R., Song, L., Miller, C. A., Sweatt, J. D., McMahon, L., Bartolucci, A. A., Li, X. et al. (2010) 'Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances', *Neuropsychopharmacology* 35(8): 1761-74.
108. Poltyrev, T., Keshet, G. I., Kay, G. and Weinstock, M. (1996) 'Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats', *Dev Psychobiol* 29(5): 453-62.
109. Qin, L., Tu, W., Sun, X., Zhang, J., Chen, Y. and Zhao, H. (2011) 'Retardation of neurobehavioral development and reelin down-regulation regulated by further DNA methylation in the hippocampus of the rat pups are associated with maternal deprivation', *Behav Brain Res* 217(1): 142-7.
110. Qiu, S. and Weeber, E. J. (2007) 'Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses', *J Neurophysiol* 97(3): 2312-21.
111. Qiu, S., Zhao, L. F., Korwek, K. M. and Weeber, E. J. (2006) 'Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus', *J Neurosci* 26(50): 12943-55.
112. Revest, J. M., Di Blasi, F., Kitchener, P., Rouge-Pont, F., Desmedt, A., Turiault, M., Tronche, F. and Piazza, P. V. (2005) 'The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids', *Nat Neurosci* 8(5): 664-72.

113. Richardson, H. N., Zorrilla, E. P., Mandyam, C. D. and Rivier, C. L. (2006) 'Exposure to repetitive versus varied stress during prenatal development generates two distinct anxiogenic and neuroendocrine profiles in adulthood', *Endocrinology* 147(5): 2506-17.
114. Ringstedt, T., Linnarsson, S., Wagner, J., Lendahl, U., Kokaia, Z., Arenas, E., Ernfors, P. and Ibanez, C. F. (1998) 'BDNF regulates reelin expression and Cajal-Retzius cell development in the cerebral cortex', *Neuron* 21(2): 305-15.
115. Rogers, J. T., Rusiana, I., Trotter, J., Zhao, L., Donaldson, E., Pak, D. T., Babus, L. W., Peters, M., Banko, J. L., Chavis, P. et al. (2011) 'Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity, and dendritic spine density', *Learn Mem* 18(9): 558-64.
116. Royaux, I., Lambert de Rouvroit, C., D'Arcangelo, G., Demirov, D. and Goffinet, A. M. (1997) 'Genomic organization of the mouse reelin gene', *Genomics* 46(2): 240-50.
117. Salinger, W. L., Ladrow, P. and Wheeler, C. (2003) 'Behavioral phenotype of the reeler mutant mouse: effects of RELN gene dosage and social isolation', *Behav Neurosci* 117(6): 1257-75.
118. Sapolsky, R. M., Krey, L. C. and McEwen, B. S. (1985) 'Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging', *J Neurosci* 5(5): 1222-7.
119. Selye, H. (1976) 'Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions', *Can Med Assoc J* 115(1): 53-6.
120. Simo, S., Pujadas, L., Segura, M. F., La Torre, A., Del Rio, J. A., Urena, J. M., Comella, J. X. and Soriano, E. (2007) 'Reelin induces the detachment of postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation', *Cereb Cortex* 17(2): 294-303.
121. Smith, M. A., Makino, S., Kvetnansky, R. and Post, R. M. (1995) 'Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus', *J Neurosci* 15(3 Pt 1): 1768-77.
122. Stanfield, B. B. and Cowan, W. M. (1979) 'The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice', *J Comp Neurol* 185(3): 423-59.
123. Suchecki, D. and Palermo Neto, J. (1991) 'Prenatal stress and emotional response of adult offspring', *Physiol Behav* 49(3): 423-6.
124. Szymanska, M., Suska, A., Budziszewska, B., Jaworska-Feil, L., Basta-Kaim, A., Leskiewicz, M., Kubera, M., Gergont, A., Krocza, S., Kacinski, M. et al. (2009) 'Prenatal stress decreases glycogen synthase kinase-3 phosphorylation in the rat frontal cortex', *Pharmacol Rep* 61(4): 612-20.
125. Teixeira, C. M., Martin, E. D., Sahun, I., Masachs, N., Pujadas, L., Corvelo, A., Bosch, C., Rossi, D., Martinez, A., Maldonado, R. et al. (2011) 'Overexpression of Reelin prevents the manifestation of behavioral phenotypes related to schizophrenia and bipolar disorder', *Neuropsychopharmacology* 36(12): 2395-405.
126. Tissir, F. and Goffinet, A. M. (2003) 'Reelin and brain development', *Nat Rev Neurosci* 4(6): 496-505.
127. Tissir, F., Lambert de Rouvroit, C. and Goffinet, A. M. (2002) 'The role of reelin in the development and evolution of the cerebral cortex', *Braz J Med Biol Res* 35(12): 1473-84.
128. Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A. and Nestler, E. J. (2007) 'Epigenetic regulation in psychiatric disorders', *Nat Rev Neurosci* 8(5): 355-67.

129. Tsigos, C. and Chrousos, G. P. (2002) 'Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress', *J Psychosom Res* 53(4): 865-71.
130. Tueting, P., Costa, E., Dwivedi, Y., Guidotti, A., Impagnatiello, F., Manev, R. and Pesold, C. (1999) 'The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse', *Neuroreport* 10(6): 1329-34.
131. Ulupinar, E., Yucel, F. and Erol, K. (2011) 'Lesion-induced synaptic plasticity in the somatosensory cortex of prenatally stressed rats', *Neurotoxicol Teratol* 33(5): 548-57.
132. Utreras, E., Keller, J., Terse, A., Prochazkova, M., Iadarola, M. J. and Kulkarni, A. B. (2012) 'Transforming growth factor-beta1 regulates Cdk5 activity in primary sensory neurons', *J Biol Chem* 287(20): 16917-29.
133. Uygur, E. E. and Arslan, M. (2010) 'Effects of chronic stress on cognitive functions and anxiety related behaviors in rats', *Acta Physiol Hung* 97(3): 297-306.
134. Vallee, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H. and Maccari, S. (1997) 'Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion', *J Neurosci* 17(7): 2626-36.
135. Ventruti, A., Kazdoba, T. M., Niu, S. and D'Arcangelo, G. (2011) 'Reelin deficiency causes specific defects in the molecular composition of the synapses in the adult brain', *Neuroscience* 189: 32-42.
136. Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B. S. and Chattarji, S. (2002) 'Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons', *J Neurosci* 22(15): 6810-8.
137. Watanabe, Y., Gould, E., Daniels, D. C., Cameron, H. and McEwen, B. S. (1992) 'Tianeptine attenuates stress-induced morphological changes in the hippocampus', *Eur J Pharmacol* 222(1): 157-62.
138. Wu, J., Song, T. B., Li, Y. J., He, K. S., Ge, L. and Wang, L. R. (2007) 'Prenatal restraint stress impairs learning and memory and hippocampal PKCbeta1 expression and translocation in offspring rats', *Brain Res* 1141: 205-13.
139. Yang, J., Han, H., Cao, J., Li, L. and Xu, L. (2006) 'Prenatal stress modifies hippocampal synaptic plasticity and spatial learning in young rat offspring', *Hippocampus* 16(5): 431-6.
140. Zhu, W. L., Shi, H. S., Wang, S. J., Xu, C. M., Jiang, W. G., Wang, X., Wu, P., Li, Q. Q., Ding, Z. B. and Lu, L. (2012) 'Increased Cdk5/p35 activity in the dentate gyrus mediates depressive-like behaviour in rats', *Int J Neuropsychopharmacol* 15(6): 795-809.