

ARTÍCULO ORIGINAL

Impacto de la separación materna durante la lactancia sobre el tamaño del cerebro y la inmunorreacción al receptor Gaba – A

Impact of maternal separation during nursing on brain size and on GABA-A receptor immunoreactivity

Jenny Patiño¹, Laura Corredor², Zulma Dueñas^{3*}

¹ Estudiante de Medicina. Universidad Nacional de Colombia

² Estudiante Maestría en Neurociencias. Universidad Nacional de Colombia

³ Licenciada en Biología. Magister en Ciencias Biológicas, Doctorado en Neurobiología. Profesor Asociado. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Medicina. Grupo de Investigación: Neurofisiología Comportamental. Universidad Nacional de Colombia.

* Correo electrónico: zjduenasg@unal.edu.co

Fecha de recepción: 10 - 09 - 13

Fecha de aceptación: 24 - 10 - 13

Citar este artículo así:

Patiño J, Corredor L, Dueñas Z. Impacto de la separación materna durante la lactancia sobre el tamaño del cerebro y la inmunorreacción al receptor GABA-A. Revista Investig. Salud Univ. Boyacá. 2014; 1(1): 31 - 44

RESUMEN

Introducción. El vínculo materno es fundamental para el establecimiento y mantenimiento de las redes sinápticas, y el desarrollo morfofisiológico y emocional de los individuos. Los niños maltratados o rechazados son más propensos a desarrollar psicopatologías. Los modelos ani-

males permiten una aproximación experimental a mecanismos involucrados en alteraciones ocasionadas por estrés temprano.

Objetivo. Determinar si la separación materna durante la lactancia, afecta en el adulto el tamaño del cerebro y el número de células inmunorreactivas a la subunidad alfa 1 del receptor ácido gamma-aminobutírico: GABA-A.

Métodos. Se mantuvieron ratas Wistar con ciclo invertido luz-oscuridad, sin restricciones de agua o comida. Durante la lactancia, a unas mamás les fueron separadas las crías dos veces al día y otras se mantuvieron como grupo control. El día 22 los sujetos se separaron por sexo y tratamiento. El día 60 se perfundieron con paraformaldehído, previa anestesia, y los cerebros fueron extraídos y pesados. Para identificar el tamaño cerebral, se hicieron cinco cortes seriados de 20 μm cada 100 μm . Se tomaron fotografías y se utilizó una escala micrométrica. La inmunorreacción al receptor GABA-A se analizó en cortes de 20 μm mediante tinción por inmunohistoquímica.

Resultados. En las ratas adultas, el peso cerebral total de las ratas separadas fue menor. En las hembras separadas se observó reducción estadísticamente significativa en el tamaño del hipocampo. En los machos separados se observó disminución de la marcación para la subunidad alfa1 del receptor GABA-A, en la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo.

Conclusiones. Estos resultados muestran que la separación materna durante la lactancia altera, en ciertas áreas cerebrales del adulto, el tamaño y la inmunorreacción al receptor GABA-A, y que estos cambios son diferentes en hembras y machos.

Palabras clave: ansiedad, relación madre-hijo, receptor GABA-A, cerebro de rata (Fuente: DeCS)

ABSTRACT

Introduction: The maternal bond is crucial to establish and maintain synaptic networks and for morphophysiological and emotional development of individuals. Neglected or abused kids are more susceptible to develop psychopathologies. Animal models allow an experimental approach to mechanisms involved in alterations due early stress.

Objective: To determine if maternal separation during nursing alters brain size in adults and the amount of immunoreactive cells to alpha subunit of GABA-A receptor.

Methods: Wistar rats were kept under reverse light-dark cycle with food and water *ad libitum*. During nursing, pups were separated from their mothers twice a day and other group was used as control. At day 22nd, subjects were separated by gender and treatment. In day 60, subjects were anesthetized and perfused with paraformaldehyde and brains were extracted and weighted. In order to identify brain size, 5 serial slides of 20 μm were made every 100 μm . Pictures were taken and micrometric scale was used. Immunoreactivity to alpha subunit of GABA-A receptor was analyzed in 20 μm slides through immunohistochemistry.

Results: In adults, total brain weight of separated rats was inferior than in the control group. Separated females showed a significant reduction of hippocampus size. In separated males a decrease of immunoreactivity to GABA-A receptor in prefrontal cortex, amygdala and hippocampus was evidenced.

Conclusions: These results show that maternal separation during nursing alters size in some brain areas of adult rats, the immunoreactivity to alpha subunit of GABA-A receptor, and these changes are different between separated females and males.

Key words: Anxiety, mother child relations, GABA receptor, rat brain. (Source: DeCs)

INTRODUCCIÓN

Las experiencias traumáticas que ocurren durante los primeros años de vida afectan el desarrollo cerebral y el comportamiento de los individuos (1). En los estudios clínicos en que se evalúan las consecuencias de las experiencias adversas tempranas, como el abuso infantil, el rechazo materno o el estrés psicosocial, se sugiere que tener un historial de sucesos adversos puede facilitar el desarrollo de varias psicopatologías (2-5).

Para estudiar cómo las experiencias negativas ocurridas en la edad temprana afectan el desarrollo del individuo, se han implementado varios modelos con animales, incluyendo los que investigan las interrupciones en la relación madre-cría y sus consecuencias a corto, mediano y largo plazo (6-8). Uno de estos modelos es la separación maternal temprana, que ha sido ampliamente utilizado como un modelo de ansiedad y depresión causadas

por el estrés que implica dicha separación, tanto para la cría como para la madre (9).

En la sociedad, la separación temprana de madre e hijo es un factor común, dado que los cambios sociales han permitido a la mujer desempeñar un nuevo rol en la comunidad; sin embargo, las primeras etapas de la vida de un ser humano son determinantes para su desarrollo y la relación hijo-madre es fundamental.

En la literatura científica se postula la hipótesis de que la interacción dual constante entre el recién nacido y la madre, controla y modula la conducta del recién nacido ante los estímulos del ambiente y, además, puede contribuir a regular el desarrollo interno homeostático (10).

Esta función reguladora de la interacción madre-recién nacido, podría ser esencial para promover el desarrollo normal y regular las conexiones sinápticas durante el establecimiento funcional de los circuitos cerebrales. En la respuesta al estrés participan dos mecanismos fisiológicos que se complementan mutuamente: uno directo, la estimulación nerviosa a través del sistema nervioso autónomo, y otro indirecto, el hormonal, mediante la acción del eje regulador hipotálamo-hipófiso-suprarrenal (*hypothalamic-pituitary-adrenal axis*).

La palabra estrés es un concepto multidimensional que también se ha empleado para

denotar sus tres componentes: el evento estresante, la respuesta del organismo al evento estresante, y los estados fisiológicos y del comportamiento intermedios entre el evento estresante y la reacción corporal (11). Dado que la separación materna se considera un modelo de estrés crónico (12), es posible indagar sobre los cambios morfológicos y los mecanismos neurobiológicos involucrados en respuestas individuales de la activación del eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal (13), el cual muestra los mecanismos fisiológicos que hacen que un organismo responda adaptativamente a un estímulo hostil.

La respuesta al estrés está mediada fundamentalmente por interacción de dicho eje y por la acción de los neurotransmisores. El ácido gamma-aminobutírico (*gamma-aminobutyric acid*, GABA) es el principal inhibidor de la neurotransmisión en el sistema nervioso central de los mamíferos (14) y se ha reportado que el estrés puede causar alteraciones en el GABA o en sus receptores (15).

El GABA está presente en altas concentraciones en muchas regiones del cerebro (16); se estima que entre 10 y 40% de las terminales nerviosas en la corteza cerebral, el hipocampo y la sustancia *nigra*, el núcleo estriado, la amígdala, el globo pálido, el bulbo olfatorio y el cerebelo, utilizan GABA como su transmisor principal (17). Los hallazgos sugieren una relación entre las alteraciones de la función gabaérgica con enfermedades neurológicas

y psiquiátricas humanas, que incluyen epilepsia (17), discinesia tardía, alcoholismo (18), esquizofrenia, enfermedades del sueño y retardo mental, entre otras.

El GABA actúa a través de tres tipos de receptores ($GABA_A$, $GABA_B$ y $GABA_C$); los receptores de tipo A y C son ionotrópicos y median la actividad inhibitoria rápida (19), mientras que el B es metabotrópico y se relaciona con la acción inhibitoria a largo plazo (20). El receptor $GABA_A$ es el principal para la neurotransmisión inhibitoria en el sistema nervioso central (19); su estructura está formada por cinco polipéptidos transmembrana, los cuales son subunidades organizadas alrededor de un canal iónico permeable al Cl^- (21). Se han identificado, al menos, 19 subunidades (22), las cuales se denominan α (1 a 6), β (1 a 4), γ (1 a 3), δ , ϵ & ρ (1 a 3), a pesar de la gran cantidad de posibilidades combinatorias, la diversidad de receptores $GABA_A$ está significativamente restringida (16,17). Por lo general, el receptor contiene, al menos, una subunidad alfa, una beta y una gamma (16,23). La subunidad $\alpha 1$ es el subtipo más prevalente en el sistema nervioso central (24,25); es específica de los receptores sinápticos, en comparación con $\alpha 5$ y $\alpha 4$ que están presentes en receptores extrasinápticos (26). La presencia de neuronas gabaérgicas y conexiones sinápticas a través de todo el sistema nervioso, sugiere que la inhibición neural es un proceso regulador crítico en los procesos fisiológicos y del comportamiento,

incluyendo la actividad locomotora, la conducta de alimentación, la agresión, la conducta sexual, los estados de ánimo, la regulación de la sensibilidad al dolor, la regulación cardiovascular y la termorregulación (17,25).

En estudios previos de nuestro grupo, se encontró que en las ratas hembras adultas, pero no en los machos, dos periodos cortos de separación materna durante la lactancia inducían una disminución de la conducta ansiosa evaluada en el laberinto en cruz elevado (27). Teniendo en cuenta que la separación materna durante la lactancia se considera un modelo de estrés crónico temprano y que el estrés induce alteraciones a largo plazo, el objetivo del presente trabajo fue investigar si en las ratas este tipo de estrés induce, en el adulto joven, cambios en el tamaño del cerebro y en el número de células inmuno-reativas a la subunidad alfa del receptor GABA-A en determinadas áreas cerebrales.

METODOLOGÍA

Separación materna durante la lactancia

Se utilizaron ratas Wistar, criadas con ciclo invertido luz-oscuridad (luces encendidas a las 19 horas), sin restricciones de agua ni de comida. El día de nacimiento se estableció como día posnatal cero (DPN_0). Las crías fueron separadas de su madre a partir del DPN_1 y hasta el DPN_{21} , de las 07:30 a las 10:30 y de las 13:30 a las 16:30. A partir del día 22 los sujetos se alojaron por sexo y tratamiento,

y se mantuvieron en condiciones normales de alimentación y crecimiento hasta el DPN₆₀.

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y se rigieron de conformidad con la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de los Estados Unidos.

Cuantificación de áreas

El día 60, a los sujetos se les hizo perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4%, previa anestesia. Se extrajeron los cerebros, se pesaron y se conservaron en paraformaldehído. Cuatro días antes de hacer los cortes en criostato, los cerebros se crioprotegieron en una solución saturada de sacarosa. Para identificar el tamaño de las áreas, se hicieron cinco cortes seriados de 20 μm cada 100 μm . Se tomaron fotografías y el tamaño de los cerebros fue analizado en las áreas determinadas, utilizando una escala micrométrica.

Es pertinente aclarar que se hicieron mediciones del área total del corte respectivo para el que se fuera a medir. En este caso se hicieron mediciones del área total en mm^2 de los cortes ubicados en las coordenadas bregma indicadas: corteza infralímbica, límbica y cingulada (CPF: bregma +2,7); B: ventrículo lateral (VL: bregma +1); C: tercer ventrículo dorsal (D3V: bregma -0,92); D: hipocampo

(HP: bregma -3,14)(28). Para ello se hizo una digitalización de los tejidos que se tenían en las láminas. Posteriormente, se tomó cada corte de tejido individualmente y se usó el programa ImageJ para obtener una imagen inicial, la cual se convierte a escala de grises y luego a una imagen binaria (blanco y negro), de tal forma que en color negro se resalta el tejido de interés. Los datos obtenidos se compararon estadísticamente utilizando el programa Microsoft Excel™.

Procesamiento histológico para inmunohistoquímica

Para identificar el número de células inmunorreactivas a la subunidad alfa del receptor GABA-A, se hicieron cortes de 20 μm en las áreas de interés y se procesaron para inmunohistoquímica usando anticuerpos contra la subunidad alfa del receptor GABA-A. El número de células marcadas se cuantificó mediante conteo manual, utilizando el programa ImageJ. Los cortes de 20 μm se incubaron con suero de bloqueo (albúmina de suero bovino; sigma, tritón X-100 0,3%, suero normal de cabra) durante una hora. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo primario anti-subunidad α del GABA-A (1:250 SIGMA en suero de bloqueo), durante 12 horas a temperatura ambiente. Luego se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo con biotina (kit Vectastain, Vector) en dilución 1:500 en PBS tritón al 0,3 % durante una hora y 30 minutos, y después con com-

plejo AB (kit Vectastain, Vector, durante una hora y 30 minutos. Finalmente, se revelaron las muestras con diaminobenzidina (Peroxidasesubstrate Kit DAB, Vector). Entre cada paso se hicieron cuatro lavados con PBS tritón al 0,3% durante 15 minutos cada uno. Después de eliminar el DAB y agregar solución salina al 0.9%. Se hizo el montaje de los tejidos con pincel sobre láminas para su posterior observación.

Conteo celular y análisis estadístico

Se hicieron cuatro registros fotográficos por sujeto de cada una de las áreas de interés, de acuerdo con las coordenadas del atlas del cerebro de la rata. Dichos registros se tomaron en el laboratorio de equipos comunes de la Facultad de Medicina mediante el objetivo 40X de un microscopio invertido marca Carl Zeiss, modelo Axiovert 40 CFL, que está acoplado a una cámara digital Cannon Power Shot A-640, la cual se conecta a un computador. Cada una de las imágenes abarcó un área de $250 \mu\text{m}^2$. El número de células marcadas se cuantificó mediante conteo manual, utilizando el programa ImageJ.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa R y, teniendo en cuenta la normalidad, se aplicaron las pruebas t no pareada y la Wilcoxon. Para el análisis de las células marcadas para R-GABA-A, se aplicó la prueba estadística paramétrica (prueba T), con la prueba t de Student, para la comparación de cada

una de las áreas en los dos grupos, utilizando Sigmastat 3.11.; las gráficas representan en todos los casos como media + error estándar de la media. Para todas las pruebas se tomó como nivel de significancia un α de 0,05.

RESULTADOS

Peso corporal total

A partir del segundo día posnatal, cada dos días se registró el peso corporal total, tanto en el grupo control no separado como en el experimental separado. Como se observa en la figura 1, el peso corporal de las crías separadas comparado con el peso del grupo control, no mostró diferencias significativas.

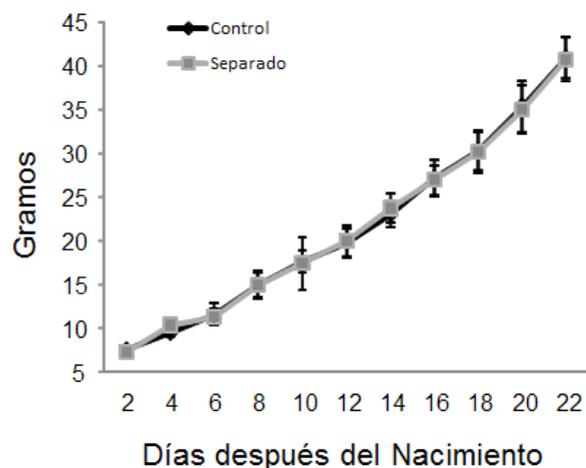


Figura 1. Peso corporal total del grupo control no separado (negro) y del grupo experimental separado (gris) (n=10). No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Peso del cerebro

Una vez perfundidos los sujetos y extraídos los cerebros, se pesaron y en el adulto joven (60 días) se evidenció una disminución significativa en el peso total de los cerebros de las ratas, que fueron separadas, comparadas con el grupo control no separado (figura 2). A pesar de ser una diferencia mínima de 0,5 g, al aplicar una prueba t de Student fue estadísticamente significativa ($p < 0,005$).

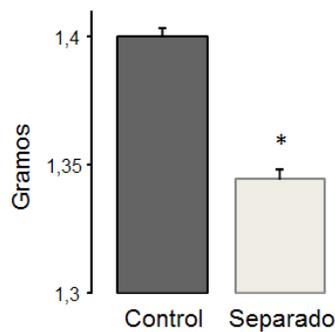


Figura 2. Peso de los cerebros del grupo control no separado (negro) y del grupo experimental separado (gris) ($n=10$)

* t de Student, $p < 0,005$.

Tamaño de áreas cerebrales

Con respecto al tamaño de las áreas evaluadas en la figura 3 se observó una tendencia a la reducción del tamaño, tanto en hembras como en machos de los grupos que fueron separados, pero que sólo es estadísticamente significativo en el hipocampo de hembras, si bien en las cortezas (CPF) y los ventrículos

los lateral y dorsal (VL y 3VD) se observa una tendencia a disminuir.

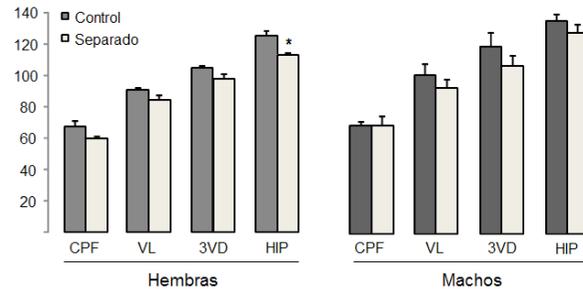


Figura 3. Áreas de interés medidas en hembras y machos de los grupos control (negro) y separados (gris) ($n=4$).

Corteza prefrontal (CPF: bregma +2,7); ventrículo lateral (VL: bregma +1); tercer ventrículo dorsal (3VD: bregma -0,92); hipocampo (HP: bregma -3,14). Los datos son promedios \pm error estándar de la media.

* $p < 0,05$ con prueba t pareada para datos con distribución normal según la prueba de Shapiro.

Distancias según "Atlas del cerebro de la rata" de Paxinos (28).

Inmunorreacción a la subunidad alfa1 del receptor GABA-A

En la figura 4 se muestra el número de células marcadas para cada área cerebral analizada en los machos control en comparación con los machos separados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la

corteza prefrontal y frontal, la amígdala y el hipocampo, siendo muy notoria la diferencia en esta última área.

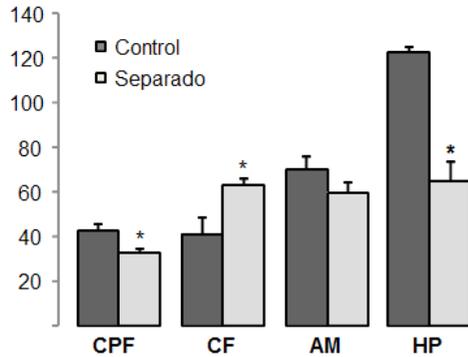


Figura 4. Cuantificación de la inmunorreacción para la subunidad alfa 1 del receptor GABA-A en machos, grupos control (negro) y separados (gris) (n=4)

CPF: corteza prefrontal; CF: corteza frontal; AM: Amígdala; HP: hipocampo.

Los datos son promedios \pm error estándar de la media

* $p < 0,05$ con prueba t de Student

En la figura 5 se muestran imágenes representativas de la inmunorreacción para la subunidad alfa 1 del receptor GABA-A en el hipocampo de los machos.

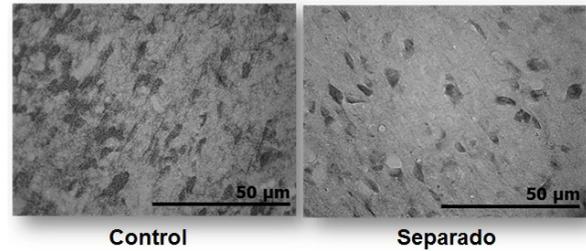


Figura 5. Fotos representativas de la inmunorreacción para la subunidad alfa 1 del receptor GABA-A, en el hipocampo de machos control y separado

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio muestran que el protocolo de separación materna durante la lactancia no altera el peso corporal total de los sujetos; sin embargo, se observa una disminución del peso del cerebro de los sujetos separados, que pudiera estar asociado a la tendencia a la disminución de las áreas medidas y que con estos resultados no se podría asociar directamente a pérdida de células, motivo de análisis de estudios en curso.

Acorde con el propósito del trabajo, se evidenciaron cambios en el tamaño del hipocampo de las ratas hembra separadas y cambios en la inmunorreacción de la subunidad alfa 1 del receptor GABA-A en machos, asociados a la separación cría-madre durante la lactancia. No obstante, las implicaciones

que estas diferencias puedan tener en el comportamiento y la función aún son motivo de estudio.

Si bien es cierto que durante el periodo de separación materna no se observaron diferencias en el peso corporal total de sujetos separados comparados con los no separados, es claro que dicho parámetro no refleja lo que sucede en diferentes órganos. En efecto, la masa muscular y la grasa acumulada pueden enmascarar resultados como el observado con relación al peso del cerebro. Existe muy poca información en la literatura científica sobre los cambios en el tamaño del cerebro, ocasionados por el estrés. Sin embargo, se ha reportado que la depresión mayor o el estrés crónico pueden causar pérdida del volumen cerebral, una condición que contribuye a la alteración emocional y cognitiva (29). Además, en los estudios con resonancia magnética se sugiere que eventos traumáticos repetitivos pueden resultar en reducción del volumen de estructuras cerebrales asociadas con los estados de alerta (30).

Aunque los datos muestran que la separación temprana durante la lactancia induce una tendencia a la disminución en el tamaño de las áreas medidas, la diferencia sólo fue significativa en el hipocampo de las hembras separadas. El hipocampo es una de las áreas más sensibles a los cambios inducidos por alteraciones fisiológicas. Se sabe, por ejemplo,

que durante el embarazo y con eventos estresantes crónicos, hay una disminución de la complejidad de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo (31). En este sentido, y considerando la separación materna durante todo el periodo de lactancia como causa de estrés crónico, es probable que el cambio visto en el hipocampo se deba a ese estrés. Estos cambios se podrían ver reflejados en la modulación de los diferentes tipos de respuesta al estrés o en las alteraciones de los procesos de aprendizaje y memoria.

Con relación a los resultados obtenidos en la expresión del receptor GABA-A, específicamente la subunidad alfa1, en este estudio se observó una disminución de la marcación en la corteza y en el hipocampo, y una tendencia a disminuir en la amígdala. Este hallazgo concuerda con estudios realizados por de Hsu, *et al.*(32), en los cuales se reporta disminución de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A del hipocampo. Aunque en el trabajo mencionado se utilizó otra cepa de ratas (Sprague-Dawley) y un protocolo de separación distinto, se resalta el efecto que tiene la separación materna para alterar las concentraciones del receptor GABA_A en dicha estructura, sustentado también por otros trabajos, como el de Aisa, *et al.* (33) quienes afirman que la separación temprana puede alterar la citoarquitectura del hipocampo de manera estable.

Aparte de su papel trófico en el desarrollo embrionario, se ha hecho énfasis en el GABA como un neurotransmisor determinante para el desarrollo de la plasticidad posnatal (25). Hallazgos recientes sugieren que la cantidad de GABA, sus receptores y el número de sinapsis establecidas por el mismo, están relacionados con la actividad neuronal en el periodo crítico en el desarrollo de la corteza. De hecho, Fagiolini (34) propone que solamente los circuitos que contienen receptores para la subunidad $\alpha 1$ de GABA_A dirigen la plasticidad cortical en el cerebro posnatal. En ese mismo contexto, Amaral y Dent (35) publicaron que la mayoría de neuronas granulares del hipocampo desarrollan y extienden sus axones entre los días posnatales 1 al 21, por lo que un tipo de estrés agudo como lo es la SMT alteraría la citoarquitectura del hipocampo. Estos periodos de neurogénesis y plasticidad se presentan en paralelo con el periodo de hiporrespuesta al estrés, el cual se lleva a cabo aproximadamente entre los días P₂-P₁₅, cuando el comportamiento maternal es un regulador clave (36). En este periodo, el eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal se encuentra con muy poca respuesta, pero ante un estrés crónico se puede alterar.

Con base en estos resultados y en los reportes de la literatura, se podría sugerir que la SMT, además de alterar la respuesta al estrés, modifica el tamaño de algunas áreas cerebrales y la cantidad de receptores GABA-A.

Teniendo en cuenta el papel modulador que tiene dicho neurotransmisor en el eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal, los daños causados a estructuras como el hipocampo que regula la inhibición del eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal, podrían progresivamente reducir el control inhibitorio del mismo, posiblemente debido a la reducción en el número de receptores.

Los estudios en curso que dan continuidad a la pregunta sobre cuáles son los efectos neurales y en el comportamiento de un estrés crónico causado por separación materna durante la lactancia, permitirán buscar moduladores epigenéticos de las conductas alteradas y fortalecerán la argumentación científica de la necesidad de implementar mejores políticas, para fortalecer y aumentar el tiempo reglamentario dedicado a la lactancia materna.

Financiación: Universidad Nacional de Colombia. Dirección de Investigaciones, sede Bogotá. Código 14800

REFERENCIAS

1. Neigh GN, Gillespie CF, Nemeroff CB. The neurobiological toll of child abuse and neglect. *Trauma Violence Abuse*. 2009;10:389-410.
2. Cicchetti D, Manly JT. Operationalizing child maltreatment: Developmental

- processes and outcomes. *Dev Psychopathol.* 2001;13:755-7.
3. Lai MC, Huang LT. Effects of early life stress on neuroendocrine and neurobehavior: Mechanisms and implications. *Pediatr Neonatol.* 2011;52:122-9.
 4. Mesa-Gresa P, Moya-Albiol L. Neurobiology of child abuse: The cycle of violence. *Rev Neurol.* 2011;52:489-503.
 5. Moriceau S, Roth TL, Sullivan RM. Rodent model of infant attachment learning and stress. *Dev Psychobiol.* 2010;52:651-60.
 6. Lesch KP. When the serotonin transporter gene meets adversity: The contribution of animal models to understanding epigenetic mechanisms in affective disorders and resilience. *Curr Top Behav Neurosci.* 2011;7:251-80.
 7. Schmidt MV, Wang XD, Meijer OC. Early life stress paradigms in rodents: Potential animal models of depression? *Psychopharmacology.* 2011;214:131-40.
 8. Salzberg M, Kumar G, Supit L, Jones NC, Morris MJ, Rees S, *et al.* Early postnatal stress confers enduring vulnerability to limbic epileptogenesis. *Epilepsia.* 2007;48:2079-85.
 9. Duque A, Coman D, Carlyle BC, Bordner KA, George ED, Papademetris X, *et al.* Neuroanatomical changes in a mouse model of early life neglect. *Brain Struct-Funct.* 2011;217:459-72.
 10. Litvin Y, Tovote P, Pentkowski NS, Zeyda T, King LB, Vasconcellos AJ, *et al.* Maternal separation modulates short-term behavioral and physiological indices of the stress response. *Horm Behav.* 2010;58:241-9.
 11. McEwen B, Sapolsky R. Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol.* 1995;5:205-16.
 12. Cotella EM, Mestres I, Franchioni L, Levin GM, Suárez MM. Long-term effects of maternal separation on chronic stress response suppressed by amitriptyline treatment. *Stress.* 2013;16:477-81.
 13. Lajud N, Roque A, Cajero M, Gutiérrez-Ospina G, Torner L. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37:410-20.
 14. Sigel E, Steinmann ME. Structure, function, and modulation of GABA (A) receptors. *J Biol Chem.* 2012;287:40224-31.
 15. Jacobson-Pick S, Richter-Levin G. Short- and long-term effects of juvenile stressor exposure on the expression of GABAA receptor subunits in rats. *Stress.* 2012;15:416-24.

18. Siegel GJ. Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspect. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 1999.
19. Hörtnagl H, Tasan RO, Wieselthaler A, Kirchmair E, Sieghart W, Sperk G. Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABA A receptor subunits in the mouse brain. *Neuroscience*. 2013;236:345-72.
20. Levy LM, Degnan AJ. GABA-based evaluation of neurologic conditions: MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013;34:259-65.
21. Darlison M, Pahal I, Thode C. Consequences of the evolution of the GABAA receptor gene family. *Cell MolNeurobiol*. 2005;25:607-24.
22. Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABA A receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*. 2000;101:815-50.
23. Bowery NG, Smart TG. GABA and glycine as neurotransmitters: A brief history. *Br J Pharmacol*. 2006;147:109-19.
24. Enna SJ, Gallagher JP. Biochemical and electrophysiological characteristics of mammalian GABA receptors. *Int Rev Neurobiol*. 1983;24:181-212.
25. Bäckberg M, Ultenius C, Fritschy JM, Meister B. Cellular localization of GABA A receptor α subunit immunoreactivity in the rat hypothalamus: Relationship with neurones containing orexigenic or anorexigenic peptides. *J Neuroendocrinol*. 2004;16:589-604.
26. Lewis DA, Cho RY, Carter CS, Eklund K, Forster S, Kelly MA, et al. Subunit-selective modulation of GABA type A receptor neurotransmission and cognition in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2008;165:1585-93.
27. Möhler H. Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: Impact of GABA. *J Neurochem*. 2007;102:1-12
28. Sun C, Sieghart W, Kapur J. Distribution of $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\gamma 2$, and ψ subunits of GABA A receptors in hippocampal granule cells. *Brain Res*. 2004;1029:207-16.
29. León-Rodríguez D, Dueñas Z. Effects of early maternal separation on the performance in the elevated plus maze in adult rats. *ActaBiolColomb*. 2012;17:129-42.
30. Paxinos G, Watson C. The rat brain. In: *Stereotaxic coordinates*. Fourth edition. San Diego: Academic Press; 2004.
31. Czéh B, Lucassen PJ. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated?

- ted? *Eur Arch Psychiatry ClinNeurosci*. 2007;257:250-60.
34. Shucard JL, Cox J, Shucard DW, Fetter H, Chung C, Ramasamy
35. D, *et al*. Symptoms of posttraumatic stress disorder and exposure to traumatic stressors are related to brain structural volumes and behavioral measures of affective stimulus processing in police officers. *Psychiatry Res*. 2012;30;204:25-31.
36. Pawluski JL, Valença A, Santos AI, Costa-Nunes JP, Steinbusch
37. HW, Strekalova T. Pregnancy or stress decrease complexity of CA3 pyramidal neurons in the hippocampus of adult female rats. *Neuroscience*. 2012; 227:201-10.
38. Hsu FC, Zhang GJ, Raol YS, Valentino RJ, Coulter DA, Brooks-Kayal
39. AR. Repeated neonatal handling with maternal separation permanently alters hippocampal GABA A receptors and behavioral stress responses. *Proc-NatlAcadSci U S A*. 2003;100:12213-8.
40. Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez M. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32:256-66.
41. Fagiolini M, Fritschy JM, Löw K, Möhler H, Rudolph U, Hensch T.
42. Specific GABA A circuits for visual cortical plasticity. *Science*. 2004;303:1681-83.
43. Amaral DG, Dent JA. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus. I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol*. 1981;195:51-86.
44. Enthoven L, de Kloet ER, Oitzl MS. Differential development of stress system (re)activity at weaning dependent on time of disruption of maternal care. *Brain Res*. 2008;1217:62-9.