



Universidad Nacional Autónoma de México
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN PSICOLOGÍA

**EFFECTO DEL AMBIENTE ENRIQUECIDO Y EL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA
ANSIEDAD EXPERIMENTAL INDUCIDA POR ABSTINENCIA A PROGESTERONA EN
RATAS WISTAR Y WISTAR KYOTO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

ISLAS PRECIADO DANNIA MELINE

DIRECTORA:

DRA. ERIKA MONSERRAT ESTRADA CAMARENA
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ"

COMITÉ:

DRA. PATRICIA DE GORTARI GALLARDO
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ"

DRA. CAROLINA LÓPEZ RUBALCAVA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

DRA. IRMA YOLANDA DEL RÍO PORTILLA
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ MANZO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

JUNIO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente” por abrirme sus puertas para la realización de la presente tesis.

Al CONACyT por la facilitación de recursos en la realización de mis estudios.

A la Dra. Erika Estrada Camarena, por compartir sus conocimientos y guiarme en la realización de este proyecto. Por su amistad y su confianza.

A la Dra. Patricia de Gortari y Dra. Carolina López Rubalcava por aceptar ser mis tutoras y enriquecer este proyecto con su experiencia y su conocimiento.

A la Dra. Irma Yolanda del Río y Dra. Gabriela Rodríguez Manzo, por sus valiosas aportaciones para la mejora de este trabajo.

A mis padres por su ayuda, comprensión y por todo. A mis hermanos por ser un ejemplo en mi vida.

A Enrique por su gran apoyo, paciencia y por la motivación que me ha dado para la finalización de este proceso.

A mis compañeros de laboratorio, por su invaluable apoyo en mi formación académica.

Amigos fuera y dentro del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, mi agradecimiento sincero.

A José Islas y Ma. Cruz Preciado, con todo mi cariño y admiración.

Resumen

El Síndrome Premenstrual, y su forma severa el Trastorno Disfórico Premenstrual son entidades psiquiátricas caracterizadas por aparecer en la fase lútea tardía del ciclo menstrual y por provocar estados ansiosos. La etiología de estos padecimientos se ha relacionado a una caída abrupta de la progesterona y a una desregulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA). En el presente trabajo se evaluó el efecto de la supresión brusca de progesterona sobre la conducta ansiosa y la regulación del eje HHA en diferentes condiciones experimentales: el estrés crónico (EC) para simular las condiciones adversas a las que se enfrenta un individuo y su efecto en la ansiedad; y el ambiente enriquecido (AE) como posible alternativa terapéutica para la ansiedad inducida por la supresión brusca de progesterona en ratas Wistar y Wistar Kyoto (WKY). La cepa WKY es considerada como vulnerable al estrés y no responsiva al tratamiento farmacológico, es por ello que fue de interés explorar el AE como abordaje no-farmacológico sobre su comportamiento ansioso y el impacto en el eje HHA. Los resultados mostraron que el EC exacerbó la ansiedad inducida por supresión brusca de progesterona, solo en la cepa WKY, y provocó el aplanamiento en algunos de los componentes del eje HHA en ambas cepas. En relación al AE, se encontró que previno la ansiedad inducida por supresión brusca de progesterona y restableció la funcionalidad de algunos indicadores de la actividad del eje HHA, por lo que puede ser una alternativa no-farmacológica útil para contrarrestar los efectos de la supresión brusca de progesterona.

Palabras clave: Supresión brusca de progesterona, ansiedad, Wistar kyoto, estrés crónico, ambiente enriquecido.

Abstract

Premenstrual Syndrome and its severe form the Premenstrual Dysphoric Disorder are affections which appear on the late luteal phase of menstrual cycle, characterized by anxiety behaviors. Etiology of these diseases is related to an abrupt drop on progesterone levels and a dysregulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis. In present work was evaluated the effect of abrupt suppression of progesterone on anxiety-like behaviors and on the HPA axis regulation under different experimental conditions: chronic stress (CS) to simulate the adverse events that persons may face and its effect on anxiety; and environmental enrichment (EE) as a possible therapeutic alternative for the anxiety induced by abrupt suppression of progesterone in Wistar and Wistar Kyoto rats (WKY). WKY strain is considered as vulnerable to stress and non-responsive to pharmacological treatment, for this reason it was of interest to explore the EE as a non-pharmacological approach in WKY rats and the impact on anxiety-like behaviors and on the HPA axis regulation. Results showed that CS exacerbated the anxiety induced by abrupt suppression of progesterone, only in WKY, and produced a blunted response in some components of the HPA axis in both strains. On the other hand, it was observed that EE prevented the anxiety induced by abrupt suppression of progesterone and restored the function in some indicators of the HPA axis activity. Therefore, EE might be a non-pharmacological alternative to counteract the effects of abrupt suppression of progesterone on anxiety and on the regulation of some components of the HPA axis.

Key words: abrupt suppression of progesterone, anxiety, wistar kyoto, chronic stress, environmental enrichment.

Contenido	Página
Capítulo 1	
Introducción general	1
Trastorno disfórico premenstrual	1
Neurobiología del trastorno disfórico premenstrual	3
Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y estrés	3
Neuroesteroides y estrés	5
Hipótesis de la etiología del trastorno disfórico premenstrual	6
Tratamiento del trastorno disfórico premenstrual	8
Capítulo 2	
Modelos animales para trastorno disfórico premenstrual	11
Cepa de ratas Wistar Kyoto	12
Condiciones experimentales: modulación de la ansiedad y respuesta a estrés	14
Ambiente enriquecido	14
Ambiente enriquecido y eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	16
Estrés crónico	17
Estrés crónico y eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	18
Capítulo 3	
Planteamiento del problema	20
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
Capítulo 4	
Materiales y método	22
Sujetos experimentales	22
Cirugía	22
Modelos conductuales	22
Enterramiento defensivo	22
Campo abierto	24
Técnicas bioquímicas	25
Radioinmunoensayo	25
Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa	26
Diseño experimental	31
Análisis estadístico	34
Capítulo 5	
Resultados	
Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la ansiedad experimental en ratas de la cepa Wistar	35
Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la expresión del RNAm de CRH en el PVN sobre las concentraciones de corticosterona en suero, del RNAm de GR y de CR en hipocampo como indicadores de la actividad del eje HHA en ratas Wistar	37

Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la ansiedad experimental en ratas de la cepa Wistar Kyoto	47
Efecto de la abstinencia a progesterona, estrés crónico y ambiente enriquecido sobre la expresión del RNAm de CRH en el PVN, sobre las concentraciones de corticosterona en suero, del RNAm de GR y de CRH en hipocampo como indicadores de la actividad del eje HHA en ratas Wistar Kyoto	49
Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la latencia de enterramiento, exploraciones al electrodo, número de choques y erguimientos en la prueba de enterramiento defensivo en ratas Wistar y Wistar Kyoto	60
Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre el número de cuadros cruzados en la prueba de campo abierto de ratas Wistar y Wistar Kyoto	62
Capítulo 6	
Discusión	
Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la ansiedad experimental en ratas Wistar	65
Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la expresión del RNAm de CRH en el PVN sobre las concentraciones de corticosterona en suero, del RNAm de GR y de CRH en hipocampo como indicadores de la actividad del eje HHA en ratas Wistar	67
Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la ansiedad experimental en ratas WKY	76
Efecto de la abstinencia a progesterona, estrés crónico y ambiente enriquecido sobre la expresión del RNAm de CRH en el PVN, sobre las concentraciones de corticosterona en suero, del RNAm de GR y de CRH en hipocampo como indicadores de la actividad del eje HHA en ratas Wistar Kyoto	78
Conclusión	88
Referencias bibliográficas	89

Índice de figuras

Página

Figura 1. Optimización metodológica de la técnica RT-PCR. Número de ciclos necesarios para amplificar cada DNAC. Los datos se expresan como la densidad óptica de cada DNAC del producto de la PCR en diferentes ciclos de amplificación en el hipocampo. Los productos de la PCR se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.....	30
Figura 2. Optimización metodológica de la técnica RT-PCR. Número de ciclos necesarios para amplificar cada DNAC. Los datos se expresan como la densidad óptica de cada DNAC del producto de la PCR en diferentes ciclos de amplificación en el PVN. Los productos de la PCR se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.....	30
Figura 3. Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión brusca de progesterona sobre el tiempo acumulativo de conductas activas (enterramiento y acicalamiento) evaluadas en la prueba de enterramiento defensivo.....	36
Figura 4. Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión brusca de progesterona sobre el tiempo acumulativo de conductas pasivas (inmovilidad y congelamiento) evaluadas en la prueba de enterramiento defensivo.....	37
Figura 5. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en PVN de ratas Wistar alojadas en situación control.....	38
Figura 6. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar alojadas en situación control.....	39
Figura 7. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar alojadas en situación control.....	39
Figura 8. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar alojadas en situación control.....	40
Figura 9. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en PVN de ratas Wistar sometidos a estrés crónico.....	41
Figura 10. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar sometidas a estrés crónico.....	42
Figura 11. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la	

supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar sometidas a estrés crónico.....	43
Figura 12. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar sometidas a estrés crónico.....	44
Figura 13. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar expuestas a ambiente enriquecido.....	45
Figura 14. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar expuestas a ambiente enriquecido.....	46
Figura 15. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar expuestas a ambiente enriquecido.....	47
Figura 16. Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión brusca de progesterona sobre el tiempo acumulativo de conductas activas (enterramiento y acicalamiento) evaluadas en la prueba de enterramiento defensivo en ratas Wistar Kyoto.....	48
Figura 17. Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión brusca de progesterona sobre el tiempo acumulativo de conductas pasivas (inmovilidad y congelamiento) evaluadas en la prueba de enterramiento defensivo en ratas Wistar Kyoto.....	49
Figura 18. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en PVN de ratas Wistar Kyoto alojadas en situación control.....	50
Figura 19. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar Kyoto alojadas en situación control.....	51
Figura 20. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar Kyoto alojadas en situación control.....	51
Figura 21. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar Kyoto alojadas en situación control.....	52
Figura 22. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la	

supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en PVN de ratas Wistar Kyoto sometidas a estrés crónico.....	53
Figura 23. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar Kyoto sometidas a estrés crónico.....	54
Figura 24. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar Kyoto sometidas a estrés crónico.....	55
Figura 25. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar Kyoto sometidas a estrés crónico.....	56
Figura 26. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en el PVN de ratas Wistar Kyoto sometidas a ambiente enriquecido.....	57
Figura 27. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar Kyoto expuestas a ambiente enriquecido.....	58
Figura 28. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar Kyoto expuestas a ambiente enriquecido.....	59
Figura 29. Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar Kyoto expuestas a ambiente enriquecido.....	60

Índice de tablas

Página

Tabla 1. Criterios diagnósticos especificados para TDPM.	2
Tabla 2. Mezcla de transcripción de RNA total a DNAc.....	28
Tabla 3. Secuencia de Oligos utilizada para la amplificación de genes.....	29
Tabla 4. Estandarización de condiciones para la expresión de oligonucleótidos....	29
Tabla 5. Mezcla para reacción de PCR (Los volúmenes utilizados fueron modificados para la amplificación de CRH, en donde se utilizó 1.7 µL de cloruro de magnesio y 6 µL de DNAc).....	30
Tabla 6. Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión brusca de progesterona sobre la latencia de enterramiento, exploraciones al electrodo, número de choques y erguimientos registrados en la prueba de enterramiento defensivo en ratas Wistar y WKY.....	61
Tabla 7. Resultados arrojados por el ANOVA de dos vías del efecto del tratamiento(AC y SB) y la condición experimental (SC, EC y AE) sobre la latencia de enterramiento exploraciones al electrodo, número de choques y erguimientos registrados en la prueba de enterramiento defensivo en ratas Wistar y WKY.....	62
Tabla 8. Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión Brusca de progesterona sobre el número de cuadros cruzados en la prueba de campo abierto en ratas Wistar y WKY.....	62

Lista de abreviaturas

AC: Aceite de maíz
ACTH: Hormona adrenocorticotrópica
AE: Ambiente enriquecido
ALO: Alopregnanolona
ANOVA: Análisis de la varianza
AVP: Vasopresina
BBT: Enterramiento defensivo (Burying behavior test)
CRH: Hormona liberadora de corticotropina
DNAc: Ácido desoxirribonucleico complementario
EC: Estrés crónico
GABA: Ácido gamma-aminobutírico
GABA-A: Receptor ácido gamma-aminobutírico tipo A
GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina
GR: Receptor a glucocorticoides
HHA: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
ISRSs: inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
MR: Receptor a mineralocorticoides
OVX: Ovariectomía
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo
RIA: Radioinmunoensayo
RNA_m: Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SB:Supresión brusca de progesterona
SC: Situación control
SPM:Síndrome premenstrual
TCC: Terapia cognitivo conductual
TDPM: Trastorno disfórico premenstrual
THDOC: Alotetrahydrocorticosterona
WKY: Wistar Kyoto

Capítulo 1

Introducción general

La ansiedad y la depresión son las condiciones psiquiátricas de mayor prevalencia en la población general. Se calcula que aproximadamente el 20% de ésta padecerá alguna de estas patologías y que la prevalencia va en aumento (Murphy et al., 2000).

En la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica (ENEP) se reporta que el 9.1% de la población presenta trastornos afectivos, 7.8% de éstos corresponden a episodios de depresión mayor. Por otra parte, la incidencia de la ansiedad parece ser más prevalente presentándose en un 14.3% de la población (Medina-Mora et al., 2003). Con base a los resultados obtenidos en la ENEP, los trastornos afectivos y de ansiedad inciden más frecuentemente en la población femenina (2.5 mujeres por cada varón) (Medina – Mora et al., 2003). Esto habla de una diferencia de género importante que probablemente se deba a diversos aspectos culturales, ambientales y/o fisiológicos (Hamdan, 2009).

Trastorno Disfórico Premenstrual

Es importante mencionar que en mujeres en edad reproductiva, la propensión a padecer algún desorden psiquiátrico es aún mayor y que pueden presentar síntomas emocionales y/o físicos relacionados con el ciclo menstrual (Yonkers, et al., 2008). Un ejemplo de ello es el Síndrome Premenstrual (SPM). Los síntomas del SPM son moderados e incluyen ánimo deprimido, ansiedad, labilidad afectiva entre otros, y afectan aproximadamente al 30% de mujeres en edad reproductiva (Pearlstein y Steiner, 2008). Sin embargo, existe un porcentaje del 3 al 8% cuyos síntomas suelen ser más severos e incapacitantes; a este conglomerado de síntomas se le conoce como Trastorno Disfórico Premenstrual (TDPM) (Yonkers, et al., 2008). El TDPM es una forma severa del síndrome

premenstrual (SPM) y también ha sido referido como trastorno disfórico de la fase lútea tardía, debido a que es en esta etapa del ciclo menstrual cuando se presentan los síntomas del TDPM (Bianchi-Demicheli et al. 2002). En general se considera que en el TDPM predominan los síntomas psicológicos, y en el SPM los físicos (Indusekhar et al., 2007).

El Manual Estadístico y Diagnóstico en su 5ta edición (DSM-V) incluye al TDPM en la categoría de “Trastorno Depresivos” y señala los siguientes criterios para determinar la presencia de TDPM (tabla 1).

Criterios diagnósticos señalados en el DSM-V para TDPM.

Criterio	Especificaciones
A) Al menos cinco síntomas deben presentarse en la semana de la fase lútea tardía de la mayoría de los ciclos menstruales del último año, que empiezan a remitir unos días después del inicio de la menstruación y que desaparecen en la semana siguiente a la menstruación.	
B) Uno o más de los siguientes síntomas deben estar presentes: C) Uno o más de los siguientes síntomas debe, además de los del criterio B, presentes hasta alcanzar un total de 5:	1. Marcada labilidad afectiva (cambios de humor). 2. Irritabilidad intensa o enojo o aumento en conflictos interpersonales 3. Ánimo deprimido, sentimientos de desesperanza o de desaprobación. 4. Ansiedad, tensión, sentimientos de estar ‘al límite’. 5. Disminución en el interés por actividades habituales. 6. Dificultad para concentrarse. 7. Letargo, fatigabilidad o falta de energía. 8. Cambio en el apetito, apetito excesivo o proclividad hacia algunos alimentos. 9. Insomnio o Somnolencia 10. Sensación de estar abrumada o fuera de control. 11. Hinchazón de las mamas, cefaleas, dolores musculares o articulares.

D) El trastorno interfiere con el trabajo, el colegio, actividades sociales habituales o con las relaciones interpersonales.	1. Evitación de actividades sociales, 2. Disminución de la productividad y de la eficiencia en el trabajo o en el colegio.
E) El trastorno no es sólo una exacerbación de los síntomas de otra alteración.	Por ejemplo de: 1. Trastorno depresivo mayor 2. Trastorno de pánico 3. Trastorno distímico 4. Trastorno de la personalidad
F) Los criterios A, B y C deben ser confirmados mediante evaluaciones diarias prospectivas durante un mínimo de dos ciclos sintomáticos consecutivos.	

Tabla 1. Criterios diagnóstico especificados para TDPM (APA, 2013).

Contrario a lo referido en el criterio E, a ciertos trastornos pueden agregarse exacerbaciones premenstruales en los síntomas del trastorno diagnosticado (DSM-V; Bianchi-Demicheli et al., 2002).

Algunas mujeres diagnosticadas con alguna patología han reportado exacerbaciones premenstruales en los síntomas de diversos trastornos, tales como la distimia, trastorno depresivo mayor (TDM), trastorno de pánico y ansiedad generalizada (Kornstein et al., 2005).

Neurobiología del TDPM

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) y Estrés.

En situaciones basales, el eje HHA mantiene un tono circadiano, tanto la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés) como vasopresina (AVP) se

secretan de manera pulsátil. La amplitud en la liberación de CRH y AVP incrementa por la mañana, lo que resulta en un aumento en la concentración sérica de la hormona adrenocorticotropa (ACTH, por sus siglas en inglés) y de glucocorticoides. Dichas variaciones circádicas pueden ser alteradas por cambios en la actividad en general y suelen ser interrumpidos cuando se presenta un estresor (Chrousos, 2007).

La cascada de eventos que lleva a la producción de glucocorticoides (cortisol en humanos, corticosterona en roedores) empieza con la liberación de CRH y AVP, esta última particularmente en situaciones de estrés crónico, en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). CRH y AVP viajan hacia la hipófisis anterior donde estimulan la liberación de ACTH. Ésta interactúa con receptores específicos localizados en la corteza de la glándula adrenal y cuya activación conduce a la síntesis y liberación de glucocorticoides (Gunnar y Quevedo, 2007).

Asimismo, la liberación de glucocorticoides provee una retroalimentación negativa, evitando la sobre-activación del eje y restableciendo la homeostasis del organismo (McCann, et al., 2000). Los glucocorticoides tienen dos tipos de receptores: el receptor a mineralocorticoides (MR) y el receptor a glucocorticoides (GR). El primero juega un rol importante cuando los niveles de glucocorticoides están en rangos basales y se ha reportado que aproximadamente el 80% de estos receptores está *ocupado* en estas condiciones. Por el contrario, el receptor a glucocorticoides se encuentra *ocupado* durante el pico del ciclo circadiano o cuando un estresor eleva la concentración circulante de glucocorticoides (de Kloet et al., 1998; Gunnar y Quevedo, 2007).

Tanto el GR como el MR se encuentran en abundancia en regiones cerebrales como el hipocampo (de Kloet et al., 1998), lo que permite a esta estructura detectar un amplio rango de concentraciones circulantes de glucocorticoides y participar en la regulación por retroalimentación negativa del eje HHA (Feldman y Weidenfeld, 1999). Debido a lo anterior, se ha propuesto que niveles altos de receptores en el hipocampo a glucocorticoides se traducen en un control eficaz de la terminación de la respuesta al estrés, mientras que niveles bajos se relacionan con una regulación lenta o empobrecida de esta respuesta haciendo que la reacción del eje HHA sea más prolongada (Meaney y Szyf, 2005)

Asimismo, se ha observado que en el hipocampo coexiste una importante población de neuronas CRHérgicas, y que CRH es liberado durante el estrés (Chen et al., 2012; Kim et al., 2002). Las células productoras de CRH en el hipocampo son interneuronas que a su vez pueden inhibir de manera transináptica la actividad del PVN a través de la liberación de GABA (Gunnar y Quevedo, 2007; Jankord y Herman, 2008; Maras y Baram, 2012). Al parecer, los estímulos eferentes del hipocampo llegan a neuronas en el área preóptica medial, hipotálamo dorsomedial, núcleo del lecho de la estría terminal, entre otros que conectan con el PVN (Herman et al., 1998, Herman et al. 2002). Las áreas mencionadas están densamente pobladas por neuronas GABAérgicas, mismas que proyectan hacia el PVN permitiendo la inhibición del eje HHA en respuesta a estímulos estresantes (Herman, 2003).

Neuroesteroides y estrés

Se sabe que la progesterona y sus metabolitos 3α , 5α -reducidos forman parte activa en la funcionalidad del sistema GABAérgico y del HHA en respuesta al estrés (Engel y Grant, 2001; Girdler y Klatzkin, 2007). La alopregnanolona (3α -hidroxi- 5α -pregnano-20-

Uno o $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydroprogesterona, ALO) es considerada un modulador alostérico positivo del receptor ácido gamma-aminobutírico tipo A (GABA-A) (Hosie et al., 2007). Como es sabido, el receptor GABA-A es una estructura pentamérica conformada por varias subunidades (α (1-6), β (1-3) y γ (1-3), δ o ε) que media la mayoría de las respuestas de inhibición rápida en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Hevers y Lüddens, 1998). Entonces, la interacción receptor GABA-A - ALO tiene como resultado un aumento de la actividad inhibitoria del GABA mediante la afluencia de cloro (Cl^-), permitiendo regular a la baja el eje HHA mediante la inhibición de las neuronas de CRH (Sarkar et al., 2011).

La ALO funge como un regulador neuroendocrino implicado en respuestas homeostáticas del organismo. En este sentido, estudios en animales han mostrado que en respuesta a un estresor, por ejemplo el someterlos a Nado Forzado o exposición a dióxido de carbono, se activa el HHA y disminuye la actividad inhibitoria de GABA a través del receptor GABA-A en el hipocampo y la corteza cerebral (Biggio et al., 1990). Minutos después (30 a 70), las glándulas adrenales producen ALO y $3\alpha, 21$ -dihidroxi- 5α -pregnano-20-ona (alotetrahydrocorticosterona, THDOC) incrementando los niveles de éstos esteroides neuroactivos a nivel plasmático y cerebral (Barbaccia, Serra, Purdy y Biggio, 2001), lo que tiene como consecuencia el incremento del tono GABAérgico y la inhibición del HHA (Barbaccia et al., 1996; Girdler y Klatzkin, 2007).

Hipótesis de la etiología del TDPM

A pesar de que la etiología del SPM y TDPM no están comprendidas en su totalidad, la literatura sugiere que la sintomatología es el resultado de la interacción entre la neurotransmisión GABAérgica, hormonas sexuales y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) (Breech y Braverman, 2009).

La sintomatología del SPM y TDPM está relacionada a una caída abrupta en los niveles de progesterona y ALO que se presenta hacia la fase lútea tardía del ciclo menstrual (Ströhle et al., 2000).

Se ha reportado que personas con SPM presentan una reducción considerable en los niveles de progesterona y ALO en comparación con personas que no lo padecen (Bernardi et al., 2004). Asimismo, los niveles elevados de ALO correlacionan positivamente con la mejoría de los síntomas que reportan las pacientes (Monteleone et al., 2000), lo que supone que dicho metabolito tiene un papel importante en la etiología del SPM (Bernardi et al., 2004).

Al presentarse la exposición prolongada a progesterona, seguida de una caída abrupta de los niveles de este esteroide neuroactivo durante la fase lútea tardía, se propone que el receptor GABA-A puede presentar cambios en las subunidades que lo conforman. Por ejemplo, se ha reportado un aumento en la expresión de la subunidad $\alpha 4$ en los receptores GABA-A, localizados en el hipocampo de la rata, después de la administración crónica con progesterona durante el periodo de abstinencia posterior que tiene como consecuencia la insensibilidad a las benzodiazepinas (Concas et al., 1998; Gulinello et al., 2001; Smith et al., 1998).

Más aún, en un estudio realizado por Hsu y Smith (2003) se encontró que la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 4$ resultante de la abstinencia a progesterona, conlleva a una disminución del control inhibitorio mediado por GABA en el hipocampo, lo cual se revierte al bloquear la expresión de la subunidad $\alpha 4$. El incremento en la excitabilidad en esta estructura límbica puede ser relevante en la regulación mediada por GABA sobre el eje HHA y que éste se vea alterado por la supresión abrupta de progesterona.

Tomando en cuenta las evidencias mencionadas, se propone que las hormonas gonadales ejercen influencia activa sobre la regulación del sistema GABAérgico (Hsu y Smith, 2003) y el eje HHA (Patchev et al., 1996) y que la alteración en estos componentes puede tener como resultado conductas y síntomas representativos, como la ansiedad, reportados en el TDPM (Girdler y Klatzkin, 2007; Smith et al., 2007).

Tratamiento del TDPM

A finales de los 90's se mostró que los anticonceptivos orales que contienen etinil estradiol (30 µg) y drospirenona (3 mg) mejoran el estado de ánimo y la calidad de vida durante la fase lútea en población no clínica (Rapkin, 2005). En suma a esto, se reporta que el anticonceptivo *YAZ*, que combina etinil estradiol (20 µg) y drospirenona (3 mg), al ser administrado en un intervalo de 24/4 (24 días de ingesta y 4 días de no ingesta) a mujeres con TDPM, reduce los síntomas premenstruales emocionales y físicos al ser comparado con un grupo placebo (Pearlstein et al., 2005; Yonkers et al., 2005). Sin embargo, existe aproximadamente un 40% de mujeres que no responde al tratamiento contraceptivo y que, en algunos casos, éste empeora su condición (Halbreich, 2008).

Debido a la hipótesis de que el TDPM y SPM pueden ser causados por una deficiencia de progesterona (Bäckström et al., 2003, Contreras et al., 2006), uno de los tratamientos propuestos es la administración de este esteroide, ya sea en tabletas sublinguales, supositorios vaginales, etc. durante la fase lútea (Ford et al., 2006). Sin embargo, no existen muchos reportes que apoyen esta idea. Recientemente se ha demostrado que la progesterona es efectiva en la reducción de síntomas físicos, mas en los emocionales parece tener el efecto contrario (Cunningham et al., 2009).

En los casos más severos de TDPM se ha utilizado como tratamiento la supresión de la ovulación por medio de agonistas de la Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH, por sus siglas en inglés), lo que provoca la regulación a la baja de la expresión de receptores a GnRH en el hipotálamo. La seguridad del uso de largo plazo de este tratamiento no es del todo conocida, pero parece tener efectos secundarios considerables como hirsutismo (crecimiento excesivo de vello), posible teratogenicidad (Halbreich et al., 1991) e incremento en el riesgo de padecer osteoporosis (Wyatt et al., 2001).

Otro de los tratamientos para el TDPM consiste en administrar antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRSs). Se ha observado que del 60 – 70 % de las mujeres responde a este tratamiento (Steiner y Soares, 2008). Las dosis de ISRSs que son efectivas para el tratamiento del TDPM son similares o ligeramente más bajas que las dosis recomendadas para el tratamiento del TDM. En un meta-análisis realizado con 29 estudios en 2964 mujeres se concluyó que la administración continua de ISRSs es más efectiva que la administración intermitente para el tratamiento del SPM y TDPM (Shah et al. 2008). Sin embargo, la Food and Drug Administration ha aprobado tanto la administración continua como intermitente de fluoxetina, sertralina y paroxetina como tratamiento para mujeres que padecen TDPM (Pearlstein y Steiner, 2008).

También se sabe que ciertas modificaciones en el estilo de vida tales como realizar ejercicio físico, dietas específicas y un reencuadre positivo de la percepción de la mujer hacia su periodo menstrual pueden disminuir los síntomas del SPM y del TDPM (Morse, 1999). En este último punto, uno de los métodos utilizados es la terapia cognitiva conductual (TCC), la cual podría ser considerada como un tratamiento efectivo para mujeres con TDPM, sin embargo sólo existen dos estudios en los que se demuestra efectividad sobre el grupo control (Blake et al., 1998).

Por ejemplo, en un ensayo clínico en el que se analizó el resultado de la administración diaria de 20 mg de fluoxetina, 10 sesiones individuales de TCC o su combinación en mujeres con TDPM, los resultados mostraron que la tasa de eficacia a los 6 meses fue similar entre los 3 tratamientos, sin embargo, después de un año, las mujeres que habían recibido las sesiones de TCC reportaron mejor manejo del estrés que las que habían recibido sólo fluoxetina (Hunter et al., 2002). Según Morse (1999) al replantear positiva y racionalmente las percepciones de las experiencias relativas al ciclo menstrual se ayuda a disminuir las emociones negativas hacia los síntomas pre y perimenstruales.

Además del replanteamiento positivo de las percepciones, un factor importante que ayuda para la contención del estrés y sus efectos negativos es la interacción social. Según Taylor et al. (2000) las hembras de diferentes especies crean, mantienen y utilizan al grupo social para manejar condiciones estresantes. El vínculo de afiliación parece ser más fuerte cuando éste se da de mujer a mujer y ellas parecen estar más satisfechas que los hombres con el apoyo que reciben de su grupo social.

Más aún, el desarrollo social es una de las áreas que sufre mayor impacto negativo al presentarse un padecimiento psiquiátrico (Vittengl et al., 2009). La TCC ha demostrado que el entrenamiento en habilidades sociales produce resultados positivos en la interacción e incluso, en la reincorporación social de personas que padecen algún trastorno psiquiátrico (Granholm et al., 2008; Ito et al., 2008; Miklowitz et al., 2008; Singh y Hope, 2009; Vittengl et al., 2009) por lo que la TCC podría ser útil en el abordaje no farmacológico del TDPM.

En este sentido, uno de los intereses del presente trabajo es estudiar el efecto de una condición experimental que facilita la interacción social y que pudiera proponerse como alternativa no farmacológica en un modelo animal para el estudio del SPM y TDPM.

Capítulo 2

Modelos Animales para TDPM

Un modelo animal es un intento de reproducir una enfermedad humana en un animal de laboratorio (Kalueff y Tuohimma, 2004). Los modelos animales en psicofarmacología, se basan en cambios conductuales provocados mediante manipulaciones del ambiente interno y externo, asumiendo que las manipulaciones en el ambiente son análogas a aquellas que inducen la patología en el humano (Willner, 1997).

Retomando la hipótesis de que el TDPM puede ser causado por una caída dramática de los niveles de progesterona, Gallo y Smith (1993) probaron que la suspensión de la exposición crónica a progesterona aumenta la respuesta de ratas hembras a un estímulo eléctrico usando el modelo de enterramiento defensivo, el cual es utilizado para evaluar conductas tipo ansiedad (Pinel y Treit, 1978). Así los autores proponen que la abstinencia a la administración crónica de 500 microgramos de progesterona (diariamente, por vía subcutánea, durante cuatro días) genera un estado de ansiedad superior al observado en animales control. Así mismo, Saavedra et al. (2006) mostraron que el mismo esquema de administración y posterior abstinencia a progesterona induce un aumento en la expresión de conductas tipo ansiedad y depresión. En este sentido y considerando que dos de los cambios conductuales observados en el TDPM son el aumento de la ansiedad y depresión, es posible proponer que este modelo es útil para promover conductas inducidas por abstinencia a progesterona (Li et al., 2012; Löfgren et al., 2009).

Por otra parte, Schneider y Popik (2007) propusieron un modelo animal basado en la evaluación del nivel de agresividad de ratas ciclantes. En este modelo los autores observaron que ratas sometidas al paradigma Intruso-Residente durante la fase de metaestro del ciclo

estral, caracterizada por la caída importante en los niveles de estrógenos y progesterona, muestran mayor agresividad y aumentan la expresión de conductas tipo depresión. A su vez, la expresión de estas conductas se exagera si hembras en metaestro son estresadas previamente (Schenider y Popik 2007).

Cepa de ratas Wistar Kyoto

La cepa de ratas Wistar Kyoto (WKY), que se desarrolló a partir de la cepa Wistar, se ha propuesto como un modelo animal para el estudio experimental de depresión y ansiedad. Esto se basa en la observación de que constantemente muestran respuestas conductuales y fisiológicas endocrinas exageradas cuando son sometidas a estrés en comparación con otras cepas tales como Sprague-Dawley (Rittenhouse et al., 2002), Wistar (Djordjevic et al., 2007) y Fischer-344 (Paré y Redei, 1993).

Se reporta que la cepa WKY es susceptible a manifestar conductas de desesperanza en el paradigma de Desesperanza Aprendida y en la prueba de Nado Forzado y demuestra menos actividad en la prueba de Campo Abierto; es propensa a la conducta de congelamiento y el comportamiento pasivo en otros paradigmas experimentales (Paré y Redei, 1993), manifiestan algunos signos de depresión como anhedonia, retraso psicomotor y respuestas tipo ansiosas ante estímulos neutros después de ser expuestas a estrés (Lei et al., 2009).

Asimismo presentan una sobreactivación del eje HHA, lo cual promueve una hiperreacción a estímulos estresantes. Por ejemplo, la cepa de ratas WKY en comparación con las Wistar produce niveles exagerados y constantes de corticosterona y ACTH cuando es sometida a situaciones de estrés agudo (Paré y Redei, 1993; De la Garza y Mahoney, 2004).

Siguiendo a De la Garza y Mahoney (2004), estudios farmacológicos indican que existe una alteración en el funcionamiento en los sistemas de neurotransmisión de

norepinefrina , serotonina (5-HT) y dopamina en las ratas WKY. Por ejemplo, esta cepa muestra un incremento en la expresión del transportador de NE en hipocampo y amígdala, regiones relacionadas con la respuesta a estrés.

A pesar de que se tiene evidencia de las alteraciones en distintos sistemas de neurotransmisión, aún no se tiene una evaluación integral del perfil neuroquímico de las ratas WKY como lo hay de su cepa progenitora, las ratas Wistar.

En el caso de las hembras WKY, se encontró que durante la fase de proestro/estro del ciclo estral desarrollan más úlceras, son más reactivas al estrés y presentan índices mayores de desesperanza conductual (inmovilidad) en comparación con las hembras en fase de diestro y con los machos de la misma cepa (Paré y Redei, 1993).

Aunado a estos datos, nuestro grupo de trabajo ha constatado que la supresión brusca de progesterona en ratas WKY aumenta la conducta de inmovilidad en la prueba de Nado Forzado (modelo animal para evaluar la conducta tipo depresión) al ser comparadas con el grupo control. A su vez, la conducta tipo ansiedad se exagera en ratas tratadas bajo el esquema de supresión de progesterona en la prueba de enterramiento defensivo al ser comparadas con animales tratados con vehículo (Sollozo-Dupont, datos no publicados).

Asimismo, se encontró que el efecto tipo antidepresivo y ansiolítico del estradiol y la progesterona, observados en la cepa Wistar, no se presenta en ratas WKY (Cilia-García, 2006) y que la administración de ALO tiende a inducir un efecto tipo ansiogénico en el modelo de enterramiento defensivo en esta última cepa (Pedraza-Castro, datos no publicados). Estos datos indican que en las ratas WKY la regulación del funcionamiento del eje HHA en respuesta al estrés, así como los efectos de los esteroides neuroactivos, están alterados.

Con base en las evidencias que indican una coexistencia de manifestaciones de ansiedad, de depresión y alteraciones en el sistema de respuesta al estrés, se propone que la cepa WKY podría ser un modelo útil para el establecimiento de correlatos fisiológicos y conductuales del TDPM, desorden en el que convergen estados ansiosos – depresivos.

Condiciones experimentales: modulación en la ansiedad y respuesta a estrés

Ambiente Enriquecido.

El ambiente enriquecido (AE) para animales de laboratorio consiste en exponerlos a condiciones de alojamiento que mejoran la estimulación sensorial, cognitiva y motora, en comparación con las condiciones normales de alojamiento, que son consideradas como *empobrecidas* (Dhanushkodi y Shett, 2008).

En la mayoría de los paradigmas experimentales de enriquecimiento ambiental, usualmente se aloja un número de animales mayor al habitual, juntos, en cajas más grandes y amplias que contienen una variedad de objetos que son cambiados diariamente. Esta configuración otorga la novedad al medio ambiente, lo que a su vez provee estimulación cognitiva diferente cada día, en cuanto a la formación de memoria espacial e interacción social. Los objetos comprenden, por lo general, juguetes de diferente forma y color para la estimulación visual, objetos de madera de diversas texturas para la estimulación sensorial, túneles de diferentes formas para la exploración espacial y ruedas para ejercicio voluntario para estimular la actividad motora. No obstante, actualmente no existe un consenso acerca de cuáles paradigmas de enriquecimiento ambiental son ideales para obtener los máximos efectos benéficos sobre la conducta y el funcionamiento cerebral (Nithianantharajah y Hannan, 2006).

De acuerdo con Segovia, del Arco y Mora (2009) al vivir en un ambiente enriquecido, el cerebro de los animales sufre cambios morfológicos y moleculares que conducen a mejoras en el aprendizaje y la memoria. También, se propone que el AE puede fungir como protector de los efectos negativos de la exposición a estrés intenso o incontrolable e incluso revertir dichos efectos (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Fox, 2006). En general, el AE parece promover el bienestar general, físico y psicológico, de los animales.

Una de las ventajas del AE es el enriquecimiento social, es decir, que los animales son alojados, por lo general, en grupos de 6 – 12 animales, proporcionado así la oportunidad para las interacciones sociales (Fox et al., 2006). La interacción social parece ser un elemento importante en la contención del estrés en ratas hembra ya que, según la teoría de Taylor et al., (2000) las hembras (animales y humanos) pueden afiliarse selectivamente por un proceso de “*befriending*” mediado por oxitocina principalmente, que es la creación de redes de asociación que proveen recursos de protección bajo situaciones de estrés.

Un estudio en ratones hembra realizado por Curley et al. (2009), mostró que el enriquecimiento social mediante la crianza comunal incrementa la densidad de unión al receptor de OT en hipotálamo. A su vez, los roedores desplegaron mayor conducta de exploración en la prueba de campo abierto, lo que se traduce en una reducción del comportamiento tipo ansioso.

Los animales expuestos a AE han mostrado una reducción en medidas relacionadas con emocionalidad tales como defecación y congelamiento (Klein et al., 1994). También parecen estar más relajados a la hora de ser manipulados por el experimentador (Van de Weerd et al., 2002), y presentan mayor conducta de juego (Boinski et al., 1999). Más aún, un estudio con la prueba de campo abierto confirmó que el AE tiene un efecto ansiolítico de largo plazo (Brenes-Sáenz, Villagra y Fornaguera, 2006). y, parece ser, que las hembras

tienen mejor respuesta al AE debido a que son más reactivas al estrés que los machos. (Fox et al., 2006).

Por otra parte, se ha reportado que el AE induce la neurogénesis hipocampal (Nilsson et al., 1999), incrementa el peso total del cerebro de los animales (Rosenzweig y Bennet, 1972) aumenta la densidad neuronal y el número de espinas dendríticas (Turner y Greenough, 1985). Es posible que estas mejoras impacten en el procesamiento de las emociones y por lo tanto, en las respuestas conductuales ante el estrés.

En un estudio reciente se reportó que el AE redujo los niveles de corticosterona en ratas WKY, a su vez que redujo el tiempo de inmovilidad en la prueba de Nado Forzado (Rosenfeld y Weller, 2012). Estos hallazgos son de importancia para reforzar la propuesta de que el AE es particularmente efectivo en la protección y/o reversión de los efectos del estrés en animales que son altamente ansiosos (Klein et al., 1994; Fox et al., 2006).

Por otra parte, al ser un paradigma no invasivo y cuya manipulación es solo ambiental, es posible proponer al AE como herramienta de tratamiento para padecimientos como el TDPM, en los cuales es necesaria la investigación de procedimientos no farmacológicos (Brenes-Sáenz, Villagra y Fornaguera, 2006).

Ambiente Enriquecido y eje HHA.

Diversos estudios han demostrado los beneficios que se obtienen al estimular física y cognitivamente a los animales que son expuestos a enriquecimiento ambiental. Se ha hecho mención de que el AE puede atenuar las respuestas del eje HHA mediante la disminución de hormonas asociadas a la respuesta de ansiedad ante estrés.

Según Welberg et al. (2006), el enriquecimiento ambiental normaliza la respuesta del eje HHA ante una situación de estrés agudo o estrés crónico leve, reduciendo los niveles de

ACTH, corticosterona y adrenalina que se liberan en respuesta a ellos. También, se reporta una reducción en la concentración de dichas hormonas al exponer al animal a un estresor como la manipulación habitual aguda.

Asimismo, animales expuestos a enriquecimiento presentan un decremento en los niveles de ACTH después de recibir una inyección de solución salina e incluso, ante un estresor más severo como restricción de espacio por 20 minutos en comparación con animales que no tuvieron ambiente enriquecido (Schrijver et al., 2002).

En este sentido, animales bajo condiciones de AE expresan un incremento en los niveles de GR en el hipocampo (Olsson et al., 1994; Nilsson, et al., 1999). Este incremento en los niveles de GR podría extenderse hacia la retroalimentación negativa del eje HHA suprimiendo la liberación de ACTH y corticosterona (de Kloet et al., 2008) y podría constituir el mecanismo de acción detrás de los efectos ansiolíticos del AE (Larsson et al, 2002).

Estrés Crónico.

El modelo de estrés crónico consiste en exponer a ratas o ratones, secuencialmente, durante varios días, a una serie de factores de estrés (Willner, 1997). En uno de los primeros estudios sobre estrés crónico, se exponía al animal a choques eléctricos, cambios drásticos de temperatura, pinzamiento de cola, entre otros estresores y se observó que éstos causaron una reducción en la ingesta de soluciones dulces. Esta reducción en el consumo de sacarosa fue interpretada como una deficiencia en el procesamiento de recompensa análogo a la anhedonia (Katz, 1982), un síntoma central en la depresión mayor (APA, 2013).

Se ha reportado que los animales estresados crónicamente presentan mayor conducta de inmovilidad en el modelo de Nado Forzado, lo que se traduce como un aumento en la

conducta tipo depresiva (Robbins et al., 2007; Kim et al., 2011) e incremento en conductas tipo ansiedad en la prueba de campo abierto (Huang et al., 2013; Chiba et al., 2012) y en el laberinto de brazos elevados (Chiba et al., 2012).

Asimismo, se ha observado que el estrés crónico tiene efectos adversos como el aumento la frecuencia cardiaca (McDougall et al., 2000) y aumento de la nocicepción (Robbins et al., 2007), regulación a la baja del receptor 5HT-1A y GR en hipocampo (Hill et al., 2012); disminución de dopamina y de los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (Chiba et al., 2012) y su receptor, TrKB en hipocampo (Maghsoudi et al., 2014).

Aunado a esto, la generación de nuevas neuronas se ve afectada por exposición a estrés crónico. Diversas etapas del proceso neurogénico parecen ser sensibles ante diversos estresores, afectando la proliferación y sobrevivencia neuronal al disminuir el número de células en relación a animales no estresados previamente (Vega-Rivera et al., 2014).

Se ha planteado que el EC constituye un modelo animal análogo de las situaciones desfavorables por las que se transita en diversos periodos de la vida y ser un detonante de depresión (Hill et al., 2012) y ansiedad (Campos et al., 2013). En el presente trabajo, se propone el modelo de EC con el fin de elucidar si éste es capaz de exacerbar la conducta tipo ansiedad inducida por abstinencia a progesterona y el impacto que tiene en la actividad del eje HHA.

Estrés Crónico y eje HHA.

Diversos estudios en roedores han mostrado un incremento en la expresión de RNAm de CRH y AVP en respuesta a estrés crónico, activando la respuesta del eje HHA (Ma y Lightman, 1998; Gunnar y Quevedo, 2007).

El resultado final de la activación del eje HHA, como se sabe, es la secreción de glucocorticoides. Una de las consecuencias de la exposición a estrés crónico es la hipersecreción de glucocorticoides provocando la regulación hacia la baja de sus receptores (GR) (Jankord y Herman, 2008) lo que da como resultado en un exceso en la secreción de CRH y AVP, contribuyendo en la patofisiología de trastornos relacionados con la ansiedad y el estado de ánimo (Hauger et al., 2006).

Se ha demostrado que la exposición al frío, al estrés por inmovilización y al aislamiento induce un incremento de ACTH mayor en ratas WKY en comparación con ratas Wistar (Djordjevi et al., 2007).

En relación a las ratas WKY, en un estudio previo se encontró que después de someterlas a estrés crónico por restricción de espacio o por la administración crónica de corticosterona, la respuesta del eje HHA está atenuada (Hernández et al, 2013), al tiempo que se observa la disminución de la conducta exploratoria, esto se traduce en un aumento en la expresión de miedo (Gutiérrez-Ortíz, 2009). Estos resultados sugieren que al igual que en los animales que son sometidos a estrés crónico social, la activación prolongada del eje HHA puede conducir a alteraciones en el sistema homeostático de respuesta al estrés en esta cepa. Asimismo, estudios no publicados muestran que las ratas WKY son menos sensibles al tratamiento con benzodiazepinas (diazepam) lo que sugiere alteraciones en la sensibilidad del receptor GABA-A (Rogel Salazar, datos no publicados), impactando en las respuestas ansiosas manifestadas por esta cepa de ratas.

Capítulo 3

Planteamiento del Problema

El TDPM es un desorden en el que convergen síntomas de ansiedad y depresión e influyen negativamente en un porcentaje considerable de mujeres en edad reproductiva. A pesar de que son varias las opciones de tratamiento disponibles, la respuesta a éstos es diversa y en algunos casos nula. Por lo tanto, es necesario evaluar otras alternativas incluyendo las no farmacológicas. Algunas de las alternativas propuestas para el tratamiento del TDPM incluyen incorporar cambios en la dieta, ejercicio físico, reencuadre de la percepción del trastorno y/o creación de redes sociales de soporte.

Por otra parte, la cepa de ratas WKY, es una cepa vulnerable al estrés en la que se presentan signos conductuales de ansiedad y depresión, y responde a la inducción de abstinencia a progesterona, por lo que puede ser utilizada como modelo animal para el estudio del TDPM. Esta cepa no responde al tratamiento farmacológico con hormonas o ISRS propuesto para el tratamiento del TDPM, por lo que podría ser útil para la evaluación de un abordaje no farmacológico.

Dado que el AE está enfocado a disminuir los efectos del estrés en animales e incorpora algunos de los elementos de las terapias no farmacológicas propuestas para el tratamiento del TDPM, es de interés analizar si la exposición al enriquecimiento ambiental puede disminuir la ansiedad inducida por la abstinencia a progesterona en una cepa vulnerable al estrés.

Hipótesis

Si las condiciones ambientales modulan la ansiedad inducida por la abstinencia a progesterona; entonces, el ambiente enriquecido la disminuirá, mientras que el estrés crónico la exacerbará.

Objetivo General

Evaluar el efecto del estrés crónico y del ambiente enriquecido sobre la ansiedad experimental inducida por abstinencia a progesterona en ratas de la cepa Wistar y Wistar Kyoto y el impacto en la actividad del eje HHA.

Objetivos Particulares

- Evaluar la ansiedad inducida por la abstinencia a progesterona en ratas Wistar y WKY sometidas a las condiciones de EC y AE.
- Evaluar el funcionamiento del eje HHA en ratas Wistar y WKY sometidas a la abstinencia a progesterona, expuestas a EC y AE después de la prueba de ansiedad.

Capítulo 4

Materiales y Método

Sujetos experimentales.

Se utilizaron ratas hembra de las cepas Wistar y Wistar Kyoto (200 – 250gr) ovariectomizadas, sometidas a ciclo invertido de luz/oscuridad 12/12 horas, con libre acceso a agua y alimento.

Cirugía.

Ovariectomía.

Las hembras fueron anestesiadas con tribromoetanol (10 ml/kg i.p). Se realizó una incisión longitudinal sobre la piel y el músculo del animal hasta exponer los oviductos y los ovarios. Se ligaron los oviductos, se extirparon los ovarios y posteriormente, se suturó el músculo y la piel del animal desinfectando la zona de incisión. Los animales se trasladaron al bioterio de estancia donde permanecieron durante tres semanas antes de ser asignados al grupo experimental correspondiente.

Modelos conductuales.

Modelo de Enterramiento Defensivo.

El modelo de enterramiento defensivo se llevó a cabo en una caja de acrílico (34 X 16 X 24 cm), de una de las paredes de la caja emerge un electrodo electrificado de 7 cm de largo que se sitúa 2 cm por encima de la base. Al hacer contacto con el electrodo el animal recibe una descarga eléctrica de 0.3 mA (estímulo aversivo) que propiciará conductas como la huida, pelea, acicalamiento, entre otras. La conducta defensiva enterramiento y de congelamiento son consideradas expresiones de ansiedad activa y pasiva,

respectivamente, mostradas por los animales (Kalueff y Tuohimma, 2005). En el modelo se cuantificarán los siguientes parámetros:

- Latencia de enterramiento. Es el tiempo transcurrido desde que el animal recibe el primer choque eléctrico hasta que despliega la conducta de enterramiento. Refleja la reactividad del animal (De Boer y Koolhaas, 2003).
- Tiempo acumulativo de enterramiento. Tiempo que el animal invierte en enterrar el electrodo, para lo cual desplaza el aserrín con movimientos rápidos de las patas delanteras y la cabeza. Esta conducta es el reflejo directo de la ansiedad del animal, así a mayor tiempo de enterramiento, mayor ansiedad (Pinel y Treit 1978; De Boer y Koolhaas, 2003).
- Erguimientos (“rearings”). Levantamientos del cuerpo que realiza el roedor en dos patas hasta quedar en posición vertical realizando movimientos de olfateo hacia el aire. Este movimiento es indicativo de la actividad locomotora del animal (Pinel y Treit 1978; De Boer y Koolhaas, 2003).
- Exploración hacia el electrodo. Son los acercamientos que el animal hace a la fuente del estímulo aversivo. Es un indicador de ansiedad o temor, es decir, mayor número de exploraciones hacia el electrodo refleja menor ansiedad (Pinel y Treit 1978; De Boer y Koolhaas, 2003).
- Número de choques recibidos. Número de estímulos que recibe el animal a través del electrodo y es indicativo del temor del animal. Un incremento en este parámetro es interpretado como una disminución de miedo y viceversa (Pinel y Treit 1978; De Boer y Koolhaas, 2003).
- Congelamiento (“freezing”). La postura en cuatro patas con la mirada fija dirigida al electrodo. Esta conducta es considerada como una expresión pasiva de ansiedad (De

Boer y Koolhaas, 2003).

- Inmovilidad. Consiste en la postura de agacharse, acostarse, sentarse o pararse por lo menos en tres pies, con el cuerpo inmóvil a excepción de pequeños y lentos movimientos laterales de la cabeza (escaneo) (De Boer y Koolhaas, 2003).
- Acicalamiento. En un estado natural la conducta de acicalamiento se despliega siguiendo un patrón céfalo-caudal, sin embargo cuando los roedores son sometidos a altos niveles de estrés, rompen con este patrón o se acicalan una sola parte del cuerpo. En este caso se cuantificará el tiempo acumulativo de acicalamiento dirigido al hocico (Kalueff y Tuohimaa, 2005).

Dado que el enterramiento y el acicalamiento son considerados comportamientos tipo ansiedad activos y tanto la inmovilidad como el congelamiento comportamientos tipo ansiedad pasivos (De Boer y Koolhaas, 2003), en el presente trabajo se reporta la sumatoria de conductas activas (enterramiento + acicalamiento) y la sumatoria de conductas pasivas (inmovilidad + congelamiento).

Modelo de campo abierto.

Este modelo se utiliza con el fin de descartar alguna alteración motora, inducida por la manipulación hormonal, que pudiera afectar el desempeño de los animales en la prueba de enterramiento defensivo. Consiste en una caja de plexiglas opaca (40x30x20 cm.) con el piso dividido en 12 cuadros de 11x11 cm. El animal es colocado en una esquina de la caja y un observador cuenta el número de cuadros cruzados que el animal realiza en una sesión de 5 minutos.

Técnicas Bioquímicas.

Radioinmunoensayo

El radioinmunoensayo (RIA) es un ensayo de unión basado en la competencia del ligando frío de las muestras y el marcado, en este caso, corticosterona-iodinada (^{125}I Corticosterone). Para la determinación de corticosterona, se utilizó un kit comercial Coat-A-Count Rat Corticosterone (TKRC1, Siemens Healthcare Diagnostics Inc.; Los Angeles, CA, EUA) y en la estandarización de la curva se utilizaron las siguientes concentraciones de corticosterona: 0, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 ng/ml. Todo el ensayo se realizó por duplicado.

A cada tubo (con anticuerpo para corticosterona) se le adicionaron 50 μL de las soluciones de calibración (curva estándar) o de las muestras experimentales. Se adicionó 1 ml de (^{125}I) corticosterona y los tubos fueron incubados a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, se decantó el contenido y los tubos fueron secados para colocarlos en un contador gamma (ICN Isomedic 4/600) para obtener una relación de cuentas por minuto (CPM), correspondiente a la corticosterona marcada unida al anticuerpo.

La sensibilidad fue de 5.7 ng/ml y las variaciones intra- e interensayo fueron <12.2% y <14.9%, respectivamente. El número de las CPM de la curva estándar y las muestras experimentales se transformaron a ng/ml utilizando el programa de transformación matemática "ENRI" por medio de una regresión logit-log.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

Para evaluar la expresión génica de CRH y GR se utilizó el método de RT-PCR, el cual consiste en generar una cantidad de copias de DNA mediante la retrotranscripción de una hebra de RNA en DNA complementario (DNAc).

Extracción de RNA.

Se utilizó el método de extracción de tiocianato de guanidina 4M (Chomczynski y Sacchi, 1987). Todo el material utilizado fue previamente esterilizado en autoclave (Tuttmauer Brinkmann 2540 M; MA, EUA) durante 40 min a 121°C. Las soluciones utilizadas contenían agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma-Aldrich, México) (0.1% v/v DEPC) y fueron esterilizadas.

El primer día de la extracción a cada muestra se le agregó un volumen de 750µL y 100 µL, para hipocampo y PVN respectivamente, de solución desnaturalizante preparada el mismo día de la extracción. Por cada 1 mL de la solución stock (250 g de tiocianato de guanidina (Sigma-Aldrich, México) disueltos en 293 mL de agua bidestilada estéril tratada con DEPC, 17.6 mL de citrato de sodio 0.075 M a pH 7 (J.T. Baker) y 26.4 mL de sarcosil al 10% en agua bidestilada estéril tratada con DEPC), se agregaron 7 µL de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, México). Todo el procedimiento se realizó a una temperatura de 4°C.

Las muestras se homogenizaron mediante un sonicador (Sonics Vibre Cell Ultrasonic Procesor) máximo durante 5 segundos a 9 Watts. Todos los volúmenes utilizados están calculados en relación del homogenado de la muestra. Se agregaron las siguientes soluciones agitando con vórtex en cada paso: 1 volumen de fenol saturado en agua (Sigma-Aldrich, México), 1/10 de volumen de acetato de sodio 2M, pH 4 (Sigma-Aldrich, México), 3/10 de volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 49:1 v/v (Sigma-Aldrich, México). Las muestras

permanecieron en reposo durante 15 min y posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm, 20 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa, se agregó un volumen de isopropanol frío (Sigma-Aldrich, México) y se almacenaron a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 13800 rpm por 30 min a 4°C, en el caso de hipocampo, y 20 min para el PVN. Se decantaron y secaron, posteriormente se agregaron 500 µL y 200 µL, para hipocampo y PVN respectivamente, de etanol al 75% y se agitó con un vórtex hasta despegar el precipitado de RNA. Se centrifugó nuevamente a 3000 RPM a 4°C durante 12 y 8 min, para hipocampo y PVN, y se repitió el procedimiento hasta completar 3 lavados.

Se extrajo el exceso de etanol con una micropipeta, se colocó la muestra en un concentrador con vacío (Eppendorf Vacufuge TM; NY, EUA) durante 5 min y se obtuvo el precipitado del RNA total, el cual se resuspendió en 20 µL, en el caso de hipocampo, y 10 µL para PVN de agua tratada con DEPC estéril. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer; NY, EUA) (2 µL de muestra en 98 µL de agua desionizada; libre de sales) a 230 nm (determina la concentración de hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias), 260 nm (determina la concentración de ácidos nucleicos) y 280 nm (determinación de proteínas). La relación de la absorbancia del cociente 260/230 nm (se emplea para conocer la pureza de los ácidos nucleicos) de cada muestra para ser procesada fue ≥ 1.5 . La concentración de RNA total se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{RNA}_{\text{TOTAL}} \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{Volumen de dilución}) \left[\frac{(\text{Valor O.D.}_{260}) (40 \mu\text{g}/\mu\text{l}) (50 \mu\text{l})}{1000} \right]$$

O.D.₂₆₀ = Valor obtenido del fotómetro considerando que 40 µg/mL = 1 O.D

50 µL = Factor de dilución

1000 = Factor de conversión de µL a mL

Volumen de H₂O-DEPC que lleva cada muestra para su dilución.

Para verificar la integridad del RNA, las muestras se incubaron para su desnaturalización a 65°C durante 5 min (Lauda E 100 006T; NY, EUA). Se preparó un gel de agarosa al 1% (se calentaron y mezclaron 0.8 g de agarosa (Standard-low; Bio Rad, Hercules CA, EUA) con 15 mL de TBE (5X) y aforándose a 75 mL con agua bidestilada). En este procedimiento se utilizaron cámaras de electroforesis (Thermo Scientific Owl Easycast TM B2; MA, EUA). Para evaluar la integridad de la molécula se obtuvieron las bandas correspondientes al RNA ribosomal de 28S y 18S. La densidad de las bandas debió ser ≥ 1.5 (28s/18s) para que la muestra pudiera ser utilizada para la RT-PCR, las muestras se mantuvieron a -20°C.

Transcripción de RNA.

Se tomaron 1.5 μg de RNA total obtenido de la muestra y se incubaron a 65°C durante 5 min (Lauda E 100 006T; NY, EUA), se centrifugaron durante 5 segundos (Eppendorf Centrifuge 5417C; NY, EUA) y se agregaron 20 μL de la mezcla de reacción para DNAc (tabla 2). Se incubaron durante 2 horas a 37°C (Lauda E 100 006T; NY EUA) y posteriormente se almacenó el DNAc a 4°C.

Solución/Reactivo utilizado	Volumen
Agua tratada con DEPC	8.9 μL
Buffer 5X (Invitrogen) (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl y 15 Mm Mg2Cl).	6.0 μL
Dithiothreitol (DTT) 0.1 M (Invitrogen)	3.0 μL
Deoxinucléotidos –dNTPs- 10 mM (10 mM de cada uno dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro; Invitrogen)	0.6 μL
Oligo poli T 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1.0 μL
Enzima transcriptasa reversa M-MVL RT 200 U/μL (Invitrogen)	0.5 μL

Tabla 2. Mezcla de transcripción de RNA total a DNAc

Procedimiento para la PCR.

Las secuencias de oligonucleótidos (tabla 3) fueron elaboradas en la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se estandarizaron por separado los DNAs de ciclofilina, G₃PDH (oligos control con síntesis constitutiva), CRH y GR para obtener las condiciones óptimas de amplificación de la señal (tabla 4; figura 1 y 2).

Gen	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (3'-5')
CYC	GGG GAG AAA GGA TTT GGC TA	ACA TGC TTG CCA TCC AGC C
G ₃ PDH	GA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC	CAT GAT GGC CAT GAG GTC CAC CAC
CRH	GCC CCG CAG CCG TTG AA	GAC CGC CTC TCC CTC TCC AG
GR	AAG CAC ATC ACA CAT AAA TCT G	TAA ATA AGA GGG AGC AAA CTA CTG G

Tabla 3. Secuencia de Oligonucleótidos utilizada para la amplificación de número de copias.

Oligonucleótido	Cepa	Número de ciclos	Temperatura °C	Concentración (pg/mL)
Ciclofilina	W	21 Hipp / 26 PVN	64	50
	WKY	21 Hipp / 26 PVN	64	50
G ₃ PDH	W	21 Hipp / 21 PVN	64	50
	WKY	21 Hipp / 21 PVN	64	50
CRH	W	28 Hipp / 30 PVN	63	25
	WKY	31 Hipp / 29 PVN	63	25
GR	W	29 Hipp	64	25
	WKY	27 Hipp	64	25

Tabla 4. Estandarización de condiciones para la expresión de oligonucleótidos.

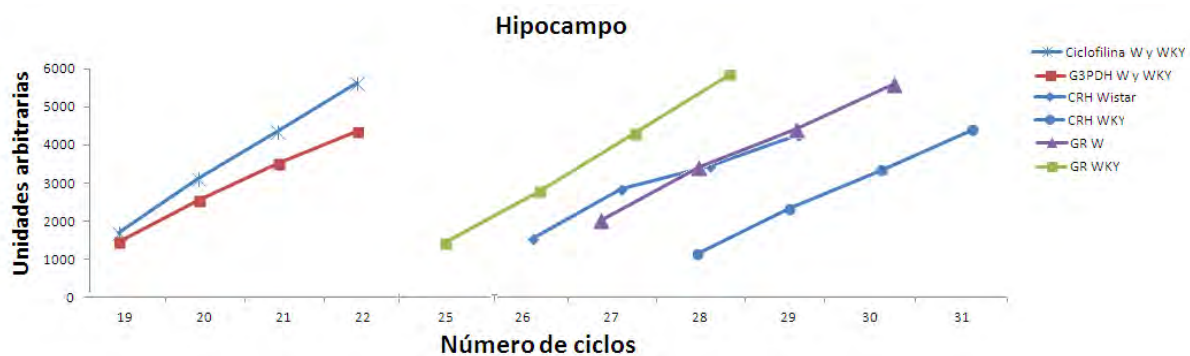


Fig. 1 Optimización metodológica de la técnica RT-PCR. Número de ciclos necesarios para amplificar cada DNAc. Los datos se expresan como la densidad óptica de cada DNAc del producto de la PCR en diferentes ciclos de amplificación en el hipocampo. Los productos de la PCR se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

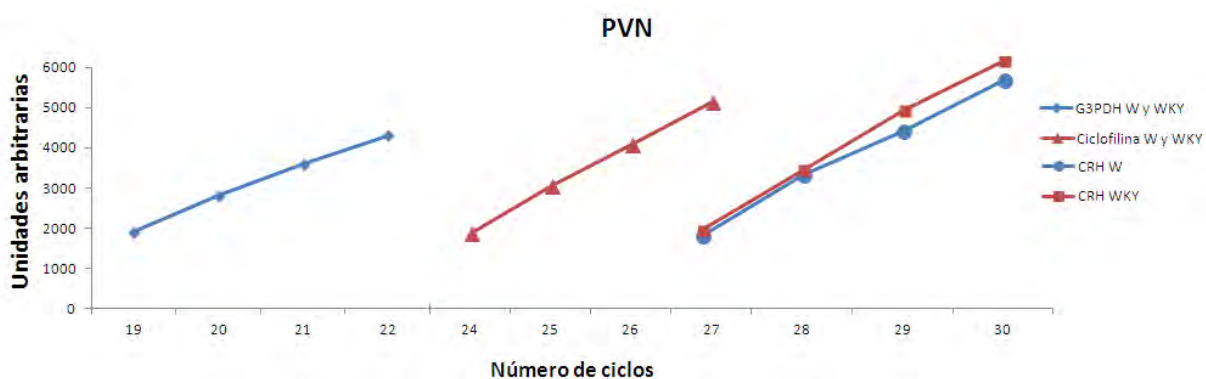


Fig. 2 Optimización metodológica de la técnica RT-PCR. Número de ciclos necesarios para amplificar cada DNAc. Los datos se expresan como la densidad óptica de cada DNAc del producto de la PCR en diferentes ciclos de amplificación en el PVN. Los productos de la PCR se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Por cada 4 μL de muestra se agregaron 46 μL de mezcla de reacción para PCR (tabla 5). Las muestras se colocaron en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, NY, EUA) para su amplificación.

Solución/Reactivo utilizado	Volumen
Agua tratada con DEPC	35 μL
Buffer de Reacción 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3, 100 mM) (Biotecnologías Universitarias)	5 μL
Cloruro de Magnesio 30 mM (Biotecnologías Universitarias)	2.5 μL
dNTPs 10 mM (10 mM de cada uno: dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro (Invitrogen)	1 μL
Oligonucleótidos de iniciación "primers" <i>Sentido</i>	1 μL
Oligonucleótidos de iniciación "primers" <i>Antisentido</i>	1 μL

Enzima Taq polimerasa	0.5 μ L
DNAc	4 μ L

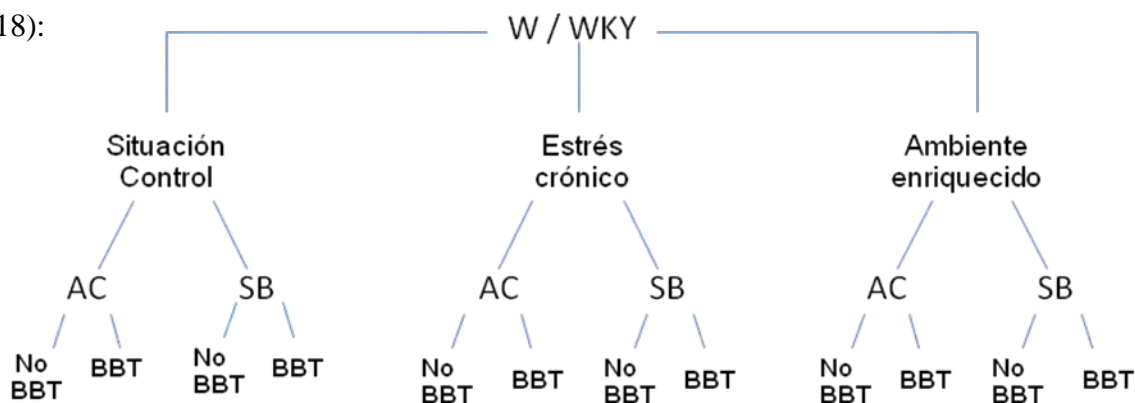
Tabla 5. Mezcla para reacción de PCR (Los volúmenes utilizados fueron modificados para la amplificación de CRH en PVN e hipocampo, en donde se utilizó 1.7 μ L de cloruro de magnesio y 6 μ L de DNAc).

Los genes amplificados fueron semi-cuantificados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (1.5 g de agarosa, 15 ml de TBE 5X aforado a 75 ml con agua milliQ). Se empleó un marcador de peso molecular (DNA Molecular Weight Marker VII-19-1114 pb; Roche Applied Science). Del producto de la PCR se mezclaron 12 μ L del DNAc de interés, 4 μ L de cada DNAc control y para teñir el DNAc 2 μ L del amortiguador de carga (azul de bromofenol; ICN Biomedicals Inc, IL, EUA). El gel se corrió a 100 Volts por 40-50 minutos. Posteriormente, el gel se sumergió en bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, México) a una concentración de 2.5% durante 8 minutos y se lavó con agua por 4 minutos. El gel se colocó en un transiluminador (Advanced American Biotechnology, CA, EUA) y se realizó la semi-cuantificación de las bandas por densitometría utilizando el programa “Advanced American Biotech Imaging 2D” (Advanced American Biotechnology; CA, EUA).

Diseño Experimental.

Ratas hembra adultas de las cepas W y WKY (200 – 250 gr) fueron ovariectomizadas y tres semanas después se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos (n= 15-

18):



AC=Aceite de maíz; SB= Supresión Brusca de Progesterona; BBT= Burying Behavior Test

La exposición al ambiente enriquecido (AE) se realizó por 4 horas diarias durante 30 días consecutivos. Se utilizaron túneles y bolas de plástico, campanas, ruedas para correr, entre otros objetos que fueron cambiados cada sesión (Leal-Galicia et al., 2008). Este paradigma ha mostrado tener un impacto positivo en la preservación de la memoria de corto plazo, así como en el mantenimiento de las sinapsis e incremento del número de neuronas generadas dentro del hipocampo durante el envejecimiento (Leal-Galicia et al., 2008).

El paradigma de estrés crónico (EC) consistió en un programa diario de aplicación de diferentes estresores durante 30 días consecutivos basado en un estudio previo realizado con ratas WKY, en el que se demostró que dicho programa altera la respuesta tipo depresiva, aumentando la conducta de inmovilidad en la prueba de Nado Forzado (Tejani-Butt et al., 1994). Los estresores incluidos en el programa fueron:

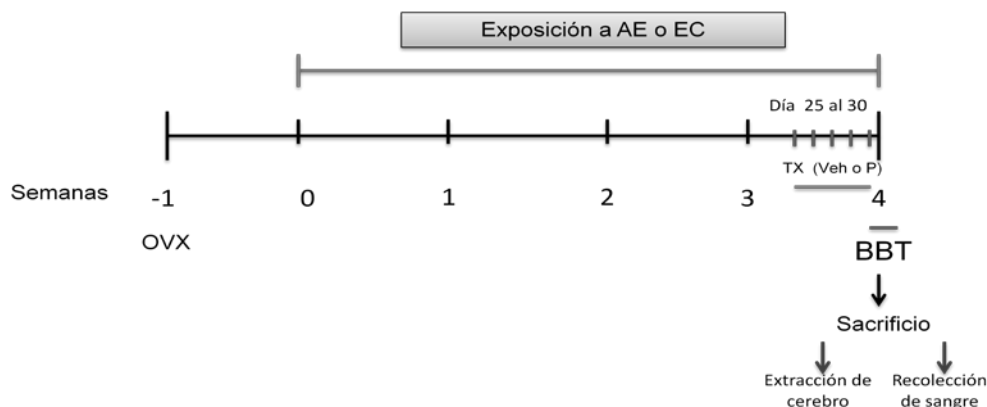
- Choques en las patas (1.0 s, 1.0 mA en un intervalo variable de 10 s.)
- Privación de alimento durante 24 horas
- Nado forzado en agua a 4°C durante 5 min.
- Restricción de movimiento (tubo de 3.8 cm y 18 cm de largo) por 2 horas.
- Privación de agua por 12 horas
- Ciclo invertido luz/oscuridad.
- Hacinamiento, incrementando del número de ratas por caja (10 ratas por caja durante 24 hrs).

Experimento 1. Efecto del estrés crónico y del ambiente enriquecido sobre la ansiedad experimental inducida por la abstinencia a progesterona.

Con el fin de determinar el impacto del EC y del AE sobre la ansiedad experimental inducida por la supresión brusca de progesterona en ratas W y WKY, se formaron tres grupos experimentales para cada cepa, de los cuales uno fue sujeto al AE, otro al EC y otro más que

permaneció en condiciones estándares de bioterio, denominado Situación Control (SC). Durante 30 días los animales fueron sujetos a las manipulaciones conductuales respectivas y a partir del día 25, se les administró progesterona (0.5 mg/rata/ 0.2 ml) o vehículo (aceite de maíz) durante 5 días.

El día 31, y 24 h después de la última administración de progesterona o aceite de maíz, todos los animales fueron probados en el enterramiento defensivo (BBT). Sesenta minutos más tarde, todos los animales fueron sacrificados por decapitación y se colectó la sangre y se extrajo el cerebro para las mediciones respectivas. El grupo que no fue evaluado conductualmente se sacrificó junto con el resto de los animales. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana del Cuidado de Animales (NOM-062-ZOO-1999) y al Comité de Institucional.



AE=Ambiente Enriquecido, EC=Estrés Crónico OVX=Ovariectomía,
Veh=Vehículo, P=Progesterona, BBT=Burying Behavior Test

Experimento 2. Efecto del estrés crónico y del ambiente enriquecido sobre la actividad del eje HHA en animales sujetos a la abstinencia a progesterona.

Con el fin de evaluar el impacto del EC y del AE sobre el funcionamiento del eje HHA, hora después de la prueba conductual, todos los animales fueron sacrificados por

decapitación y se colectó la sangre del tronco del animal para la determinación de los niveles séricos de corticosterona. Así mismo, tras diseccionar el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN, por sus siglas en inglés) en cerebros congelados se evaluó la expresión del RNAm de CRH. En el hipocampo se evaluó el contenido de RNAm del receptor a glucocorticoides (GR) y el RNAm de CRH.

Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico de la conducta se utilizó un ANOVA de dos vías seguido de Student-Newman Keuls como prueba *post hoc*, considerando como factores a) la supresión brusca de progesterona y b) la condición experimental. Las concentraciones séricas de corticosterona se analizaron mediante un ANOVA de dos vías seguido de Student Newman Keuls como prueba *post hoc* y se consideraron como factores a) la supresión brusca de progesterona y b) la exposición a la prueba conductual para cada una de las condiciones experimentales. Cuando fue necesario se aplicó una prueba t de student para hacer comparaciones pareadas.

Para el análisis de la expresión del RNAm de CRH y RNAm de GR los datos fueron normalizados tomando como 100% al grupo alojado en SC, tratado con aceite de maíz y que no fue sometido al enterramiento defensivo. Se llevó a cabo un ANOVA de dos vías seguida de la prueba Student Newman Keuls como prueba *post hoc* considerando como factores la exposición al enterramiento defensivo y a la supresión brusca de progesterona. Para la comparación estadística en relación al grupo control 100% se realizó una prueba t de Student.

Capítulo 5

Resultados

Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la ansiedad experimental en ratas de la cepa Wistar.

En la figura 3 se muestran los resultados referentes a la expresión de las conductas tipo ansiedad activas (enterramiento y acicalamiento) registradas en el modelo de enterramiento defensivo (BBT), en animales a los que se les indujo la supresión brusca de progesterona (SB) o tratados con aceite de maíz que fueron sometidos al estrés crónico (EC) o al ambiente enriquecido (AE). Las barras blancas representan a animales tratados con aceite y las barras oscuras a los que fueron sujetos a la SB.

En general, los animales que fueron sometidos al AE mostraron una reducción en el tiempo acumulativo de expresión de conductas tipo ansiedad activas que los animales que se mantuvieron en condiciones estándares de bioterio (situación control, SC) ($p < 0.05$) y los que fueron sometidos al EC ($p < 0.05$). En los animales tratados con aceite (barras blancas) la exposición al EC no aumentó las conductas activas de ansiedad respecto a los alojados en la SC). Sin embargo, la exposición al AE redujo el tiempo de manifestación de las conductas activas tipo ansiedad en relación al grupo expuesto a EC ($p < 0.001$) y al alojado en la SC ($p < 0.05$). El EC no exacerbó la conducta ansiosa, mientras que el AE la disminuyó en animales tratados con aceite.

Como puede observarse en la figura 3, en comparación al grupo tratado con aceite, la SB (barras oscuras) aumentó el tiempo invertido en la expresión de conductas activas tipo ansiedad en los animales de la SC ($p < 0.05$) como en los sometidos a EC ($p < 0.05$), pero no a AE. Si bien el EC no exacerbó la ansiedad respecto a la SC, el AE fue capaz de prevenir el aumento en la expresión de la conducta ansiosa inducida por la SB. El ANOVA de dos vías

reveló que existe efecto por tratamiento ($F_{1,97}=13.631$ $p<0.001$) y por condición experimental ($F_{2,97}=10.486$ $p<0.001$), pero no por la interacción de factores ($F_{2,97}=0.217$, ns).

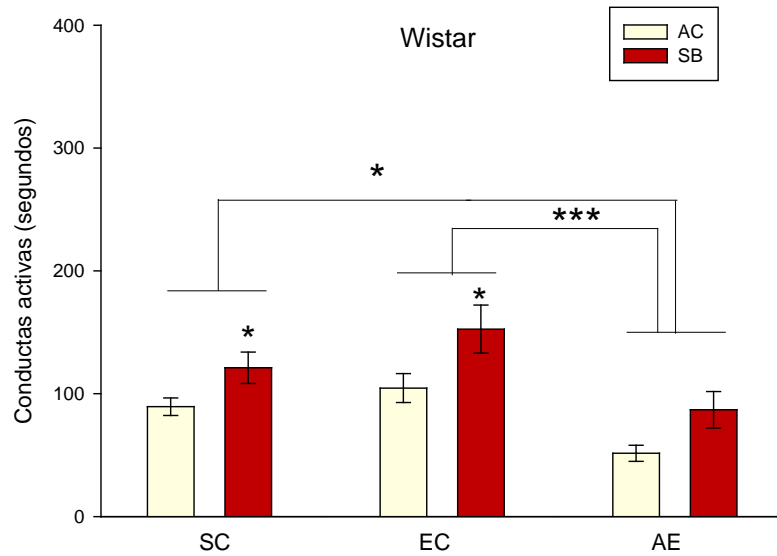


Fig. 3 Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión brusca de progesterona sobre el tiempo acumulativo de conductas activas (enterramiento y acicalamiento) evaluadas en la prueba de enterramiento defensivo. Los datos se presentan como la media \pm EE de $n=15-18$ animales por grupo. AC=Aceite de maíz; SB=Supresión Brusca; SC= Situación control EC=Estrés crónico; AE=Ambiente enriquecido. ANOVA de dos vías. *post hoc* Student Newman Keuls. * $p<0.05$; *** $p<0.001$

En la figura 4 se muestran los resultados de las conductas pasivas presentadas en la BBT por los animales sometidos a la SB o fueron tratados con aceite, sometidos al EC o al AE. Como se observa en los animales tratados con aceite (barras blancas) las diferentes condiciones experimentales (SC, EC, AE) no promovieron cambios en el tiempo acumulativo de expresión de las conductas pasivas tipo ansiedad. Por otra parte, la SB (barras oscuras) aumentó la expresión de conductas ansiosas pasivas sólo en los animales de la SC ($p<0.05$). Los valores del ANOVA de dos vías no revelaron efecto por tratamiento ($F_{1,97}=0.284$, ns), condición experimental ($F_{2,97}=2.351$, ns) pero sí por la interacción de factores ($F_{2,97}=3.104$, $p=0.049$).

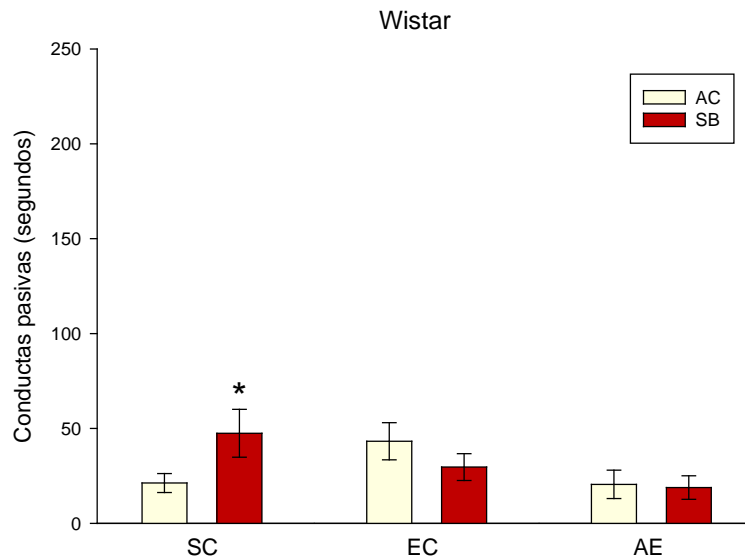


Fig.4 Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión brusca de progesterona sobre el tiempo acumulativo de conductas pasivas (inmovilidad y congelamiento) registradas en la prueba de enterramiento defensivo. Los datos se expresan como la media \pm EE. AC=Aceite de maíz; SB=Supresión brusca; SC= Situación control; EC=Estrés crónico; AE=Ambiente enriquecido. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. * $p < 0.05$

Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la expresión del RNAm de CRH en el PVN, sobre las concentraciones de corticosterona en suero, del RNAm de GR y de CRH en hipocampo como indicadores de la actividad del eje HHA en ratas Wistar.

En todas las gráficas, en las barras blancas se muestran los datos de los animales tratados con aceite y las barras achuradas corresponden a los animales sometidos a la abstinencia a progesterona.

En la figura 5 se muestra la expresión del RNAm de CRH en el PVN de animales alojados en SC tratados con aceite o a los que se les indujo la SB, en respuesta a la exposición al paradigma de enterramiento defensivo (BBT). En los animales tratados con aceite (barras blancas) los niveles del RNAm de CRH no se modificaron por la exposición a la BBT. Sin embargo, en animales sometidos a la SB (barras achuradas) se produjo un aumento en la expresión del RNAm de CRH en el PVN respecto al grupo tratado con aceite ($p < 0.05$) tanto en los que no pasaron por el BBT ($p < 0.05$) como en los que sí pasaron por ese paradigma conductual ($p < 0.001$). Los resultados del ANOVA de dos vías mostraron efecto por

tratamiento ($F_{1,12}=30.774$, $p<0.001$) no así para la exposición a la prueba conductual ($F_{1,12}=0.007$, ns) ni en la interacción de factores ($F_{1,12}=0.876$, ns).

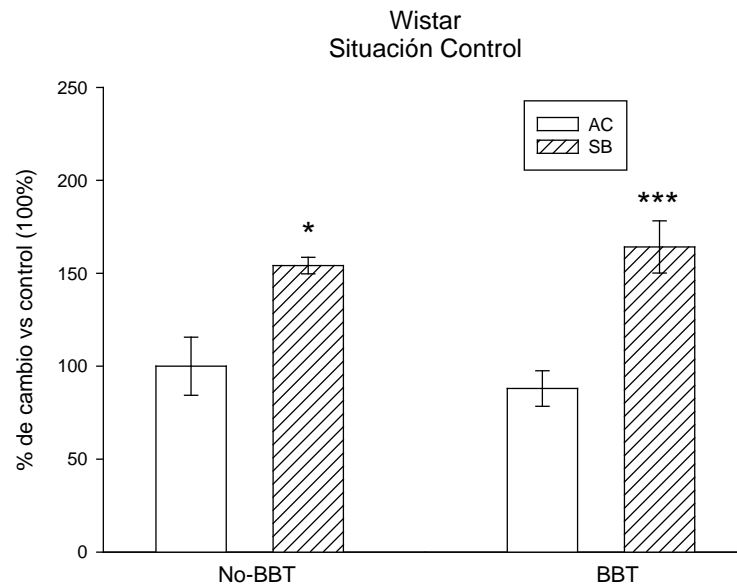


Fig. 5 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en PVN de ratas Wistar alojadas en situación control. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente del DNAc de CRH / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n=3-4$ animales por grupo. El control 100% corresponde al grupo tratado con aceite de maíz sin exposición al BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión brusca de P; BBT= Burying Behavior Test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. * $p<0.05$; ** $p<0.001$

La figura 6 muestra las concentraciones de corticosterona en el suero de los animales de la SC. La exposición a la prueba BBT no provocó cambios en las concentraciones de corticosterona ni en los animales tratados con aceite (barras blancas) ni a aquellos sometidos a la SB (barras achuradas). Los valores del ANOVA de dos vías no revelaron efecto por tratamiento ($F_{1,12}=1.626$, ns), por prueba conductual ($F_{1,12}=0.479$, ns) ni por la interacción de factores ($F_{1,12}=0.457$, ns).

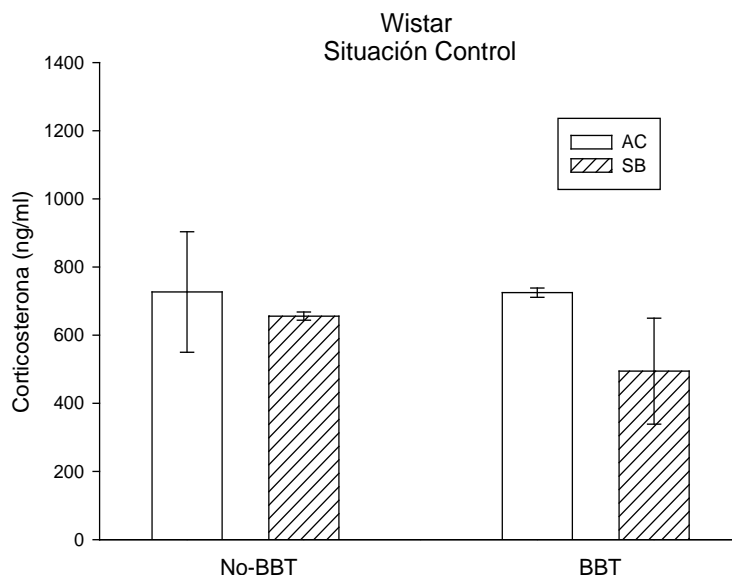


Fig.6 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar alojadas en situación control. Los datos se presentan como la media \pm EE de $n=4$ animales por grupo. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls.

La figura 7 muestra la expresión del RNAm de GR en el hipocampo de la SC. En animales tratados con aceite (barras blancas), la exposición a la BBT no produjo cambios en la expresión del RNAm de GR en el hipocampo. En contraste, la SB (barras achuradas) provocó una disminución en los niveles del RNAm de GR tanto en los animales que pasaron por la BBT como en los que no lo hicieron ($p<0.05$). El ANOVA de dos vías reveló diferencias por tratamiento ($F_{1,12} = 13.586$, $p=0.003$), no así por exposición a la prueba conductual ($F_{1,12} = 0.772$, ns) ni por la interacción de factores ($F_{1,12} = 0.160$, ns).

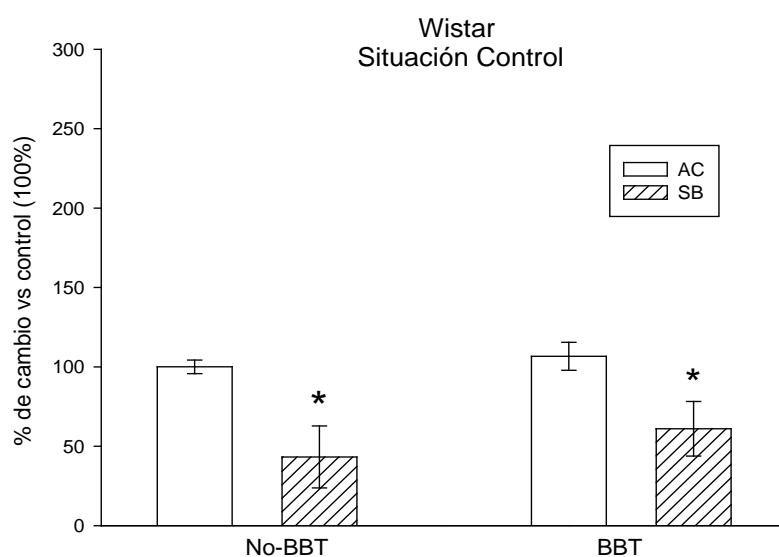


Fig. 7 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar alojadas en situación control. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de GR / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n= 3-4$ por grupo. El control (100%) corresponde al grupo tratado con aceite de maíz que no fue expuesto al BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. * $p<0.05$

En la figura 8 se ilustra la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo de animales de la SC. En los animales tratados con aceite (barras blancas), la exposición a la BBT no produjo cambios en la expresión del RNAm de CRH. Por otro lado, la SB (barras achuradas) disminuyó la expresión del RNAm de CRH en esta estructura sólo en aquellos animales que no fueron expuestos a la BBT ($t= 4.409$, $p= 0.01$). El resultado del ANOVA de dos vías no reveló efecto por tratamiento ($F_{1,10}= 3.039$, ns), ni por exposición a prueba conductual ($F_{1,10}= 3.904$, ns) ni en la interacción de factores ($F_{1,10}= 0.0878$, ns).

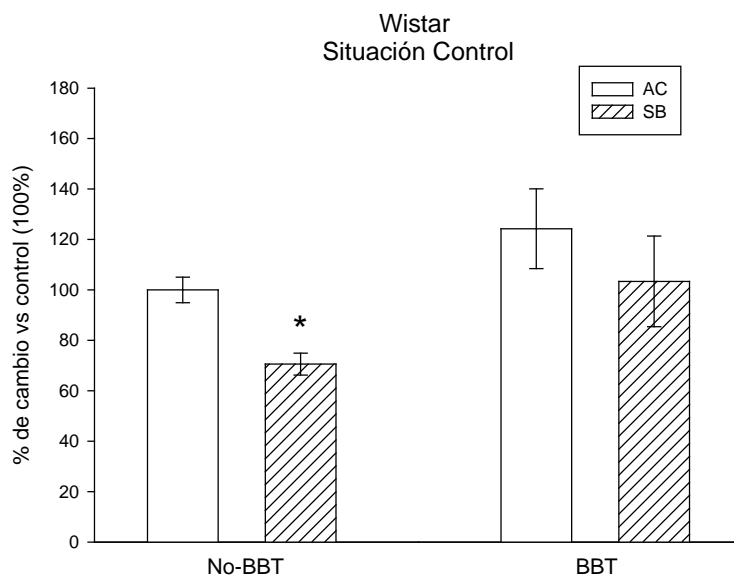


Fig. 8 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar alojadas en la situación control. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de CRH / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n= 3-4$ por grupo. El control (100%) corresponde al grupo tratado con aceite de maíz que no fue expuesto al BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. * $p<0.05$

La figura 9 ilustra la expresión del RNAm de CRH en el PVN de animales sometidos a estrés crónico (EC). Los animales tratados con aceite y que no fueron sometidos a la BBT mostraron una reducción significativa (del 80%) en la expresión del RNAm de CRH en PVN con respecto a los animales alojados en la SC con el mismo tratamiento (valores referidos por el cuadrado oscuro) ($t=28.597$, $p<0.001$).

Por otro lado, en los animales tratados con aceite (barras blancas), la exposición a la BBT no promovió cambios adicionales a los provocados por el EC en la expresión del RNAm de CRH en el PVN. Más aún, la SB (barras achuradas) tampoco modificó la expresión del RNAm de CRH en el PVN. El ANOVA de dos vías no reveló efecto por tratamiento ($F_{1,12}=1.557$, ns), tampoco por exposición a la prueba conductual ($F_{1,12}=3.275$, ns) ni en la interacción de factores ($F_{1,12}=3.971$, ns).

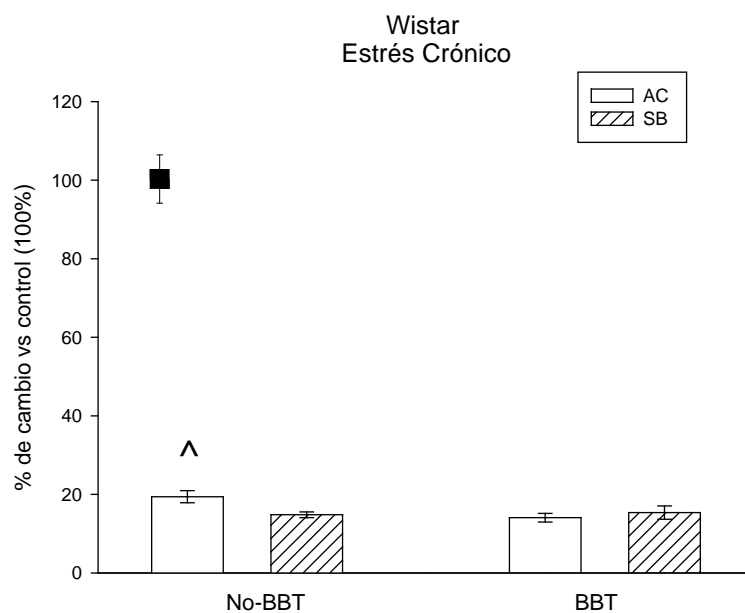


Fig. 9 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en PVN de ratas Wistar sometidas a estrés crónico. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de CRH / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n=3-4$ por grupo. El control (100%) corresponde al grupo alojado en la situación control tratado con aceite que no fue expuesto a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT=Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls prueba t de Student EC AC No-BBT vs control; ^ $p<0.001$ vs control 100%

En la figura 10 se muestran las concentraciones de corticosterona en suero de animales expuestos a EC. En los animales tratados con aceite (barras blancas), la exposición a la BBT

no modificó los niveles de corticosterona. Por otro lado, la SB (barras achuradas) por sí misma ni sumada al BBT promovió cambios en la concentración de corticosterona en estos animales. El ANOVA reveló que no hubo efecto por tratamiento ($F_{1,12}=0.795$, ns), exposición a prueba conductual ($F_{1,12}=1.130$, ns) ni por la interacción de estos factores ($F_{1,12}=0.0369$, ns).

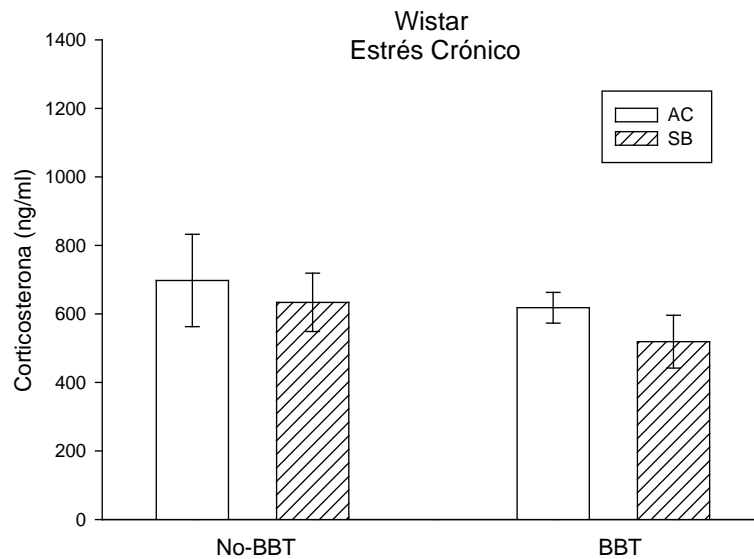


Fig.10 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar. Los datos se presentan como la media \pm EE de n=4 animales por grupo. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls.

En la figura 11 se muestra el efecto del EC sobre la expresión del RNAm de GR en el hipocampo. Como se puede observar, la expresión del RNAm de GR no se modificó significativamente en relación al grupo de la SC, tratado con aceite sin exposición a la BBT (valores referidos por el cuadrado oscuro).

En animales de EC tratados con aceite (barras blancas), la BBT incrementó los niveles del RNAm de GR en el hipocampo respecto del grupo que no fue sometido a esta prueba conductual ($p<0.05$). Por otra parte, la SB (barras achuradas) aumentó la expresión del RNAm de GR en esta estructura tanto en animales que no pasaron por la BBT ($p<0.05$) como en los sometidos a este reto conductual ($p<0.05$), siendo el incremento mayor en los animales con SB + BBT. El ANOVA de dos vías reveló efecto por tratamiento ($F_{1,9}= 6.061$, $p=0.036$),

por exposición a prueba conductual ($F_{1,9}=8.468$, $p=0.017$), no así para la interacción de factores ($F_{1,9}=0.701$, ns).

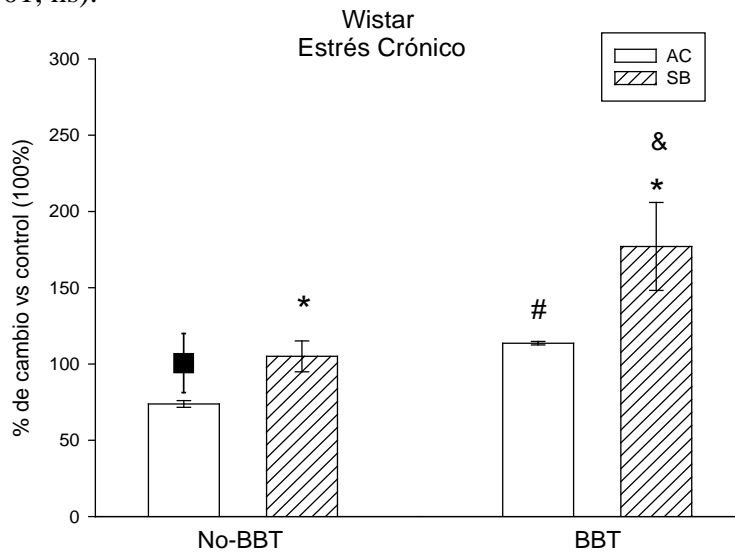


Fig. 11 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar sometidas a estrés crónico.

Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de GR / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n=3-4$ por grupo. El control (100%) corresponde al grupo alojado en la situación control tratado con aceite que no fue expuesto a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P;

BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls prueba t de Student EC AC No-BBT vs control

* $p<0.05$ vs AC; # $p<0.05$ vs AC No-BBT; & $p<0.05$ vs SB No-BBT

En la figura 12 se ilustra la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo de los animales de EC. Se observa que la expresión del RNAm de CRH en animales expuestos a EC no se modificó significativamente en comparación con el grupo de la SC tratado con aceite y sin exposición a la BBT (valores referidos por el cuadrado oscuro). En los animales de EC tratados con aceite (barras blancas) no hubo cambios en la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo por exposición a la BBT. La SB (barras achuradas) tampoco promovió cambios en la expresión del RNAm de CRH, ni la suma de BBT + SB. El ANOVA de dos vías no reveló efecto por tratamiento ($F_{1,8}=0.212$, ns), ni por exposición a la prueba conductual ($F_{1,8}=1.584$, ns) y tampoco en la interacción de factores ($F_{1,8}=1.358$, ns).

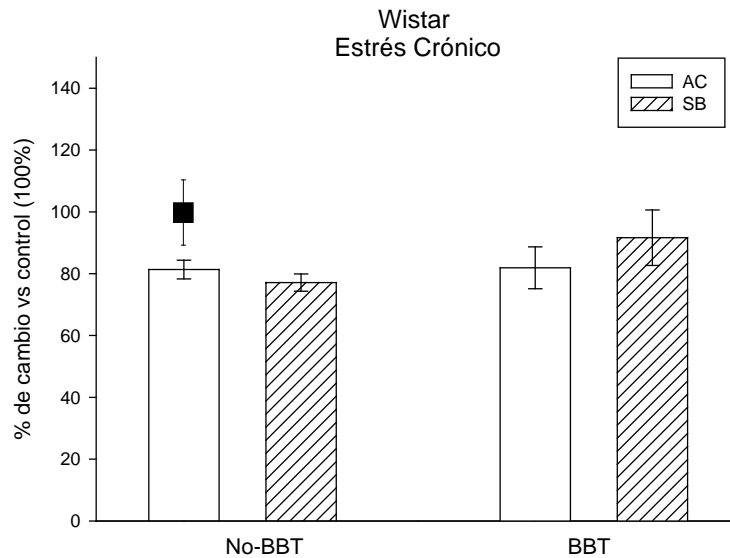


Fig. 12 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar sometidas a estrés crónico. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de CRH / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n=3-4$ por grupo. El control (100%) corresponde al grupo alojado en la situación control tratado con aceite de maíz que no fue expuesto a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. Prueba t de Student EC AC No-BBT vs control

Por otro lado, los niveles del RNAm de CRH en PVN de los animales expuestos a ambiente enriquecido (AE) no fueron detectables bajo las mismas condiciones metodológicas de RT-PCR que se utilizaron para los animales mantenidos en la SC.

En la figura 13 se muestran las concentraciones de corticosterona en suero de animales expuestos a AE. Como se observa en los animales tratados con aceite (barras blancas) la exposición a la BBT aumentó significativamente la concentración de corticosterona en relación a aquellos animales que no pasaron por esta prueba conductual ($p<0.05$). En contraste, la SB (barras achuradas) no produjo cambios en los niveles de corticosterona ni por sí misma ni cuando se combinó con la BBT. El ANOVA de dos vías no mostró efecto por tratamiento ($F_{1,12}=0.272$, ns) por prueba conductual ($F_{1,12}=3.336$, ns), pero sí por la interacción de estos factores ($F_{1,12}=5.220$, $p=0.041$).

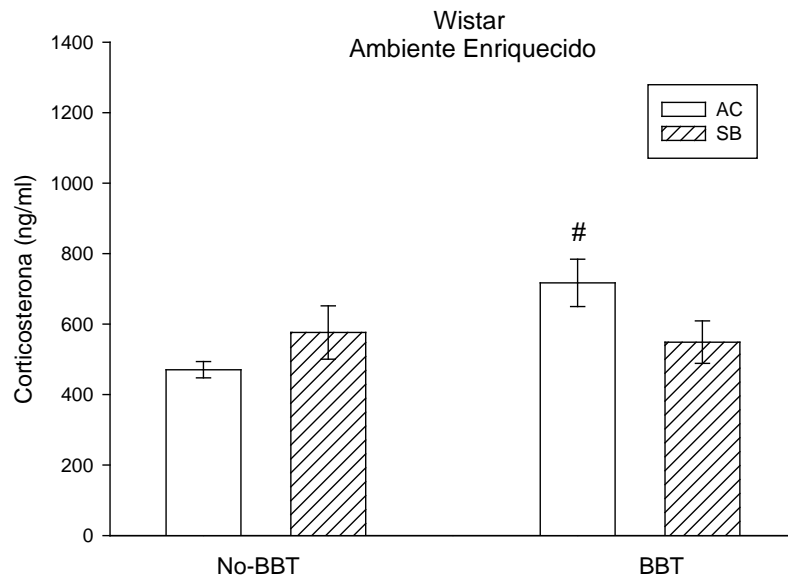


Fig.13 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar expuestas a ambiente enriquecido.

Los datos se presentan como la media \pm EE de $n=4$ animales por grupo. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. # $p<0.05$ vs AC No-BBT

En la figura 14 se muestra el efecto de la exposición al AE sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo. Como se puede observar, no hubo una disminución significativa (30%; $t=2.093$, ns) en relación al grupo de la SC tratado con aceite y que no fue expuesto a la BBT (valores referidos por el cuadrado oscuro).

En animales tratados con aceite (barras blancas), la exposición a la BBT no promovió cambios en los niveles del RNAm de GR en hipocampo. Por otra parte, la SB (barras achuradas) no alteró la expresión del RNAm de GR en esta estructura en relación a los animales tratados con aceite. Sin embargo, la combinación de retos, esto es, la exposición a BBT más SB aumentó significativamente los niveles del RNAm de GR en el hipocampo en relación el grupo tratado con aceite sometido a la BBT ($p<0.05$) y respecto al grupo de SB sin BBT ($p<0.05$). El ANOVA reveló los siguientes valores para tratamiento ($F_{1,8}=5.170$, $p=0.053$), para exposición a la prueba conductual ($F_{1,8}=14.942$, $p=0.005$) y para la interacción de factores ($F_{1,8} = 3.681$, ns).

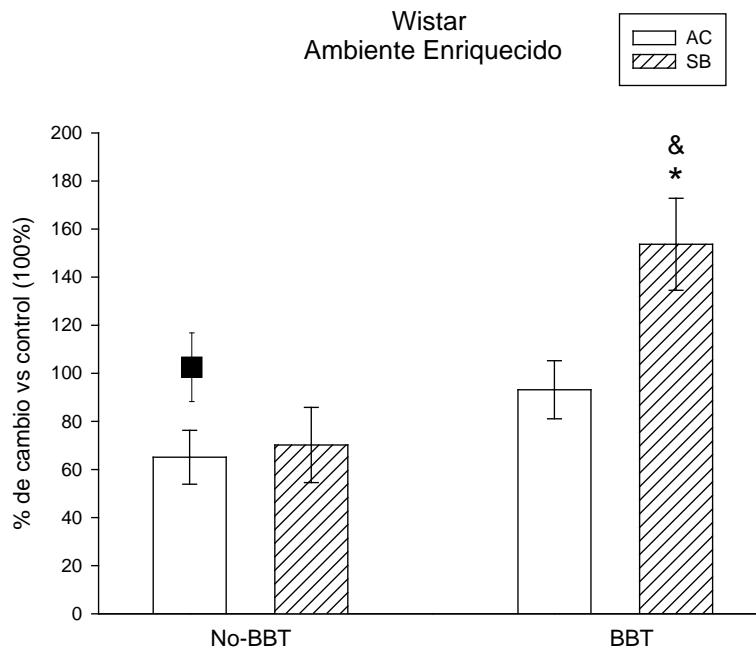


Fig. 14 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar expuestas a ambiente enriquecido. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de GR / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n=3-4$ por grupo. El control (100%) corresponde al grupo alojado en la situación control tratado con aceite de maíz que no fue expuesto a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. Prueba t de Student AE AC No-BBT vs control. * $p<0.05$; & $p<0.05$ vs SB No-BBT

En la figura 15 se ilustra la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo de animales expuestos a AE. Se observó una reducción significativa (60%; $t=4.675$, $p=0.005$) en la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo de animales expuestos a AE al ser comparados con el grupo de la SC, tratado con aceite sin exposición a la BBT (valores referidos por el cuadrado oscuro).

Se observa que en animales tratados con aceite (barras blancas) expuestos al AE, la BBT no afectó la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo. Por otro lado, la SB (barras achuradas) promovió un aumento en los niveles del RNAm de CRH al compararse contra el grupo tratado con aceite sin BBT ($p<0.05$). El ANOVA de dos vías reveló efecto por tratamiento ($F_{1,10} = 8.671$, $p=0.015$), no así por exposición a prueba conductual ($F_{1,10} = 1.111$, ns) ni por interacción de factores ($F_{1,10} = 0.528$, ns).

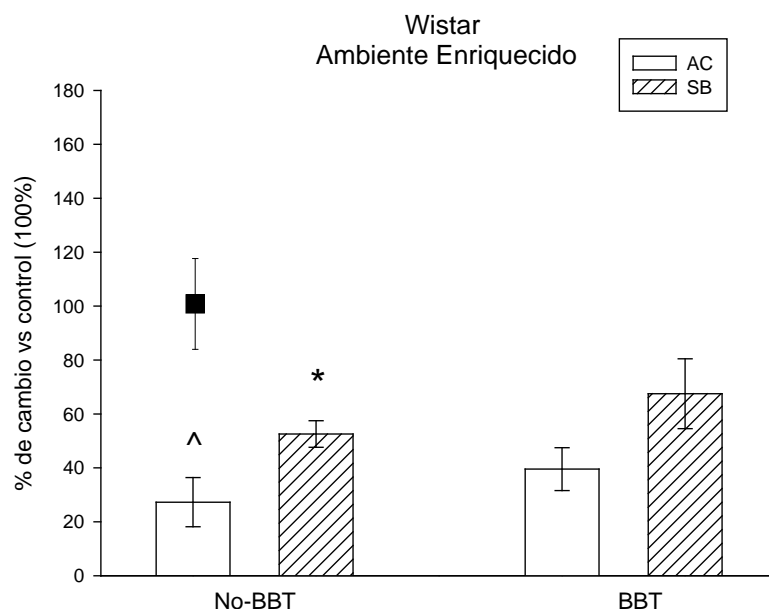


Fig. 15 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar expuestas a ambiente enriquecido. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de CRH / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de n= 3-4 por grupo. El control (100%) corresponde al grupo de la situación control tratado con aceite de maíz que no fue expuesto a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. Prueba t de Student AE AC No-BBT vs control \wedge p=0.005 vs control (100%); *p<0.05 vs AC

Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la ansiedad experimental en ratas de la cepa Wistar Kyoto.

En la figura 16 se muestran los resultados referentes a las conductas tipo ansiedad activas (enterramiento y acicalamiento) registradas en el modelo de BBT en animales a los que se les indujo la SB o tratados con aceite, sometidos al EC o al AE. Las barras blancas representan a los animales tratados con aceite y las oscuras a los que fueron sujetos a la SB.

En los animales tratados con aceite (barras blancas) tanto la exposición al EC (p<0.05) como al AE (p<0.05) aumentaron las conductas activas respecto al grupo que alojado en la SC. Por otro lado, la SB (barras oscuras) incrementó la expresión de conductas activas sólo en los animales alojados en la SC al ser comparados contra su propio grupo control tratado con aceite (p<0.001). El ANOVA de dos vías no reveló efecto por tratamiento ($F_{2,117}=1.415$, ns) ni por prueba conductual ($F_{2,117}= 0.851$, ns), pero sí por la interacción de estos factores ($F_{2,117}= 6.465$, p=0.002).

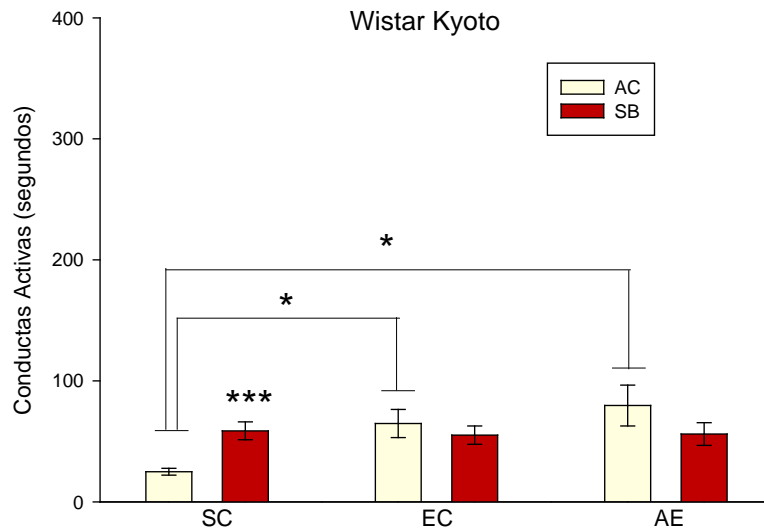


Fig. 16 Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión brusca de progesterona sobre el tiempo acumulativo de conductas activas (enterramiento y acicalamiento) evaluadas en la prueba de enterramiento defensivo en ratas Wistar Kyoto. Los datos se presentan como la media \pm EE de n=15-18 animales por grupo. AC=Aceite de maíz; SB=Supresión Brusca; SC= Situación control EC=Estrés crónico; AE=Ambiente enriquecido. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. ***p<0.001; *p<0.05

En la figura 17 se muestran los resultados referentes a la expresión de las conductas pasivas tipo ansiedad (inmovilidad y congelamiento) registradas en el modelo de BBT por los animales tratados con aceite o a los que se les indujo la SB que fueron sometidos al EC y al AE. En los animales tratados con aceite (barras blancas) se observa que las conductas pasivas tipo ansiedad aumentaron en condiciones de EC ($p<0.05$) y se redujeron por la exposición a AE ($p<0.05$) en comparación al grupo alojado SC.

La SB (barras achuradas) aumentó la expresión de las conductas pasivas tipo ansiedad en el grupo de la SC y de EC ($p<0.05$). Además, el EC exacerbó la expresión de conductas pasivas inducidas por la SB al ser comparados con el grupo de la SC ($p<0.05$) y al expuesto a AE ($p<0.05$). A su vez, el AE previno el aumento de la ansiedad inducida por la SB y redujo la expresión de las conductas pasivas al compararse con el grupo de la SC y del EC. El ANOVA de dos vías reveló efecto por tratamiento ($F_{2,117}= 8.859$, $p=0.004$) por condición

experimental ($F_{2,117} = 12.458$, $p < 0.001$), mas no por la interacción de estos factores ($F_{2,117} = 1.600$, ns).

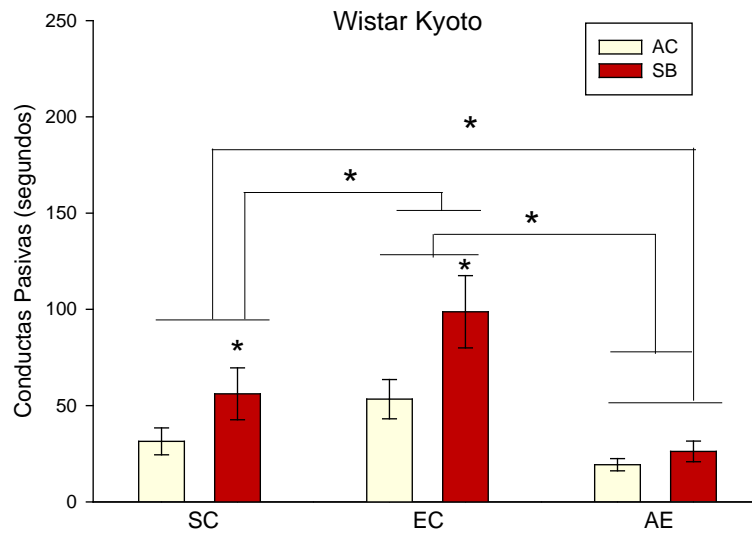


Fig. 17 Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión brusca de progesterona sobre el tiempo acumulativo de conductas pasivas (inmovilidad y congelamiento) evaluadas en la prueba de enterramiento defensivo en ratas Wistar Kyoto. Los datos se presentan como la media \pm EE de $n=15-18$ animales por grupo. AC=Aceite de maíz; SB=Supresión Brusca; SC= Situación control EC=Estrés crónico; AE=Ambiente enriquecido. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. * $p < 0.05$

Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y ambiente enriquecido sobre la expresión del RNAm de CRH en el PVN, sobre las concentraciones de corticosterona en suero, RNAm de GR y de CRH en hipocampo como indicadores de la actividad del eje HHA en ratas Wistar Kyoto.

En la figura 18 se muestra la expresión del RNAm de CRH en el PVN de ratas WKY alojadas en la SC tratadas con aceite o a las que se les indujo la SB en respuesta a la BBT. En los animales tratados con aceite (barras blancas) se muestra que la exposición a la BBT disminuyó la expresión del RNAm de CRH en el PVN en relación al grupo que no fue expuesto a esta prueba conductual ($p < 0.05$). Por otra parte, se observa que la SB (barras achuradas) provocó una disminución del RNAm de CRH en PVN respecto al grupo tratado con aceite ($p < 0.05$). Al combinar el reto de BBT y SB se presentó un aumento en la

expresión del RNAm de CRH en PVN respecto al grupo tratado con aceite expuesto a la BBT ($p < 0.05$). El ANOVA reveló que no hubo efecto por tratamiento ($F_{1,12} = 1.359$, ns), pero sí por la exposición a la prueba conductual ($F_{1,12} = 14.330$, $p = 0.003$) y por la interacción de estos factores ($F_{1,12} = 26.44$, $p < 0.001$).

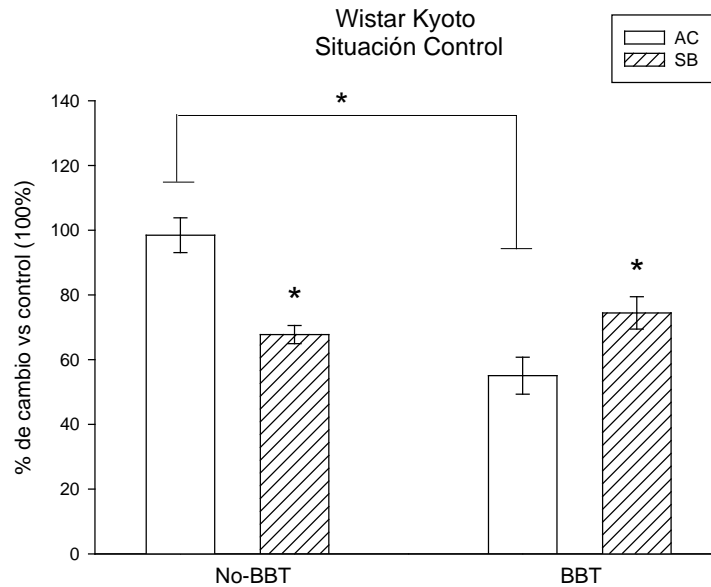


Fig. 18 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en PVN de ratas Wistar Kyoto alojadas en la situación control. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente del DNAc de CRH / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n = 3-4$ animales por grupo. El control 100% corresponde al grupo tratado con aceite de maíz sin exposición a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión brusca de P; BBT= Burying Behavior Test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. * $p < 0.05$

La figura 19 muestra las concentraciones de corticosterona en el suero de animales de la SC. Se observa que la exposición a la BBT no indujo cambios en animales tratados con aceite (barras blancas) ni en aquellos sujetos a la SB. El ANOVA de dos vías no reveló efecto por tratamiento ($F_{1,10} = 1.910$, ns), por exposición a la prueba conductual ($F_{1,10} = 0.433$, ns) ni por la interacción de factores ($F_{1,10} = .009$, ns).

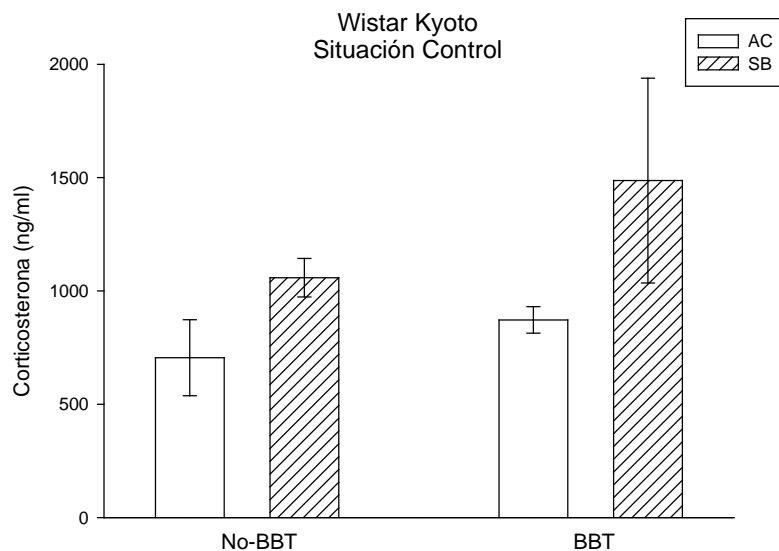


Fig.19 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar Kyoto alojadas en la situación control. Los datos se presentan como la media \pm EE de n=4 animales por grupo. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. Post hoc Student Newman Keuls.

La figura 20 muestra la expresión del RNAm de GR en el hipocampo de animales de la SC. En los animales tratados con aceite (barras blancas), la exposición a la BBT no produjo cambios en la expresión del RNAm de GR en el hipocampo. En contraste, la SB (barras achuradas) provocó una disminución en el RNAm de GR respecto el grupo tratado con aceite sin BBT ($p < 0.05$). El ANOVA de dos vías reveló efecto por tratamiento ($F_{1,10} = 20.917$, $p = 0.001$), no así por la exposición a la prueba conductual ($F_{1,10} = 1.031$, ns) ni por la interacción de factores ($F_{1,10} = 2.746$, ns).

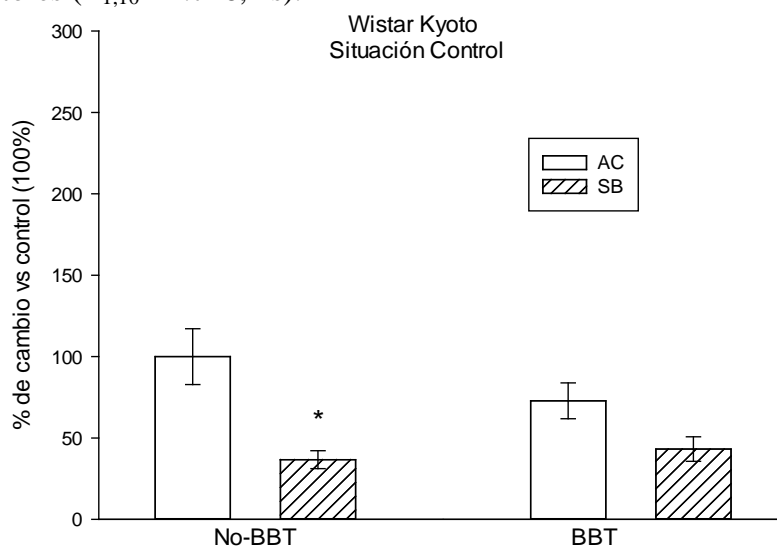


Fig. 20 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar Kyoto alojadas en la situación control. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente del DNAc de GR / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de n= 3-4 animales por grupo. El control (100%) corresponde al grupo tratado con aceite de maíz sin exposición a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión brusca de P; BBT= Burying Behavior Test. ANOVA de dos vías. Post hoc Student Newman Keuls. * $p < 0.05$

En la figura 21 se ilustra expresión del RNAm de CRH en el hipocampo de animales de la SC. El grupo tratado con aceite (barras blancas) mostró un aumento en la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo por la exposición a la BBT respecto del grupo que no fue sometido a este paradigma conductual ($p < 0.05$). Por otro lado, la SB (barras achuradas) no produjo cambios en la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo. Los valores del ANOVA de dos vías no revelaron efecto por tratamiento ($F_{1,10} = 0.00516$, ns), pero sí por la exposición a la prueba conductual ($F_{1,10} = 10.549$, $p = 0.009$), sin embargo en la interacción de factores no se observó efecto ($F_{1,10} = 3.284$, ns).

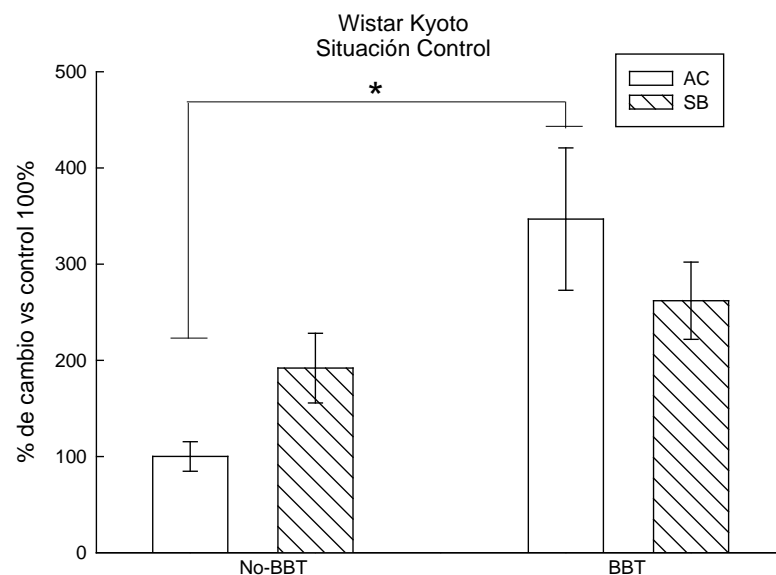


Fig. 21 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar Kyoto alojadas en la situación control. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente del DNAc de GR / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n = 3-4$ animales por grupo. El control (100%) corresponde al grupo tratado con aceite de maíz sin exposición a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión brusca de P; BBT= Burying Behavior Test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. * $p < 0.05$

La figura 22 ilustra la expresión del RNAm de CRH en el PVN de animales sometidos a EC. Los animales tratados con aceite y que no fueron expuestos a la BBT presentaron una reducción significativa (del 40%; $t = 3.835$, $p = 0.009$) en la expresión del RNAm de CRH en el PVN con respecto a los animales de la SC con el mismo tratamiento (valores referidos por el cuadrado oscuro).

Por otro lado, en los animales tratados con aceite (barras blancas) la exposición a la BBT no promovió cambios en la expresión del RNAm de CRH en el PVN. Así mismo, la SB (barras achuradas) tampoco provocó cambios en los niveles del RNAm de CRH en esta estructura.. El ANOVA de dos vías reveló efecto por tratamiento ($F_{1,10}= 6.993$, $p=0.025$) no así por exposición al reto conductual($F_{1,10}=0.366$, ns) ni por la interacción de factores ($F_{1,10}=0.374$, ns).

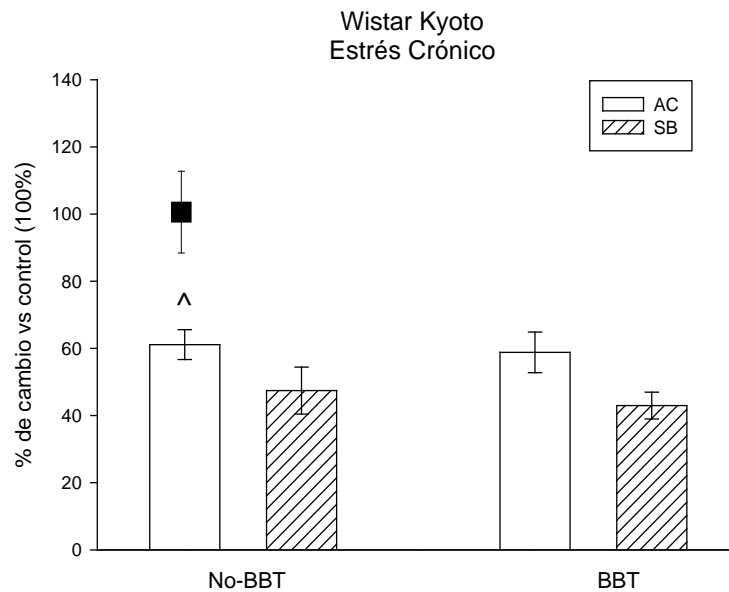


Fig. 22 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en PVN de ratas Wistar Kyoto sometidas a estrés crónico. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de CRH / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n=3-4$ por grupo. El control (100%) corresponde al grupo alojado en la situación control tratado con aceite de maíz que no fue expuesto al BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT=Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. Prueba t de Student EC AC No-BBT vs control; $\wedge p<0.05$ vs control 100%

En la figura 23 se muestran las concentraciones de corticosterona en el suero de animales sometidos a EC. En los animales tratados con aceite (barras blancas), la exposición a la BBT no modificó los niveles de corticosterona. En contraste, la SB (barras achuradas) incrementó las concentraciones de corticosterona respecto al grupo tratado con aceite ($p<0.05$). En aquellos animales que recibieron la combinación de BBT más SB, mostraron menores niveles de corticosterona en relación al grupo que sólo fue sometido a la SB ($p<0.05$). El ANOVA de dos vías reveló efecto por exposición a la prueba conductual

($F_{1,12}= 7.977$, $p=0.015$), no así por tratamiento ($F_{1,12}= 3.551$, ns) ni por la interacción de factores ($F_{1,12}=1.969$, ns).

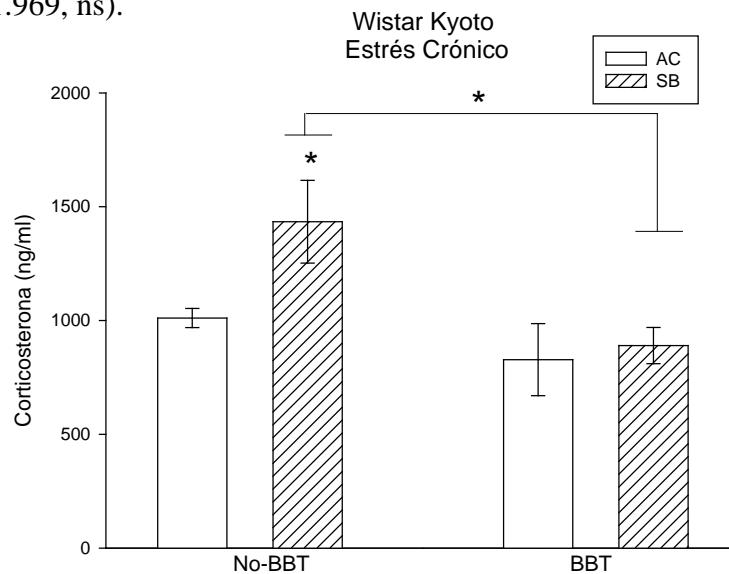


Fig. 23 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar Kyoto sometidas a estrés crónico. Los datos se presentan como la media \pm EE de $n=4$ animales por grupo. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. * $p<0.05$

En la figura 24 se muestra el efecto del EC sobre la expresión del RNAm de GR en el hipocampo de ratas WKY. Como se puede observar, hubo una disminución significativa (del 40%; $t=3.817$, $p=0.037$) del RNAm de GR en animales sometidos a EC en relación al grupo de la SC tratado con aceite sin exposición a la BBT (valores referidos por el cuadrado oscuro).

En animales de EC tratados con aceite (barras blancas), la exposición a la BBT redujo los niveles del RNAm de GR en relación al grupo que no fue probado en este paradigma conductual ($p<0.05$). Por otra parte, la SB (barras achuradas) no provocó cambios en la expresión del RNAm de GR en el hipocampo. El ANOVA de dos vías reveló efecto por exposición a la prueba conductual ($F_{1,10} = 5.588$, $p=0.040$), no así por tratamiento ($F_{1,10} = 2.135$, ns) ni en la interacción de factores ($F_{1,10} = 0.644$, ns).

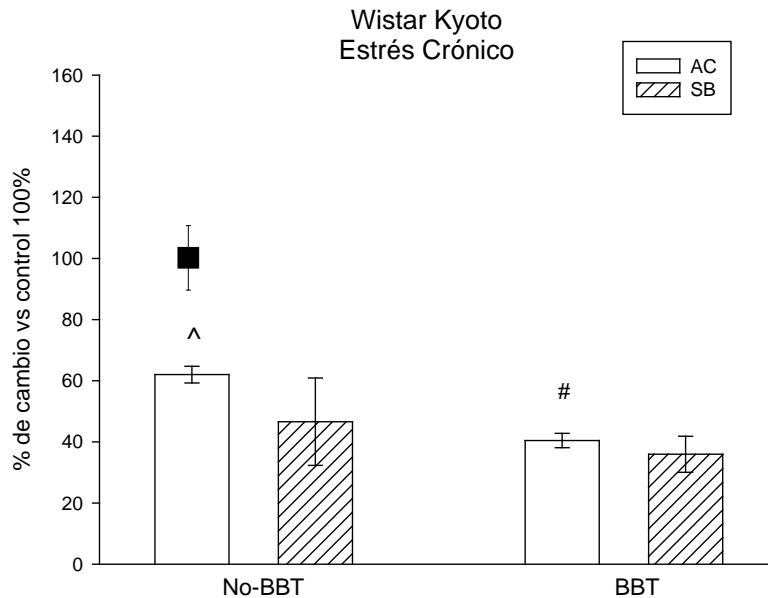


Fig. 24 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar Kyoto sometidas a estrés crónico. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de GR / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n= 3-4$ por grupo. El control (100%) corresponde al grupo alojado en la situación control tratado con aceite de maíz que no fue expuesto a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. Prueba t de Student EC AC No-BBT vs control. $\wedge p<0.05$ vs control 100%; $\#p<0.05$ vs AC No-BBT

En la figura 25 se ilustra la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo de ratas WKY sometidas a EC. Se observa que la exposición a EC en animales tratados con aceite y sin exposición a la BBT, incrementó en 150% ($t=4.700$, $p=0.029$) la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo en comparación con el grupo de la SC con el mismo tratamiento.

En los animales de EC tratados con aceite (barras blancas) no hubo cambios en el RNAm de CRH en el hipocampo por la exposición a la BBT ni por la SB (barras achuradas). El ANOVA de dos vías no reveló efecto por tratamiento ($F_{1,12}= 0.677$, ns), ni por exposición a la prueba conductual ($F_{1,12}= 0.0308$, ns) ni por interacción de factores ($F_{1,12}= 0.0371$, ns).

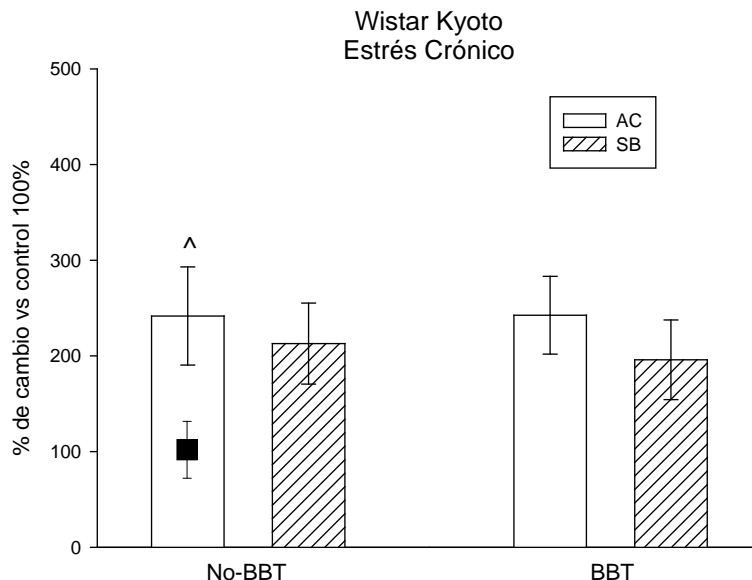


Fig. 25 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar Kyoto sometidas a estrés crónico.

Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de CRH / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n=3-4$ por grupo. El control (100%) corresponde al grupo alojado en la situación control tratado con aceite de maíz que no fue expuesto a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. Prueba t de Student EC AC No-BBT vs control. $\wedge p < 0.05$ vs control 100%

La figura 26 muestra la expresión del RNAm de CRH en el PVN de animales expuestos a AE. Los animales de AE tratados con aceite y sin exposición a la BBT presentaron una reducción significativa (del 60%; $t=9.693$, $p < 0.001$) en la expresión del RNAm de CRH en el PVN con respecto al grupo de la SC con el mismo tratamiento (valores referidos por el cuadrado oscuro).

En animales tratados con aceite (barras blancas) la exposición a la BBT produjo un incremento en el RNAm del CRH en PVN ($t=3.161$, $p=0.034$). En contraste, la SB (barras achuradas) no promovió cambios en la expresión del RNAm de CRH en esta estructura. Los valores del ANOVA de dos vías fueron para tratamiento ($F_{1,9}=4.865$, $p=0.05$), para exposición a prueba conductual ($F_{1,9}=4.959$, $p=0.053$) y para la interacción de factores ($F_{1,9}=0.303$, ns).

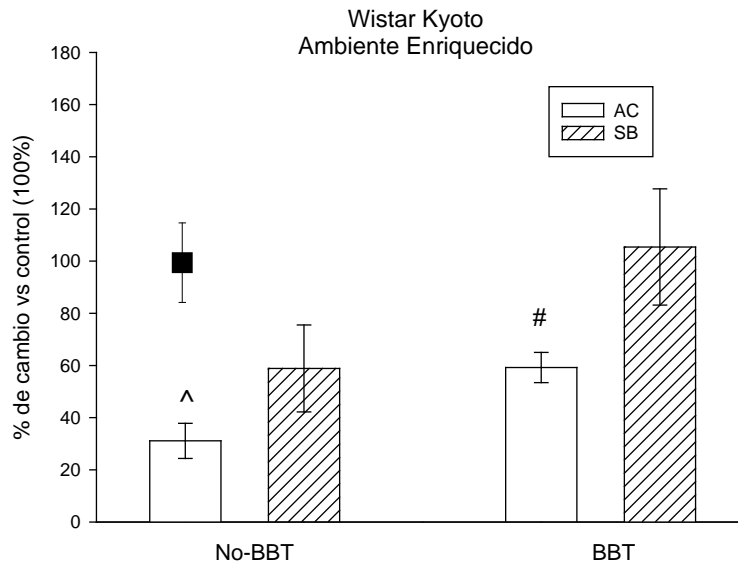


Fig. 26 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en el PVN de ratas Wistar Kyoto sometidas a ambiente enriquecido.

Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de CRH / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de n= 3-4 por grupo. El control (100%) corresponde al grupo alojado en la situación control tratado con aceite de maíz que no fue expuesto a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls.

Prueba t de Student AE AC No-BBT vs control. \wedge p<0.001 vs control 100%, #p<0.05 vs AC No-BBT

En la figura 27 se ilustran las concentraciones de corticosterona en el suero de ratas WKY expuestas a AE. En los animales tratados con aceite (barras blancas), la exposición a la BBT no produjo cambios en los niveles de corticosterona. La SB (barras achuradas) tampoco modificó la concentración de este glucocorticoide. Sin embargo, cuando se combinó la BBT y la SB, hubo una disminución en los niveles de corticosterona en comparación con el grupo tratado con aceite sin BBT. El ANOVA de dos vías no reveló efecto por tratamiento ($F_{1,12}=0.00460$, ns), por exposición a la prueba conductual ($F_{1,12}=0.298$, ns) pero sí por la interacción de factores ($F_{1,12}= 3.632$, p<0.05).

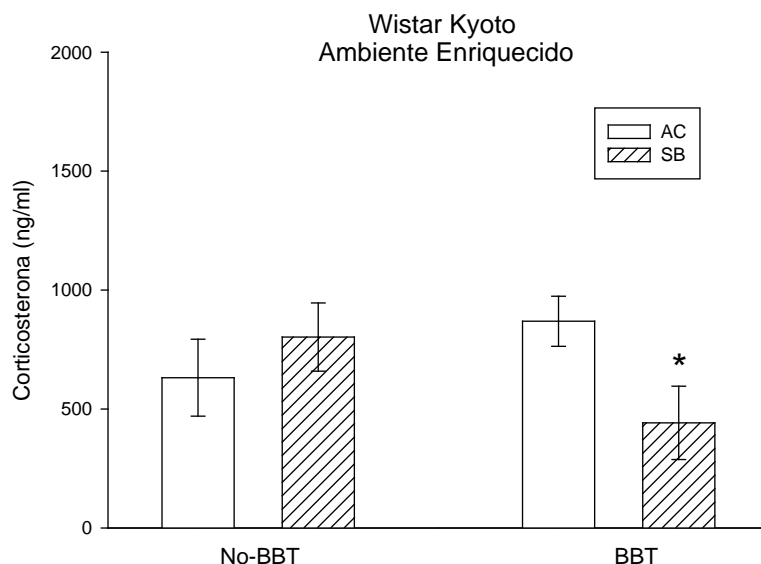


Fig. 27 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la concentración de corticosterona (ng/ml) en suero de ratas Wistar Kyoto expuestas a ambiente enriquecido. Los datos se presentan como la media \pm EE de n=4 animales por grupo. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. * $p < 0.05$

En la figura 28 se muestra el efecto de la exposición a AE sobre la expresión del RNAm de GR en el hipocampo. Como se puede observar, no hubo una disminución significativa ($t = 0.599$, ns) en la expresión del RNAm de GR en animales de AE tratados con aceite sin exposición a la BBT en relación al grupo de la SC con el mismo tratamiento (valores referidos por el cuadrado oscuro).

En los animales de AE tratados con aceite (barras blancas) no hubo cambios en la expresión del RNAm de GR en hipocampo por la exposición a la BBT. Así mismo, la SB (barras achuradas) no tuvo efecto sobre los niveles del RNAm de GR en esta estructura. El ANOVA de dos vías no reveló efecto por tratamiento ($F_{1,12} = 0.132$, ns), por exposición a prueba conductual ($F_{1,12} = 0.454$, ns), ni por interacción de factores ($F_{1,12} = 0.389$, ns).

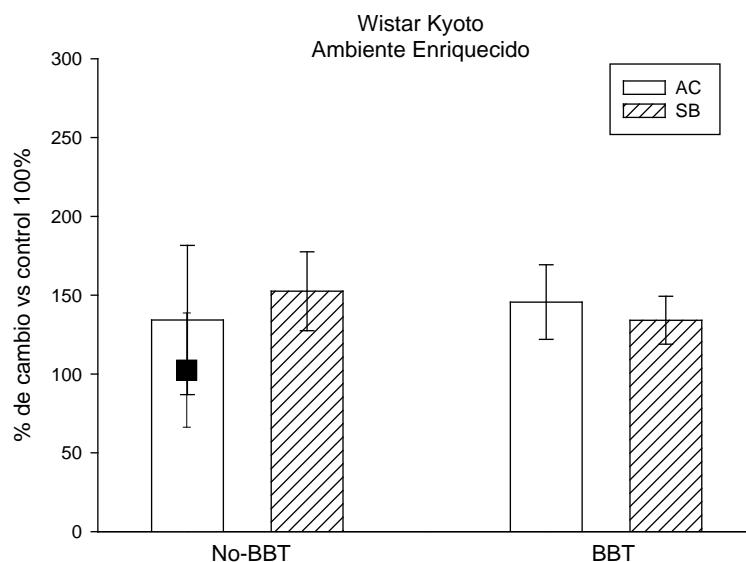


Fig. 28 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de GR en hipocampo de ratas Wistar Kyoto expuestas a ambiente enriquecido. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de GR / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n=3-4$ por grupo. El control (100%) corresponde al grupo alojado en la situación control tratado con aceite de maíz que no fue expuesto al BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. Prueba t de Student AE AC No-BBT vs control.

En la figura 29 se ilustra la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo de ratas WKY expuestas a AE. Se observa que la exposición a AE produjo un incremento significativo (del 58%; $t=4.660$, $p=0.016$) en la expresión del RNAm de CRH al compararse con el grupo de la SC, tratado con aceite de maíz y sin exposición a la BBT (valores referidos por el cuadrado oscuro).

En los animales de AE tratados con aceite (barras blancas), la exposición a la BBT disminuyó la expresión del RNAm de CRH en hipocampo con respecto al grupo que no fue probado en dicho paradigma conductual ($p<0.05$). Por otro lado, la SB (barras achuradas) aumentó los niveles del RNAm de CRH en el hipocampo con respecto a los animales tratados con aceite ($p<0.001$), independientemente de si fueron probados en la BBT o no. El ANOVA de dos vías reveló efecto por tratamiento ($F_{1,12}=29.956$, $p<0.001$), por exposición a la prueba conductual ($F_{1,12}=18.154$, $p=0.001$), no así para la interacción de factores ($F_{1,12}=1.339$, ns).

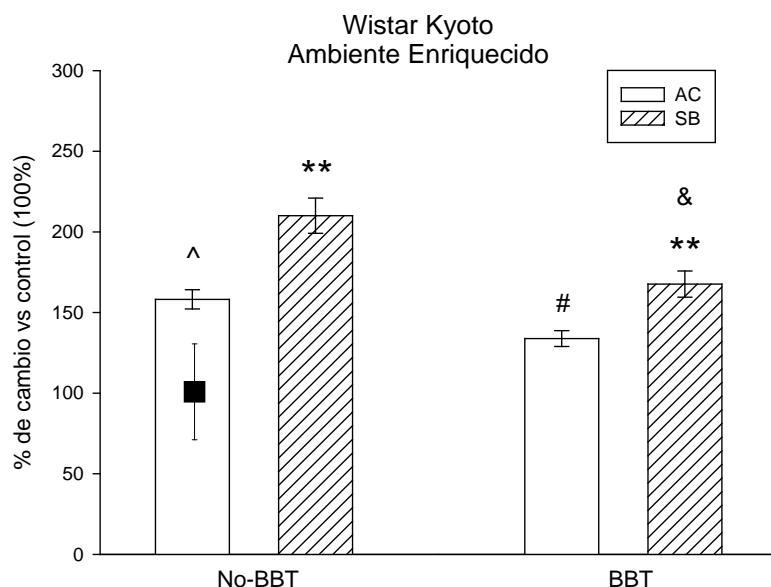


Fig. 29 Efecto de la exposición al enterramiento defensivo (BBT) y la supresión brusca de progesterona (SB) sobre la expresión del RNAm de CRH en hipocampo de ratas Wistar Kyoto expuestas a ambiente enriquecido. Los datos se presentan como el valor promedio del cociente de DNAc de CRH / DNAc de ciclofilina expresado en porcentaje de $n=3-4$ por grupo. El control (100%) corresponde al grupo alojado en la situación control tratado con aceite de maíz que no fue expuesto a la BBT. AC=Aceite de Maíz; SB=Supresión Brusca de P; BBT= Burying Behavior test. ANOVA de dos vías. *Post hoc* Student Newman Keuls. Prueba t de Student AE AC No-BBT vs control. $^{\wedge}p<0.05$ vs control 100%, $^{**}p<0.001$; # $p<0.05$ vs AC No-BBT; & $p<0.05$ vs AC BBT

Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la latencia de enterramiento, exploraciones al electrodo, número de choques y erguimientos en la prueba de enterramiento defensivo en ratas Wistar y Wistar Kyoto

En la tabla 6 se muestran los resultados para latencia de enterramiento, exploraciones al electrodo, número de choques y erguimientos registrados en la prueba de enterramiento. No se obtuvieron diferencias significativas por tratamiento, por condición ni por la interacción de factores en los parámetros conductuales mencionados. Los valores de los ANOVAs de dos vías se muestran en la tabla 7.

Latencia de enterramiento

		Wistar		WKY			
Tx Cond	AC	SB	AC	SB	AC	SB	Tx Cond
	SC	57.33 ± 8.76	67.50 ± 8.20	302.05 ± 56.43	192.30 ± 53.22	302.05 ± 56.43	
EC	79.46 ± 17.21	88.00 ± 16.89	195.30 ± 52.82	285.15 ± 54.72	195.30 ± 52.82	285.15 ± 54.72	EC
AE	53.00 ± 11.43	61.94 ± 9.60	194.05 ± 43.58	218.57 ± 51.05	194.05 ± 43.58	218.57 ± 51.05	AE
Exploraciones al electrodo							
SC	9.09 ± 1.09	8.44 ± 0.99	8.45 ± 0.81	10.45 ± 1.32	8.45 ± 0.81	10.45 ± 1.32	SC
EC	6.86 ± 0.81	10.13 ± 1.54	11 ± 1.25	9.20 ± 0.76	11 ± 1.25	9.20 ± 0.76	EC
AE	9.26 ± 1	10.73 ± 0.958	10.76 ± 1.50	11.61 ± 1.12	10.76 ± 1.50	11.61 ± 1.12	AE
Número de choques							
SC	3.90 ± 0.41	4.55 ± 0.66	2.4 ± 0.29	2.6 ± 0.38	2.4 ± 0.29	2.6 ± 0.38	SC
EC	3.80 ± 0.42	4.53 ± 0.42	3.4 ± 0.43	3.15 ± 0.47	3.4 ± 0.43	3.15 ± 0.47	EC
AE	4.26 ± 0.54	4.47 ± 0.52	2.57 ± 0.37	3.42 ± 0.34	2.57 ± 0.37	3.42 ± 0.34	AE
Erguimientos							
SC	15.52 ± 1.73	13.88 ± 1.63	10.65 ± 1.01	12.05 ± 1.26	10.65 ± 1.01	12.05 ± 1.26	SC
EC	16.46 ± 1.45	17.33 ± 2.03	12.60 ± 1.07	11.05 ± 1.86	12.60 ± 1.07	11.05 ± 1.86	EC
AE	16.66 ± 0.88	16.68 ± 1.31	12.47 ± 1.26	10.33 ± 1.03	12.47 ± 1.26	10.33 ± 1.03	AE

Tabla 6. Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión brusca de progesterona sobre la latencia de enterramiento, exploraciones al electrodo, número de choques y de erguimientos registrados en la prueba de enterramiento defensivo. Los datos se presentan como la medias ± el EE. ANOVA de dos vías. WKY=Wistar Kyoto, Tx=Tratamiento, AC=Aceite de maíz, SB=Supresión brusca de progesterona, Cond=Condición experimental, SC=Situación control, EC=Estrés Crónico, AE=Ambiente enriquecido.

Parámetro conductual	Tratamiento		Condición		Interacción de factores	
	Wistar	WKY	Wistar	WKY	Wistar	WKY
Latencia de enterramiento	$F_{1,97} = 0.89$, ns	$F_{1,97} = 0.001$, ns	$F_{2,97} = 2.54$, ns	$F_{2,97} = 0.35$, ns	$F_{2,97} = .002$, ns	$F_{2,97} = 1.88$, ns
Exploraciones al electrodo	$F_{1,97} = 2.30$, ns	$F_{1,97} = 0.13$, ns	$F_{2,97} = 1.04$, ns	$F_{2,97} = 1.14$, ns	$F_{2,97} = 1.61$, ns	$F_{2,97} = 1.36$, ns
Número de choques	$F_{1,97} = 1.55$, ns	$F_{1,97} = 0.71$, ns	$F_{2,97} = 0.07$, ns	$F_{2,97} = 1.99$, ns	$F_{2,97} = 0.14$, ns	$F_{2,97} = 1.02$, ns
Erguimientos	$F_{1,97} = 1.09$, ns	$F_{1,97} = 0.53$, ns	$F_{2,97} = 0.98$, ns	$F_{2,97} = 0.08$, ns	$F_{2,97} = 1.93$, ns	$F_{2,97} = 1.08$, ns

Tabla 7. Resultados arrojados por el ANOVA de dos vías del efecto del tratamiento (AC vs SB) y la condición experimental (SC, EC y AE) sobre la latencia de enterramiento, exploraciones al electrodo, número de choques y erguimientos registrados en la prueba de enterramiento defensivo en ratas Wistar y WKY. AC=Aceite de maíz, SB=Supresión brusca de progesterona, SC=Situación control, EC= Estrés Crónico, AE=Ambiente enriquecido, WKY=Wistar Kyoto, ns= no significativo.

Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico (EC) y el ambiente enriquecido (AE) sobre el número de cuadros cruzados en la prueba de campo abierto de ratas Wistar y Wistar Kyoto

En la tabla 8 se muestra que ninguna de las manipulaciones modificó el número de cuadros cruzados registrado en la prueba de campo abierto. El ANOVA de dos vías para la cepa Wistar no reveló diferencias por tratamiento ($F_{1,97} = 1.78$, ns), por condición ($F_{2,97} = 2.26$, ns) ni por la interacción de estos factores ($F_{2,97} = 2.81$, ns). Para la cepa WKY, el ANOVA de dos vías no reveló efecto condición ($F_{2,97} = 3.16$, $p = 0.09$), por tratamiento ($F_{1,97} = 0.34$, ns) ni por la interacción de factores ($F_{2,97} = 0.88$, ns) (tabla 8).

Tx \ Cond	Wistar		WKY		Tx \ Cond
	AC	SB	AC	SB	
SC	23.87 ± 2.70	18.26 ± 2.19	19.12 ± 2.06	18.22 ± 2.77	SC
EC	19.14 ± 2.38	18.12 ± 1.90	16.44 ± 2.34	16.00 ± 2.10	EC

AE	22.37 ± 3.34	24.50 ± 2.25	22.00 ± 1.67	23.55 ± 2.34	AE
-----------	--------------	--------------	--------------	--------------	-----------

Tabla 8. Efecto de las diferentes condiciones experimentales y la supresión brusca de progesterona sobre el número de cuadros cruzados en la prueba de campo abierto. Los datos se presentan como la medias ± el EE. WKY=Wistar Kyoto, Tx=Tratamiento, AC=Aceite de maíz, SB=Supresión brusca de progesterona, Cond=Condición experimental, SC=Situación control, EC= Estrés Crónico, AE=Ambiente enriquecido.

Capítulo 6

Discusión

Los principales resultados del presente trabajo se pueden resumir de la siguiente manera:

1. La supresión brusca de progesterona incrementó la conducta tipo ansiedad en ambas cepas de ratas.

2. El estrés crónico incrementó la conducta de ansiedad inducida por la supresión de progesterona en ambas cepas y en WKY, la exacerbó respecto de la situación control.

3. El ambiente enriquecido previno el incremento de la conducta tipo ansiedad en ambas cepas de ratas.

4. La supresión brusca de progesterona incrementó el RNAm de CRH en el PVN y disminuyó el RNAm de GR en hipocampo en la cepa Wistar. En las WKY, la supresión brusca de progesterona redujo la expresión del RNAm de CRH en el PVN ambas y el RNAm de GR en hipocampo en el grupo sin exposición al enterramiento defensivo.

5. El estrés crónico no modificó la expresión del RNAm de GR en ratas Wistar y la disminuyó en ratas WKY. Además, produjo efectos contrarios en la expresión del RNAm de GR entre cepas en respuesta al reto conductual y hormonal. Esto es, aumentó en la cepa Wistar por la exposición al enterramiento defensivo y la supresión brusca de progesterona. En contraste, la SB no lo modificó el RNAm de GR en la cepa WKY pero lo disminuyó en respuesta al enterramiento defensivo.

6.- El ambiente enriquecido facilitó la respuesta del eje HHA al aumentar la concentración de corticosterona en respuesta al enterramiento defensivo y al incrementar el RNAm de CRH del hipocampo por la supresión brusca de progesterona, en ratas Wistar.

7.- En la cepa WKY, el ambiente enriquecido disminuyó la expresión del RNAm de CRH en PVN, pero promovió la respuesta del eje HHA mediante el aumento del RNAm de

CRH en PVN ante el enterramiento defensivo y en el hipocampo por la supresión brusca de progesterona. Así mismo, promovió la disminución de los niveles de corticosterona circulante ante la combinación del reto conductual (BBT) y la supresión brusca de progesterona. Finalmente, el ambiente enriquecido previno la disminución en la expresión del RNAm de GR en hipocampo provocada por la supresión brusca de progesterona.

Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico (EC) y ambiente enriquecido (AE) sobre la ansiedad experimental en ratas Wistar.

De manera general, la cepa Wistar tiende a manifestar la ansiedad preferentemente mediante conductas activas (Casarrubea et al., 2013; Langen y Dost, 2011; Rex et al., 2004) en vez de pasivas, de ahí que estos animales mostraran mayor tiempo de comportamientos activos en la prueba de enterramiento defensivo y que no se observaran cambios posteriores por las diferentes condiciones experimentales y por la supresión brusca de progesterona sobre las conductas pasivas.

Por otro lado, la supresión brusca de progesterona incrementó la conducta ansiosa en la cepa de ratas Wistar, lo cual concuerda con lo reportado por otros grupos utilizando animales intactos (Gallo y Smith, 1993) y ovariectomizados (Saavedra et al., 2006) en el modelo de enterramiento defensivo.

El estrés crónico *per se* no incrementó la ansiedad en esta cepa, sin embargo parece facilitar el aumento en las conductas tipo ansiedad inducido por el reto hormonal. Este resultado fue inesperado ya que diversos estudios muestran que la exposición prolongada al estrés crónico variable puede incrementar la expresión de emocionalidad, comportamientos ansiosos y depresivos en roedores (Tejani-Butt et al., 1994; Tõnissaar et al., 2008), situación que no se observó en el presente estudio. Lo anterior podría deberse a

algunas diferencias metodológicas, particularmente en la prueba de ansiedad utilizada y su sensibilidad. En un estudio previo se reporta que después de haber sometido a los animales a estrés crónico, su exposición a la prueba de enterramiento defensivo no se tuvo efecto. Sin embargo, al realizar una prueba adicional para evaluar la conducta tipo ansiedad (*novelty suppressed feeding test*), fue posible detectar un aumento en este comportamiento en los animales estresados. El resultado reportado en el modelo de enterramiento defensivo fue similar al encontrado en el presente trabajo donde la exposición a EC no alteró la conducta tipo ansiedad en el mismo modelo (Roth et al., 2012). Por lo anterior, es factible considerar que el modelo de enterramiento defensivo quizá no representa un paradigma conductual adecuado para detectar los efectos del EC sobre la conducta tipo ansiedad en la cepa Wistar. Estudios posteriores podrían confirmar esta propuesta.

La exposición al AE redujo la conducta tipo ansiedad y previno el aumento en esta conducta inducido por la supresión brusca de progesterona. Este resultado concuerda con estudios previos, los cuales han mostrado que el AE reduce conductas relacionadas con estados ansiosos y depresivos (Benaroya-Milshtein, 2004; D'Andrea et al., 2010; Rosenfeld y Weller, 2012). Sin embargo, este es el primer reporte donde se observa que previene el aumento en la conducta tipo ansiedad en respuesta a un reto hormonal como la supresión brusca de progesterona. Por lo anterior, es factible decir que el AE podría representar una herramienta no farmacológica efectiva para la contención de la ansiedad inducida por abstinencia a progesterona. A pesar de que aún no se ha esclarecido el mecanismo por el cual el AE ejerce efectos benéficos sobre el comportamiento de los animales, se sugiere que esta condición de alojamiento contribuye a cambios en la plasticidad neuronal que proporcionan herramientas de contención conductual que reducen la respuesta a retos estresantes (Castren et al., 2007).

En el presente trabajo se evaluó la respuesta de varios componentes del eje HHA ante la supresión brusca de progesterona como una primera aproximación al estudio de los mecanismos involucrados en la regulación de la conducta tipo ansiedad en diferentes condiciones experimentales.

Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico (EC) y ambiente enriquecido (AE) sobre la expresión del RNAm de CRH en el PVN, corticosterona en suero, RNAm de GR y RNAm de CRH en hipocampo como indicadores de la actividad del eje HHA en ratas Wistar.

La supresión brusca de progesterona incrementó la expresión del RNAm de CRH en el PVN de ratas Wistar. Estudios previos muestran que en respuesta a diversos estresores como la exposición al BBT (Gutierrez-Mariscal et al., 2008) y la separación materna (Dent et al., 2000), ambos estresores psicogénicos (que alteran la emocionalidad pero que no comprometen la integridad física del animal), se incrementa la expresión del RNAm de CRH en el PVN. Más aún, ante un reto que produce cambios a nivel fisiológico como la abstinencia a opioides (Nunez et al., 2007) y alcohol (Silva et al., 2002) se observa un aumento en la expresión génica de CRH en PVN. Lo anterior permite sugerir que el reto hormonal por sí mismo constituye un estresor capaz de inducir la transcripción del gen de CRH en el PVN, lo que podría ser un indicador de la activación del eje HHA (Herman et al., 2016). Así mismo, en otros estudios se ha demostrado que en una situación endocrina similar, como el periodo post-parto, se observa la misma respuesta en ratas (da Costa et al., 2001). Una posible explicación al incremento del RNAm de CRH en el PVN podría ser que la disminución drástica de hormonas gonadales, simulada por la supresión hormonal, produzca la reducción de los niveles de neuroesteroides como la

alopregnanolona (ALO), pues se ha demostrado que la ausencia de ALO en ratas gestantes aumenta la expresión del RNAm de CRH en el PVN, mientras que la presencia de ALO la reduce (Brunton et al., 2009). Otros estudios muestran que la ALO inhibe la activación del eje HHA al disminuir los niveles de corticosterona en respuesta al estrés (Barbaccia, Serra, Purdy y Biggio, 2001).

En relación a los niveles de corticosterona, no se observaron cambios por la exposición a la prueba conductual, ni por supresión brusca de progesterona en ratas Wistar. Dado el estrés que supone el enterramiento defensivo (Roth et al., 2012), así como el reto hormonal por supresión brusca de progesterona (Islas-Preciado et al., 2016; Saavedra et al., 2006), se esperaría un aumento en los niveles de corticosterona; sin embargo, es probable que esto no se haya observado debido a que la ovariectomía (OVX) *per se* produce un incremento en las concentraciones de este glucocorticoide (Vega-Rivera et al., 2013). Más aún Vega-Rivera et al., (2013) reportaron que la exposición al paradigma de Nado Forzado, considerado como un estresor fuerte (Kirby et al., 1996), eleva los niveles de corticosterona al doble de lo observado en animales control. Por lo tanto, es probable que la exposición al enterramiento defensivo y la supresión de progesterona no fueran lo suficientemente fuertes para provocar un efecto mayor al que provocó la OVX. Otra posibilidad para explicar este hallazgo, es que en estudios previos se ha reportado que el aumento de corticosterona sigue un curso temporal que alcanza su pico máximo alrededor de 30 minutos posteriores a la exposición al estrés (Muir y Pfister, 1987). En nuestros experimentos el sacrificio se realizó a los 60 minutos, lo que deja abierta la posibilidad de no haber detectado el incremento de corticosterona debido al tiempo de sacrificio.

La exposición a la prueba de enterramiento defensivo no provocó cambios en la expresión del RNAm de receptores a GR en ratas Wistar. En contraste, se ha reportado una

disminución en los niveles del RNAm de GR en hipocampo por la exposición al paradigma de Nado Forzado (Calvo, et al., 2011). Es posible que las diferencias observadas en el presente trabajo con respecto al reporte de Calvo et al. (2011) en la expresión del RNAm GR, estén relacionadas al estresor que se aplicó, su intensidad y duración (Chrousos, 2007). En este sentido, es probable que la prueba de enterramiento defensivo no sea un estímulo cuya intensidad sea capaz de modificar la expresión del RNAm de GR en esta cepa.

En contraste, la supresión brusca de progesterona redujo la expresión del RNAm de GR en el hipocampo, sugiriendo que el reto hormonal sí es capaz de modular la expresión génica de GR. Estudios previos muestran que la ovariectomía causa un decremento en los niveles hipocampales del RNAm de GR (Patchev y Almeida, 1996). En nuestro estudio se utilizaron hembras OVX, lo que lleva a considerar que de manera basal se tendrían niveles bajos de RNAm de GR. Una limitante del presente estudio es que no se incluyeron animales intactos, por lo que no es posible corroborar si la OVX *per se* reduce la expresión del RNAm de estos receptores. Sin embargo, aún en esta condición de OVX, el reto hormonal redujo los niveles del RNAm de GR en relación al grupo tratado con aceite, lo que confirma que los niveles de hormonas esteroides modulan la transcripción de los genes de GR. Lo anterior se apoya en el hecho de que la disminución del RNAm de GR observada en animales OVX se revierte cuando se administra estradiol más progesterona en dosis que simulan condiciones fisiológicas (Patchev y Almeida, 1996; Patchev et al., 1996). Más aún, dado que niveles altos de la proteína de GR se relacionan con el control eficaz de la respuesta del eje HHA (de Kloet et al., 1998), entonces la disminución del RNAm de este receptor en respuesta a la supresión brusca de progesterona podría traducirse en la disminución de la proteína y por lo tanto, en un control deficiente de la

respuesta al estrés. A partir de nuestros datos no es posible corroborar esta propuesta, por lo que estudios posteriores contribuirán a afirmar dicha hipótesis.

Por otra parte, los resultados obtenidos en la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo, mostraron que la supresión brusca de progesterona disminuye el RNAm de este péptido. Debido a que la ausencia de neuroesteroides provoca una regulación a la alta de algunos componentes del eje HHA como el CRH del PVN, la AVP y la corticosterona (Girdler, et al., 2007; Patchev y Almeida, 1996; Patchev, et al., 1996), se esperaría un aumento del RNAm de CRH en el hipocampo en los grupos sometidos a la supresión brusca de progesterona, sin embargo esto no se observó. Es notable que nuestros datos coinciden con los de los estudios de Patchev y Almeida y de Patchev et al (1996) en relación a la expresión del RNAm de GR, mas no en los resultados del RNAm de CRH en hipocampo. Esta discrepancia podría deberse a que los GR y la CRH en el hipocampo no son modulados por las hormonas gonadales de la misma manera y que el efecto sobre la expresión del RNAm de CRH podría ser dependiente del tiempo post-OVX, ya que los autores mencionados midieron la expresión del RNAm 6 días post-OVX en tanto que en el presente trabajo se hizo 21 días después de la OVX. De acuerdo a nuestros datos, el RNAm de GR en hipocampo y el RNAm de CRH del PVN son sensibles al reto hormonal, lo que contrasta con la falta de efecto sobre el RNAm de CRH del hipocampo. Estudios específicos permitirán corroborar esta propuesta.

Por otra parte, la exposición a EC provocó una disminución aproximada del 80% de la expresión del RNAm de CRH en PVN con respecto a la expresión de los animales alojados en SC, tratados con aceite que no fueron evaluados en el enterramiento defensivo, lo que sugiere que la regulación de este punto del eje HHA está atenuada. En apoyo a esto,

la supresión brusca de progesterona no provocó cambios en la expresión del RNAm de CRH en PVN como se hubiera esperado, dado lo observado en animales alojados en situación control en donde se presentó un aumento en el RNAm de CRH en el PVN por el reto hormonal, sugiriendo la desregulación de la respuesta al estrés en condiciones de estrés crónico. Esto podría explicarse con datos previos en los que se ha señalado que la exposición prolongada a estrés reduce la expresión de la proteína de CRH al tiempo que se incrementa la AVP, como consecuencia de un cambio adaptativo para compensar la respuesta al estrés (Aguilera, et al., 2008; Volpi, et al., 2004). En apoyo a esta propuesta, se ha observado una disminución en la expresión del RNAm de CRH y un aumento del RNAm de AVP en el PVN ante el estrés crónico por restricción de espacio (Ma y Lightman, 1998) y en respuesta a un estresor novedoso en ratas habituadas a la restricción (Ma, Lightman y Aguilera, 1999). La evidencia anterior nos permite sugerir que la reducción del RNAm de CRH en PVN observada en el presente trabajo es consecuencia de un cambio adaptativo que podría reflejarse en un aumento en los niveles del RNAm de AVP. Una limitante del presente trabajo es que no se realizó la medición de este parámetro, por lo que se necesitan experimentos adicionales que permitan corroborar lo sugerido.

Respecto al RNAm de GR en el hipocampo, el estrés crónico redujo su expresión en relación a lo observado en animales en SC tratados con aceite y no expuestos al enterramiento defensivo. Este resultado coincide con datos previos de la literatura (Herman et al., 1995; Paskitti et al., 2000). Al someter al animal a un estresor adicional (el reto conductual por enterramiento defensivo y el reto hormonal por supresión brusca de progesterona), se produjo un aumento en el RNAm de GR contrario a lo observado en los animales sometidos a la situación control, en donde la supresión brusca de progesterona redujo la expresión del RNAm de GR en el hipocampo. Más aún, el grupo que recibió

ambos estresores adicionales (enterramiento defensivo más supresión brusca de progesterona) mostró mayor expresión del RNAm de GR en relación a los otros grupos. El hecho de que en animales estresados crónicamente se observara un incremento del RNAm de GR en respuesta al estresor conductual y al hormonal sugiere que la condición experimental facilita los cambios en la expresión génica de estos receptores. Un estudio previo que podría apoyar este resultado, tomando en cuenta las diferencias en la evaluación de la expresión de GR (número de receptores vs RNAm en el presente trabajo), reportó que en animales expuestos a estrés crónico y posteriormente a un estresor psicogénico (la prueba de laberinto en cruz), hubo un aumento en la expresión de GR (Furay, Bruestle y Herman, 2008) al tiempo que disminuyó la corticosterona circulante, sugiriendo que se restableció la funcionalidad del receptor y la inhibición del eje adrenal (Furay, Bruestle y Herman, 2008). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, las concentraciones de corticosterona no cambiaron respecto al grupo alojado en SC y tampoco se observaron cambios en los animales expuestos a EC y sometidos posteriormente a la prueba conductual o a la supresión brusca de progesterona. Esta discrepancia podría explicarse al considerar los tiempos en los que fueron sacrificados los animales. En el caso del reporte de Furay, Bruestle y Herman (2008) el sacrificio se realizó a los 30, 60 y 180 min posteriores a la exposición al estresor y el descenso en los niveles de corticosterona lo encontraron a los 180 min, en contraste, en el presente trabajo el sacrificio se realizó a los 60 min. Es posible que debido al tiempo de sacrificio no se hayan detectado los cambios en los niveles de corticosterona.

A su vez, el EC disminuyó la expresión del RNAm de CRH en hipocampo en relación al grupo alojado en SC con aceite de maíz y no sometido al enterramiento defensivo, y no se observó un efecto adicional en respuesta al reto de enterramiento defensivo ó a la supresión brusca de progesterona, lo que sugiere un aplanamiento de la

respuesta de CRH en hipocampo. Entonces, el hecho de que la expresión del RNAm de CRH hipocampal no se modificara con los retos por enterramiento defensivo y supresión brusca de progesterona posteriores al protocolo de EC sugiere que este componente del eje pudo verse afectado en su funcionalidad por la previa exposición a estrés crónico. Más aún, el hecho de que no se observara cambio en los niveles de corticosterona podrían apoyar esta propuesta, basándonos en la hipótesis del ‘aplanamiento’ en la respuesta del eje HHA ante el estrés crónico, en la cual el eje no puede responder ante estímulos estresantes posteriores, haciendo su regulación inefectiva, lo que conlleva a patologías como la ansiedad (de Kloet et al., 2005).

Es importante notar que mientras la expresión del RNAm de CRH del hipocampo parece reducirse por el estrés crónico, la expresión del RNAm de GR de la misma área está aumentada. Este incremento podría ser una respuesta *contrarreguladora* del organismo para mantener el control inhibitorio del eje (Makino et al., 2001) y que podría traducirse en la ausencia de cambio en los niveles de corticosterona, hecho que se observa en el presente trabajo en condiciones de estrés crónico. Es factible considerar que la regulación de GR en el hipocampo se vuelve prioritaria para devolver la homeostasis al organismo mediante la inhibición del eje HHA. A partir de nuestros datos no es posible formular una conclusión, por lo que se requiere de estudios específicos que nos permitan corroborar esta hipótesis.

Por otro lado, bajo las condiciones estandarizadas de la técnica RT-PCR para la situación control y estrés crónico, no fue posible detectar la expresión del RNAm de CRH en el PVN en animales expuestos al protocolo de ambiente enriquecido. Es posible que esto se deba a que el ambiente enriquecido disminuyó la expresión del RNAm de CRH, de tal manera que no fue posible detectarlo en la semi-cuantificación por RT-PCR. Es

importante señalar que si los valores de expresión del RNAm hubieran sido más elevados que en la situación control, se hubiera podido semi-cuantificar por la intensidad de la banda en el gel, por lo que es posible descartar un incremento en la expresión del RNAm de CRH en el PVN. El hecho de que en las mismas condiciones experimentales se haya detectado el RNAm de CRH en otros grupos y en la cepa WKY sometida al protocolo de ambiente enriquecido, permite considerar que en efecto el ambiente enriquecido redujo el RNAm de este neuropéptido en el PVN en la cepa Wistar. Nuestros datos contrastan con estudios previos en los que no se observan cambios en la expresión del RNAm de CRH en el PVN en respuesta al ambiente enriquecido en animales previamente estresados por separación materna (Francis et al., 2002) o por el reto de derrota social (McQuaid et al., 2013) cuyos niveles del RNAm de CRH son detectables. Es posible entonces, que la exposición previa al estrés en esos trabajos haya cancelado el efecto del ambiente enriquecido en este punto de regulación del eje. Diversos estudios muestran que el ambiente enriquecido parece ser benéfico para la actividad de algunos componentes del eje HHA al reducir los niveles circulantes de ACTH y de corticosterona (Welberget al., 2006; Du et al., 2012; Novak et al., 2013). En concordancia a estos hallazgos, nuestros resultados muestran que la exposición al ambiente enriquecido disminuye los niveles de corticosterona en relación con el grupo de SC.

La supresión brusca de progesterona provocó una tendencia en el aumento de los niveles de corticosterona y la exposición al enterramiento defensivo los elevó significativamente en los animales del ambiente enriquecido. Es importante recordar que la corticosterona es considerada un indicador importante de la activación del eje HHA (Gunnar y Quevedo, 2007) y se asume que mayores niveles de corticosterona reflejarán mayor estrés, y viceversa (Natelson et al., 1988; Jarcho et al., 2016). Sin embargo, este supuesto ha de ser considerado con algunas reservas. Por ejemplo, el hecho de que

aumenten los niveles circulantes de glucocorticoides también podría hacer referencia a una buena respuesta del eje HHA ante el estrés (Barnum et al., 2007). En este sentido, el aumento en los niveles de corticosterona en respuesta a la supresión brusca y al enterramiento defensivo en los animales expuestos a ambiente enriquecido, podría ser indicador de una respuesta funcional del eje que favorecerán la conducta adaptativa en el individuo, lo cual podría estar asociado con la reducción de la ansiedad observada en los animales expuestos al ambiente enriquecido en el presente estudio.

La expresión del RNAm de GR se incrementó cuando se combinó el reto conductual con el hormonal en los animales expuestos al AE. Nuestros resultados coinciden con un estudio previo que reporta que el ambiente enriquecido incrementó los niveles de GR incluso después de someter a los animales a estrés crónico y, a su vez, redujo la conducta de inmovilidad en el Nado Forzado (Zanca et al., 2015). Si bien en el reporte de Zanca et al. (2015) se evaluó la expresión de la proteína y en el presente estudio el RNAm de GR, los resultados van en línea con la propuesta de que el ambiente enriquecido podría facilitar un mecanismo protector al aumentar la expresión de GR en el hipocampo (Fox et al., 2006; Lehmann y Herkenham, 2011) y proporcionar un mecanismo de retroalimentación efectiva que permita una mejor contención del estrés.

En general, la expresión del RNAm del CRH en el hipocampo disminuyó con el ambiente enriquecido en comparación a los animales sometidos a SC, tratados con aceite y no expuestos al enterramiento defensivo. Nuestros hallazgos concuerdan con estudios previos en donde se muestra que la exposición a AE disminuye la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo (Wang et al., 2014) así como de la proteína (Korbey, Heinrichs y Leussis, 2008; Wang et al., 2014), en animales sometidos a diferentes estresores antes que

al enriquecimiento ambiental. Por otro lado, el hecho de que la supresión brusca de progesterona incrementara el RNAm del CRH en el hipocampo parece contrario a lo esperado. Sin embargo como se discutió previamente, el aumento observado podría deberse a que esta manipulación está favoreciendo la respuesta del eje HHA y en consecuencia promueve la disminución de la conducta ansiosa. Se sabe que el hipocampo juega un papel importante en la adaptación funcional al estrés y para ello es necesario que el CRH mantenga una regulación dosis, tiempo-dependiente adecuada para modular procesos cognitivos y fortalecer la plasticidad sináptica (Maras y Baram, 2012). En apoyo a esto, Wang et al., (2014) reportó una mejoría en el rendimiento en la prueba de laberinto acuático de Morris y en la prueba de reconocimiento de objetos al tiempo que disminuye la expresión de la proteína de CRH en el hipocampo, aportando evidencia de los efectos positivos del ambiente enriquecido en la regulación de CRH y las conductas de aprendizaje que develan un proceso adaptativo (Wang et al., 2014).

Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico (EC) y ambiente enriquecido (AE) sobre la ansiedad experimental en ratas WKY.

La supresión brusca de progesterona incrementó la conducta tipo ansiedad en ratas WKY, una cepa considerada vulnerable al estrés (Paré y Redei, 1993). Estos resultados aportan evidencia de que esta cepa, al igual que la Wistar, es sensible a estresores fisiológicos, en este caso la supresión de progesterona (Islas-Preciado et al., 2016). Un dato que refuerza lo señalado es un reporte previo que muestra que en hembras WKY, el ambiente hormonal que se establece durante la pubertad induce cambios transcripcionales en algunos genes por ejemplo la peptidasa específica de ubiquitina 40 (USP40) o subunidad 26s reguladora de proteasa (PSM6) que pueden precipitar la aparición de

conductas tipo ansiedad en la etapa adulta (Mehta et al., 2013). En este sentido, es posible sugerir que mediante retos al entorno hormonal, como la supresión de brusca progesterona, se puede exacerbar la expresión de conductas tipo ansiedad.

Bajo las condiciones de estrés crónico utilizadas en el presente trabajo se pudo observar un incremento en la ansiedad activa en relación al grupo que permaneció en alojado en SC, lo que sugiere que este protocolo induce la expresión de conductas activas en el modelo de ansiedad en una cepa que suele ser proclive a la manifestación de ansiedad a través de la expresión de comportamientos pasivos (Paré, 1993). Por otro lado, la exposición al estrés crónico aumentó la conducta pasiva tipo ansiedad y este resultado concuerda con lo reportado por Roman et al., (2004), quienes también reportaron un aumento de la ansiedad experimental utilizando el modelo de campo abierto, después de la exposición a estrés crónico en ratas macho WKY.

Por otra parte, la supresión brusca de progesterona exacerbó la expresión de la ansiedad mediante conductas pasivas, mas no activas, en animales sometidos a estrés crónico. Dado que el estrés crónico favoreció la manifestación de conductas activas es factible considerar que la combinación de retos (estrés crónico más supresión brusca de progesterona) promuevan un aumento en la conducta tipo ansiedad que lleve al animal a regresar a expresarla principalmente a través de conductas pasivas, lo que ha sido considerado como indicador de menor capacidad de adaptación de los animales al estrés (Roth et al., 2012). Esto permite sugerir que en condiciones de estrés crónico, las WKY son más vulnerables al estrés.

De manera interesante, el AE provocó el incremento de las conductas activas en el modelo de ansiedad, al igual que lo observado en el EC. Sin embargo, es importante notar

que el AE redujo la ansiedad pasiva en relación al EC y la SC y aunado a esto, previno el aumento en la conducta tipo ansiedad inducida por la abstinencia a progesterona. Tomando de manera integral lo anterior, es posible sugerir que el ambiente enriquecido puede contribuir al desarrollo de una estrategia de afrontamiento conductual activa, en vez de una pasiva y en este sentido, se ha propuesto que la adopción de una conducta activa como manifestación de la ansiedad experimental, es una respuesta más adaptativa hacia el entorno (Roth et al., 2012; Bowen et al., 2014).

Asimismo, la reducción en la ansiedad experimental provocada por la exposición al AE, concuerda con reportes previos en los que se ha observado una disminución de ésta en paradigmas como el laberinto de brazos elevados (Benaroya-Milshtein et al., 2004) y el campo abierto (Curley et al., 2009) tanto en ratas de otras cepas como en WKY (Rosenfeld y Weller, 2012). Además, el hecho de que el AE previniera el incremento de la ansiedad experimental inducida por la supresión brusca de progesterona en ratas WKY, permite sugerir que esta manipulación ambiental podría ser una estrategia útil en humanos para contender con la ansiedad relacionada a la abstinencia hormonal, incluso en sujetos considerados vulnerables al estrés.

Efecto de la abstinencia a progesterona, el estrés crónico (EC) y ambiente enriquecido (AE) sobre la expresión del RNAm de CRH en el PVN, corticosterona en suero, RNAm de GR y RNAm de CRH en hipocampo como indicadores de la actividad del eje HHA en ratas WKY.

La expresión del RNAm de CRH en PVN en ratas WKY disminuyó por la supresión de progesterona y la exposición al enterramiento defensivo, lo que sugiere una respuesta aplanada en este nivel de la regulación del eje HHA. En un estudio previo

(Gutierrez-Mariscal et al., 2008) se encontró que la expresión del RNAm de CRH en el PVN en ratas macho WKY se incrementa por exposición al enterramiento defensivo a los 30 minutos posteriores de la prueba conductual. Los resultados del presente trabajo contrastan con lo reportado por Gutierrez-Mariscal y cols. (2008) y esta discrepancia puede ser explicada por las diferencias en la aproximación metodológica seguida, ya que en el estudio citado se utilizaron ratas macho vs hembras en el presente estudio; además del tiempo en el que se realizó el sacrificio (30 min. vs 60 min. en el presente trabajo). Otra posible explicación para los presentes resultados es el hecho de que la expresión del RNAm de CRH en PVN podría estar disminuida debido a la manipulación del animal, como se reportó previamente por Meaney (2001). En el presente trabajo, los animales fueron manipulados durante la habituación al enterramiento defensivo y la administración de progesterona y en ese sentido, lo que podría enmascarar el efecto de la exposición a la prueba conductual así como los efectos de la sola supresión brusca de progesterona. Sin embargo, al combinar el enterramiento defensivo más la supresión brusca de progesterona, se observó un incremento en el RNAm de CRH en PVN, por lo que se sugiere que la suma de los retos sensibiliza la expresión génica de CRH a pesar de la manipulación previa de estos animales.

Los resultados de los niveles de corticosterona revelaron que se presentó una marcada tendencia a incrementarse por la supresión brusca de progesterona en combinación con el enterramiento defensivo. Con base en este resultado, pareciera que es necesario retar al organismo con estímulos sumados para observar una respuesta en los niveles de corticosterona. En apoyo a esta idea, algunos autores han reportado que en ratas macho WKY, el estrés crónico (Gómez et al., 1996; Andrus et al., 2012) pero no el estrés agudo (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008; Shepard y Myers, 2008), incrementa los niveles de

corticosterona. Esto sugiere que es necesaria una estimulación mayor para observar una respuesta en este componente del eje HHA.

En relación a la expresión del RNAm de GR en hipocampo, se observó una disminución por la supresión brusca de progesterona, lo que sugiere que en hembras WKY, el RNAm de GR parece ser más responsivo ante manipulación hormonal que al reto conductual. Como se mencionó, en ratas hembra Wistar, se observó una disminución en el RNAm de GR después de 24 de horas de abstinencia a progesterona (Patchev y Almeida, 1996), sin embargo no se tiene un reporte previo realizado en ratas WKY para contrastar nuestro resultado. Por otra parte, la exposición a enterramiento defensivo no indujo cambios en la expresión del RNAm de GR en hipocampo lo que podría estar en línea con lo reportado por Shukla et al., (2010) en ratas macho WKY, en donde observan que los niveles de la proteína de GR no se alteran por la exposición a este paradigma conductual. Tomando en cuenta lo anterior, es posible que la expresión génica de GR sea más reactiva a retos hormonales que a retos conductuales, lo cual concuerda con lo observado en la cepa Wistar en el presente estudio.

La exposición al enterramiento defensivo provocó un aumento del RNAm de CRH en hipocampo, fenómeno que no se observó en las ratas de la cepa Wistar en el presente estudio. Este incremento puede estar relacionado con lo reportado en la literatura que considera a la cepa de ratas WKY más sensible al estrés en comparación con la cepa Wistar (Paré y Redei, 1993). Más aún, el reto hormonal por supresión brusca de progesterona produce una marcada tendencia al aumento en la expresión del RNAm del CRH en las ratas WKY, lo cual contrasta con lo observado en la cepa Wistar, donde se observó un decremento en el RNAm de CRH en el hipocampo.

Es posible que la aparente regulación inversa de la expresión del RNAm de CRH en el hipocampo y PVN, alta en hipocampo y baja en PVN, pudiera estar asociada a la neurotransmisión GABAérgica (Jankord y Herman, 2008). En este sentido, podría esperarse que el CRH del hipocampo incrementa por la exposición a estrés agudo y ejerza un aumento de la inhibición, dado que las neuronas CRHérgicas sintetizan y liberan GABA (Maras y Baram, 2012), y esta inhibición puede extenderse hacia el PVN (Cullinan et al., 1993), provocando el decremento observado en el presente estudio en el RNAm de CRH en ratas WKY. Estudios específicos permitirán corroborar esta hipótesis.

Por otro lado, el estrés crónico disminuyó la expresión de RNAm del CRH en PVN en comparación al grupo de situación control tratado con aceite y que no fue expuesto al enterramiento defensivo. Pero no hubo cambios adicionales en la expresión del RNAm de CRH en el PVN producidos por los retos del enterramiento defensivo y la supresión brusca de progesterona. Tomando en cuenta que las ratas WKY se encuentran en una condición crónica de estrés (Andrus et al., 2012) facilitada por la hiperreactividad del eje HHA, es factible pensar que la regulación de CRH en PVN se encuentre afectada, provocando una respuesta atenuada de estos animales ante el estrés. En apoyo a esta idea se ha reportado que el estrés crónico produce una activación sostenida del eje HHA, que puede provocar el aplanamiento de la respuesta de los principales mediadores de la actividad del mismo (Gadek-Michalska et al., 2013; Gunnar y Quevedo, 2007; Jankord y Hermann, 2008). Otra posible explicación a la disminución de la expresión del RNAm de CRH en PVN es la hipótesis del cambio hacia AVP, donde AVP se convierte en el principal regulador del eje HHA en condiciones de estrés crónico (Aguilera, 2008). Esta hipótesis sobre la relevancia de AVP en el estrés crónico concuerda con un estudio previo (Pedraza-Castro, datos no publicados) en donde se muestra que la expresión del RNAm de CRH en ratas WKY

permanece ‘aplanada’ después de la exposición a un estresor al tiempo que se observa el incremento de la expresión del RNAm de AVP en el PVN. En este sentido, es posible que AVP esté también regulando la respuesta de corticosterona en condiciones de estrés crónico.

En general, los animales de la cepa WKY sometidos a estrés crónico muestran mayores niveles de corticosterona respecto al grupo que permaneció en situación control y esto concuerda con estudios previos realizados en ratas de la cepa WKY (Gómez et al., 1996; Djordjevic et al., 2007; Scheuer, 2010). Más aún, en los animales de estrés crónico, la supresión brusca de progesterona produjo un incremento en relación al grupo tratado con aceite. Este aumento en las concentraciones de corticosterona pareciera ir en contra de la hipótesis del aplanamiento del eje HHA. Sin embargo, dada la condición de estrés crónico, la corticosterona podría estar siendo regulada por AVP en vez de CRH. A partir de nuestros datos, no es posible confirmar esta propuesta, sin embargo, como se mencionó anteriormente, en esta cepa la expresión del RNAm de AVP en PVN está incrementada (Pedraza-Castro, datos no publicados). Más aún, existe evidencia que muestra que la aparente desensibilización del eje HHA evaluada a través de los niveles de corticosterona, desaparece al exponer a los animales a un estresor diferente (Shoji y Mizoguchi, 2010). Es posible entonces que la respuesta de corticosterona ante el reto hormonal en este trabajo sea resultado del cambio de estresor.

La expresión del RNAm de GR en hipocampo disminuyó por la exposición al estrés crónico y esto concuerda con lo reportado por Gómez y cols. (1996) en ratas macho WKY después de someterlas a un estresor crónicamente. En esta cepa, en contraste a lo observado con la cepa Wistar en las mismas condiciones de estrés, el reto conductual por enterramiento defensivo redujo aún más los niveles del RNAm de GR. Por lo anterior, es

posible considerar que la cepa WKY cuando es expuesta crónicamente a estrés, cambia su sensibilidad a retos psicogénicos, como el enterramiento defensivo o fisiológicos, como la supresión brusca de progesterona. En apoyo a esta propuesta la supresión brusca de progesterona no indujo cambios en la expresión del RNAm de GR, contrario a lo observado en la misma cepa de ratas en situación control.

Por otro lado, el estrés crónico aumentó la expresión del RNAm de CRH en hipocampo aproximadamente en 150% respecto al grupo alojado en SC. Este resultado está en línea con lo reportado previamente en ratas Wistar clasificadas como ‘altamente ansiosas’ las cuales en respuesta a estrés crónico por restricción mostraron un incremento en el número de células inmunorreactivas a CRH en hipocampo (Wisłowska-Stanek et al., 2016). Los retos conductual y hormonal no produjeron cambios adicionales en la expresión del RNAm de CRH en hipocampo, lo que podría ser el resultado de un efecto de techo producido por el estrés crónico.

Por otra parte, tomando en cuenta que el CRH del hipocampo ejerce un papel excitador sobre la transmisión GABAérgica (Cullinan et al., 1993) podría esperarse un aumento en la inhibición de GABA mediada por interneuronas del núcleo del lecho de la estría terminal que proyectan hacia el PVN, provocando la inhibición de las neuronas CRHérgicas, lo que conllevaría a menor ansiedad (Chen et al., 2004b), sin embargo, esto no se observó y por el contrario la ansiedad se aumentó en ratas sometidas a estrés crónico. Este hecho podría explicarse considerando lo reportado por Ventura-Silva y cols. (2012), quienes observan que el estrés crónico cambia el patrón de respuesta de las neuronas CRHérgicas (de excitador hacia inhibidor) fundamentalmente sobre el neurotransmisor GABA. Más aún, Albrecht et al. (2016) reportaron que el estrés reduce la expresión del

transportador a GABA en el giro dentado, lo cual afecta el balance inhibitorio provocando un estado hiper-ansioso. Dada la condición de estrés basal en la que se encuentra la cepa WKY es factible considerar que se presente una alteración en el sistema GABAérgico en el hipocampo.

Por otra parte, la exposición a AE redujo los niveles del RNAm de CRH en PVN en relación al grupo de situación control tratado con vehículo sin exposición al enterramiento defensivo. Nuestros resultados contrastan con los de un estudio previo que muestra que la expresión del RNAm de CRH en el PVN no cambió por la exposición al AE en ratas macho Long-Evans sometidas a estrés por separación materna (Francis et al., 2002). Los autores concluyen que el AE no es capaz de modular la expresión génica de CRH en el PVN. La diferencia de resultados podría explicarse si consideramos que la separación materna es por sí misma un estresor más intenso que los cambios que se presentan durante el protocolo de AE, por lo tanto, es factible sugerir que los efectos del AE sobre la expresión del RNAm de CRH en PVN son dependientes del estresor aplicado. En apoyo a esta propuesta la combinación de estresores como la supresión brusca de progesterona y el enterramiento defensivo en el presente trabajo restableció los niveles del RNAm de CRH a valores similares a los del grupo alojado en la situación control y en ese sentido concuerdan con lo reportado por Francis et al. (2002).

Los niveles de corticosterona en las ratas WKY se redujeron por la exposición a AE y esto va en acuerdo con un estudio previo realizado en la misma cepa de ratas (Rosenfeld and Weller, 2012). Por otro lado, la supresión brusca de progesterona sumada al enterramiento defensivo produjo una disminución adicional de los niveles de corticosterona y esto parece estar en línea con reportes previos (Fox et al., 2006), que

sugieren que el AE es más efectivo en animales retados por diversos estresores que en aquellos no estresados.

La exposición a AE mantuvo los niveles de la expresión del RNAm de GR en hipocampo respecto a los niveles de la SC. Este resultado concuerda con algunos estudios en otras cepas de ratas en donde las condiciones de AE (el tiempo de duración y la exposición a estrés agudo después del AE) son similares a las utilizadas en el presente estudio (Olsson et al., 1994; Baldini et al., 2013). Por otro lado, el AE fue capaz de prevenir la disminución del RNAm de GR causada por la supresión brusca de progesterona que se observó en la situación control. En este sentido, se ha propuesto que mayores niveles de GR en hipocampo promueven una terminación eficaz de la respuesta del eje HHA (Meaney y Szyf, 2005; Fox et al., 2006). Tomando en cuenta lo anterior, la prevención en la disminución del RNAm de GR en hipocampo podría estar relacionada con el decremento del RNAm de CRH en PVN en animales expuestos a AE respecto a la SC, al tiempo que los niveles de corticosterona fueron menores respecto a la SC. Por lo tanto, se sugiere que el AE es efectivo para reducir los niveles de RNAm de CRH en el PVN, disminuir los niveles de corticosterona y prevenir el decremento del RNAm de GR en una cepa vulnerable al estrés como la WKY.

En relación al RNAm de CRH en el hipocampo, se encontró un aumento en su expresión por la exposición al AE. Este resultado es contrario a lo reportado por Wang et al. (2014) en donde observaron que el RNAm de CRH del hipocampo fue disminuido por la exposición a AE, después de la aplicación de estresores en etapas tempranas de la vida, pero dicha discrepancia podría estar dada por esta diferencia metodológica. Es importante notar que el reto por supresión brusca de progesterona fue capaz de aumentar el RNAm de

CRH en hipocampo más allá del aumento promovido por la exposición al AE, sugiriendo que el AE está facilitando la transcripción de los genes de CRH en respuesta al reto hormonal en esta estructura.

De manera interesante, el AE redujo la expresión del RNAm de CRH en hipocampo cuando se combinó el reto de enterramiento defensivo con la supresión brusca de progesterona. Esto sugiere que el efecto del ambiente enriquecido es especialmente evidente cuando existe algún desafío para el animal (Fox, et al., 2006; Morley-Fletcher et al., 2003.), de ahí que se observe una disminución en la transcripción génica de CRH en hipocampo cuando el animal es retado con la combinación de prueba conductual más la supresión brusca de progesterona.

Después de evaluar los efectos del estrés crónico y el ambiente enriquecido sobre la ansiedad experimental inducida por la abstinencia a progesterona en dos cepas de ratas, se demostró que en las ratas Wistar el estrés crónico no promovió la exacerbación de la conducta ansiosa y la modulación del eje HHA parece no responder ante la prueba conductual y el reto hormonal. Por el contrario, en ratas WKY el estrés crónico promovió la exacerbación de la conducta ansiosa, así como el aplanamiento en la respuesta hacia los estresores adicionales (el enterramiento defensivo y la supresión brusca de progesterona)

En relación al ambiente enriquecido, se observó que en ratas Wistar éste previno la ansiedad inducida por supresión brusca de progesterona . Por otro lado, la respuesta de las ratas WKY al ambiente enriquecido fue más notoria que la de las ratas Wistar dado que se observaron niveles menores de ansiedad, así como la prevención de la conducta ansiosa en respuesta a la abstinencia a progesterona. Asimismo, algunos componentes del eje HHA

parecen responder a los retos tanto conductual como hormonal, lo cual sugiere el restablecimiento en la actividad de dicho eje en animales expuestos al ambiente enriquecido. El hecho de que las ratas WKY fueran más sensibles al efecto del ambiente enriquecido puede deberse a que los beneficios de esta condición experimental son más evidentes cuando se trata de animales considerados altamente ansiosos (Klein et al., 1994; Fox et al., 2006), como es el caso de la cepa WKY (Paré, 1993; Paré, 2000).

Conclusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que las condiciones experimentales influyen en la expresión de la conducta ansiosa. Además, que el EC es un modelo apto para inducir la exacerbación de la ansiedad inducida por la supresión brusca de progesterona en ratas WKY. Asimismo, el AE es capaz de prevenir la ansiedad inducida por la supresión brusca de progesterona en ambas cepas de ratas.

Por otro lado, las condiciones experimentales influyen en la modulación del eje HHA, observándose que el EC produce un aplanamiento en algunos puntos de regulación del eje de manera diferencial entre las cepas. En cuanto al AE, se observó que esta condición experimental mejora la actividad de algunos componentes del eje HHA dependiendo de la cepa.

Por lo tanto, es posible sugerir que el AE resulta una aproximación útil para la reducción de la ansiedad inducida por abstinencia a progesterona, incluso en una cepa vulnerable al estrés como la WKY.

Referencias Bibliográficas

- Aguilera, G., Subburaju, S., Young, S., Chen, J. (2008). The Parvocellular Vasopressinergic System and Responsiveness of the hypothalamic Pituitary Adrenal Axis during Chronic Stress. *Progress in Brain Research*, 170, 29–39.
- Albrecht, A., Ivens, S., Papageorgiou, I.E., Çalışkan, G., Saiepour, N., Brück, W., Richter-Levin, G., Heinemann, U. y Stork, O. (2016). Shifts in excitatory/inhibitory balance by juvenile stress: A role for neuron-astrocyte interaction in the dentate gyrus. *Glia*, 64(6), 911-922.
- American Psychiatric Association, (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. (5th ed.). Washington, D.C.
- Andrus, B.M., Blizinsky, K., Vedell, P.T., Dennis, K., Shukla, P.K., Schaffer, D.J., Radulovic, J., Churchill, G.A. y Redei, E.E. (2012) Gene expression patterns in the hippocampus and amygdala of endogenous depression and chronic stress models. *Molecular Psychiatry*, 17(1), 49-61.
- Appenrodt, E., Schnabel, R.† y Schwarzberg, H. (1998). Vasopressin Administration Modulates Anxiety-related Behavior in Rats. *Physiology & Behavior*, 64(4), 543-547.
- Bäckström, T., Andreen, L., Birzniece, V., Björn, I., Johansson, I.M., Nordenstam-Haghjo, M., Nyberg, S., Sundström-Poromaa, I., Wahlström, G., Wang, M. y Zhu D. (2003). The role of hormones and hormonal treatments in premenstrual syndrome. *CNS Drugs*, 17, 325-342.
- Baldini, S., Restani, L., Baroncelli, L., Coltelli, M., Franco, R., Cenni, M.C. y Maffei, L., Berardi, N. (2013). Enriched early life experiences reduce adult anxiety-like

- behavior in rats: a role for insulin-like growth factor 1. *Journal of Neuroscience*, 33(28), 11715-11723.
- Barbaccia, M.L., Roscetti, G., Trabucchi, M., Mostallino, M.C., Concas, A., Purdy, R.H. y Biggio, G. (1996). Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABAA receptor function after acute stress. *Neuroendocrinology*, 63(2), 166-172.
- Barbaccia, M.L., Serra, M., Purdy, R.H. y Biggio, G. (2001). Stress and neuroactive steroids. *International Review of Neurobiology*, 46, 243-72.
- Barnum, C.J., Blandino, P.Jr., y Deak, T. (2007). Adaptation in the corticosterone and hyperthermic responses to stress following repeated stressor exposure. *Journal of Neuroendocrinology*, 19(8), 632-642.
- Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., Yaniv, I. y Pick, C.G. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *European Journal of Neuroscience*, 20, 1341-1347.
- Bernardi, F., Pluchino, N., Begliuomini, S., Lenzi, E., Palumbo, M., Luisi, M. y Genazzani, A.R. (2004). Disadaptive disorders in women: allopregnanolone, a sensitive steroid. *Gynecological Endocrinology*, 19, 344-353.
- Bianchi-Demicheli, F., Lüdicke, F., Lucas, H. y Chardonnens, D. (2002). Premenstrual dysphoric disorder: current status of treatment. *Swiss Medical Weekly*, 132, 574-578.
- Biggio, G., Concas, A., Corda, M.G., Giorgi, O., Sanna, E. y Serra, M. (1990) GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 48(2), 121-142.

- Blake, F., Salkovskis, P., Gath, D., Day, A. y Garrod, A. (1998). Cognitive therapy for premenstrual syndrome: a controlled trial. *Journal of Psychosomatic Research*, 45, 307-318.
- Boinski, S., Swing, S.P., Gross, T.S. y Davis, J.K. (1999). Environmental enrichment of Brown Capuchins (*Cebus apella*): behavioral and plasma and fecal cortisol measures of effectiveness. *American Journal of Primatology*, 48, 49–68.
- Bowen, M.T., Dass, S.A., Booth, J., Suraev, A., Vyas, A. y McGregor, I.S. (2014). Active coping toward predatory stress is associated with lower corticosterone and progesterone plasma levels and decreased methylation in the medial amygdala vasopressin system. *Hormones and Behavior*, 66(3), 561-566.
- Brenes-Sáenz, J.C., Villagra, O.R. y Fornaguera, J. (2006). Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behavioral Brain Research*, 169 (1), 57-65.
- Breech, L. y Braverman, P. (2009). Safety, efficacy, actions, and patient acceptability of drospirenone/ethinyl estradiol contraceptive pills in the treatment of premenstrual dysphoric disorder. *International Journal of Women's Health*, 1, 85–95.
- Brunton, P.J., McKay, A.J., Ochedalski, T., Piastowska, A., Rebas, E., Lachowicz, A. y Russell, J.A. (2009). Central opioid inhibition of neuroendocrine stress responses in pregnancy in the rat is induced by the neurosteroid allopregnanolone. *Journal of Neuroscience*, 29(20), 6449-6460.
- Calvo, N., Cecchi, M., Kabbaj, M., Watson, S.J. y Akil, H. (2011). Differential effects of social defeat in rats with high and low locomotor response to novelty. *Neuroscience*, 183, 81-89.
- Campos, A.C., Fogaça, M.V., Aguiar, D.C. y Guimarães, F.S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35, 101-111.

- Casarrubea, M., Roy, V., Sorbera, F., Magnusson, M.S., Santangelo, A., Arabo, A. y Crescimanno, G. (2013). Significant divergences between the temporal structure of the behavior in Wistar and in the spontaneously more anxious DA/Han strain of rats tested in elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 250, 166-173.
- Castrén, E., Vöikar, V. y Rantamäki, T. (2007). Role of neurotrophic factors in depression. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), 18-21.
- Chen, Y., Bender, R. A., Brunson, K. L., Pomper, J. K., Grigoriadis, D. E., Wurst, W. y Baram T. Z. (2004). Modulation of dendritic differentiation by corticotropin-releasing factor in the developing hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15782–15787.
- Chen, Y., Brunson, K. L., Adelman, G., Bender R. A., Frotscher M. y Baram T. Z. (2004). Hippocampal corticotropin releasing hormone: pre- and postsynaptic location and release by stress. *Neuroscience*, 126, 533–540.
- Chen, Y., Andres, A.L., Frotscher, M. y Baram, T. Z. (2012). Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 3, 6-13.
- Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M.C., Wakabayashi, C. y Kunugi, H. (2012). Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 39(1), 112-119.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.

- Chrousos, G.P. (2007). Organization and integration of the endocrine system. *Sleep Medicine Clinics*, 2(2), 125-145.
- Cilia-García, M. (2006). *Estudio c omparativo de l a de sesperanza c onductual y l a respuesta a fármacos antidepresivos a l o largo del ciclo estral de ratas Wistar y Wistar Kyoto*. (Tesis Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Concas, A., Mostallino, M.C., Porcu, P., Follesa, P., Barbaccia, M.L., Trabucchi, M., Purdy, R.H., Grisenti, P. y Biggio, G. (1998). Role of brain allopregnanolone in the plasticity of γ -aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. *Proceedings of t he National A cademy of S ciences of t he U nited States of America*, 95, 13284–13289.
- Contreras, C.M., Azamar-Arizmendi, G., Saavedra, M. y Hernández-Lozano, M. (2006). A five-day reduction regimen of chlormadinone reduces premenstrual anxiety and depression: a pilot study. *Archives of Medical Research*, 37, 907-913.
- Cullinan, W.E., Herman, J.P. y Watson SJ. (1993). Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: Evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *Journal of Comparative Neurology*, 332, 1–20.
- Cunningham, J., Yonkers, K., O'Brien, S. y Eriksson, E. (2009). Update on Research and Treatment of Premenstrual Dysphoric Disorder. *Harvard Review of Psychiatry*, 17(2), 120–137.
- Curley, J., Davidson, D., Bateson, P. y Champagne, F. (2009). Social enrichment during postnatal development induces transgenerational effects on emotional and reproductive behavior in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3:25.

- D'Andrea, I., Gracci, F., Alleva, E. y Branchi, I. (2010). Early social enrichment provided by communal nest increases resilience to depression-like behavior more in female than in male mice. *Behavioural Brain Research*, 215, 71-76.
- da Costa, A.P., Ma, X., Ingram, C.D., Lightman, S.L. y Aguilera, G. (2001). Hypothalamic and amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH receptor-1 mRNA expression in the stress-hyporesponsive late pregnant and early lactating rat. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 91(1-2), 119-130.
- De Boer, S.F. y Koolhaas, J.M. (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology*, 28, 145-161.
- de Kloet, E., Joëls, M. y Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 463-475.
- de Kloet, E.R., Karst, H. y Joëls M. (2008). Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(2), 268-272.
- de Kloet, E., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. y Joëls M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*, 19, 269-301.
- De la Garza, R. y Mahoney, J.J. (2004). A distinct neurochemical profile in WKY rats at baseline and in response to acute stress, implications for animal models of anxiety and depression. *Brain Research*, 1021, 209-218.
- Dent, G.W., Okimoto, D.K., Smith, M.A. y Levine, S. (2000). Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology*, 71, 333-342.
- Dhanushkodi, A. y Shett, A. (2008). Is Exposure To Enriched Environment Beneficial For Functional Post-Lesional Recovery In Temporal Lobe Epilepsy?. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(4): 657-674.

- Djordjevic, J., Vuckovic, T., Jasnic, N. y Cvijic, G. (2007). Effect of various stressors on the blood ACTH and corticosterone concentration in normotensive Wistar and spontaneously hypertensive Wistar-Kyoto rats. *General and Comparative Endocrinology*, 153(1-3),217-220.
- Du, X., Leang, L., Mustafa, T., Renoir, T., Pang, T.Y. y Hannan, A.J. (2012). Environmental enrichment rescues female-specific hyperactivity of the hypothalamic pituitary-adrenal axis in a model of Huntington's disease. *Translational Psychiatry*, 2, e133, doi: 10.1038/tp.2012.58.
- Engel, S.R. y Grant, K.A.(2001). Neurosteroids and behavior. *International Review of Neurobiology*, 46, 321-348.
- Feldman, S. y Weidenfeld, J. (1999). Glucocorticoid receptor antagonists in the hippocampus modify the negative feedback following neural stimuli. *Brain Research*, 821(1), 33–37.
- Ford, O., Lethaby, A., Mol, B. y Roberts, H. (2006). Progesterone for premenstrual syndrome. *Cochrane Database of Systematic Review*, 4, doi: 10.1002/14651858.CD003415.pub2.
- Fox, C., Merali, Z. y Harrison, C. (2006). Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behavioural Brain Research*, 175, 1- 8.
- Francis, D.D., Diorio, J., Plotsky, P.M. y Meaney MJ. (2002). Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *Journal of Neuroscience*, 22(18), 7840-7843.
- Furay, A.R., Bruestle, A.E. y Herman, J.P. (2008). The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress. *Endocrinology*, 149(11), 5482-5490.

- Gadek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P. y Bugajski, J. (2013). Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacological Reports*, 65(6), 1655-1662.
- Gallo, M.A. y Smith, S.S. (1993). Progesterone withdrawal decreases latency to and increases duration of electrified prod burial: a possible rat model of PMS anxiety. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 46, 897-904.
- Granhölm, E., McQuaid, J.R., Link, P.C., Fish, S., Patterson, T. y Jeste, D.V. (2008). Neuropsychological predictors of functional outcome in Cognitive Behavioral Social Skills Training for older people with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 100(1-3), 133-143.
- Girdler, S. y Klatzkin, R. (2007). Neurosteroids in the context of stress: implications for depressive disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(1), 125-139.
- Gómez, F., Lahmame, A., de Kloet, E.R. y Armario, A. (1996). Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology*, 63(4), 327-337.
- Gulinello, M., Gong, Q.H., Li, X. y Smith, S.S. (2001). Short-term exposure to neuroactive steroid increases $\alpha 4$ GABA-A receptor subunit levels in association with increased anxiety in female rat. *Brain Research*, 910 (1-2), 55-66.
- Gunnar, M. y Quevedo, K. (2007). The Neurobiology of Stress and Development. *Annual Review of Psychology*, 58, 145-173.
- Gutiérrez-Mariscal, M., de Gortari, P., López-Rubalcava, C., Martínez, A. y Joseph-Bravo, P. (2008). Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology*, 33(2), 198-213.

- Gutiérrez-Ortíz J. (2009). *Establecimiento de un modelo de estrés crónico en roedor: variaciones conductuales y endocrinas*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Halbreich, U. (2008). Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Initial Oral Contraceptives for the Treatment of PMDD: Effective But Not Enough. *CNS Spectrums*, 13(7), 566-572.
- Halbreich, U., Rojansky, N. y Palter, S. (1991). Elimination of ovulation and menstrual cyclicity (with danazol) improves dysphoric premenstrual syndromes. *Fertility and Sterility*, 56(6), 1066-1069.
- Hamdan, A. (2009). Mental health needs of Arab women. *Health Care for Women International*, 30(7), 595-613.
- Hauger, L., Risbrough, V., Brauns, O. y Dautzenberg, F. (2006). Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor Signaling in the Central Nervous System: New Molecular Targets. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 5(4): 453-479.
- Herman, J.P., Dolgas, C.M. y Carlson, S.L. (1998). Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience*, 86, 449-459.
- Herman, J.P., Adams, D., y Prewitt, C. (1995). Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology*, 61, 180-190.
- Herman, J.P. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24, 151-80.

- Herman, J.P., McKlveen, J.M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J. y Myers, B. (2016). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603-621.
- Hernández, M.E., Martínez-Mota, L., Salinas, C., Marquez-Velasco, R., Hernandez-Chan, N.G., Morales-Montor, J., Pérez-Tapia, M., Streber, M.L., Granados-Camacho, I., Becerril, E., Javier, B.H. y Pavón, L. (2013). Chronic stress induces structural alterations in splenic lymphoid tissue that are associated with changes in corticosterone levels in wistar-kyoto rats. *Biomed Research International*, 2013, 868742.
- Hevers, W. y Lüddens, H. (1998). The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Molecular Neurobiology*, 18(1), 35-86.
- Hill, M.N., Hellemans, K.G., Verma, P., Gorzalka, B.B. y Weinberg, J. (2012). Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(9), 2085-2117.
- Hosie, A., Wilkins, M. y Smart, T. (2007). Neurosteroid binding sites on GABA-A receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 116 (1), 7-19.
- Hsu, F.C. y Smith, S.S. (2003). Progesterone withdrawal reduces paired-pulse inhibition in rat hippocampus: dependence on GABA(A) receptor alpha4 subunit upregulation. *Journal of Neurophysiology*, 89 (1), 186-198.
- Huang, G.B., Zhao, T., Muna, S.S., Bagalkot, T.R., Jin, H.M., Chae, H.J. y Chung, Y.C. (2013). Effects of chronic social defeat stress on behaviour, endoplasmic reticulum proteins and choline acetyltransferase in adolescent mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(7), 1635-1647.
- Hunter, M.S., Ussher, J.M. Browne, S.J, Cariss, M., Jelley, R. y Katz, M. (2002). A

- randomized comparison of psychological (cognitive behavior therapy), medical (fluoxetine) and combined treatment for women with premenstrual dysphoric disorder. *Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology*, 23,193-199.
- Indusekhar, R., Usman, S.B. y O'Brien, S. (2007). Psychological aspects of premenstrual syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics Gynaecology*, 21(2), 207-220.
- Islas-Preciado, D., López-Rubalcava, C., González-Olvera, J., Gallardo-Tenorio, A. y Estrada-Camarena, E. (2016). Environmental enrichment prevents anxiety-like behavior induced by progesterone withdrawal in two strains of rats. *Neuroscience*, 336, 123-132.
- Ito, L.M., Roso, M.C., Tiwari, S., Kendall, P.C. y Asbahr, F.R. (2008). Cognitive-behavioral therapy in social phobia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 30(2), 96-101.
- Jankord, R. y Herman, J.P. (2008). Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148, 64-73.
- Jarcho, M.R., Massner, K.J, Eggert, A.R. y Wichelt, E.L. (2016). Behavioral and physiological response to onset and termination of social instability in female mice. *Hormones and Behavior*, 78,135-140.
- Kalueff, A.V. y Tuohimaa, P. (2004). Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiologiae Experimentalis (Wars)*, 64(4), 439-448.
- Kalueff, A.V. y Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of Neuroscience Methods*, 143, 169-177.

- Katz, R. (1982). Animal model of depression: Pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 16, 965-968.
- Kim, J.J. y Diamond, D.M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 453–462.
- Kim, S.J., Lee, H., Joung, H.Y., Lee, G., Lee, H.J., Shin, M.K., Kim, S.H., Shim, I. y Bae, H. (2011). T-bet deficient mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *Journal of Neuroimmunology*, 240-241, 45-51.
- Kirby, L.G., Chou-Green, J.M., Davis, K. y Lucki, I. (1997). The effects of different stressors on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Research*, 760(1-2), 218-230.
- Klein, S.L., Lambert, K.G., Durr, D., Schaefer, T. y Waring, R.E. (1994). Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. *Physiology & Behavior*, 56, 291–297.
- Korbey, S.M., Heinrichs, S.C. y Leussis, M.P. (2008). Seizure susceptibility and locus ceruleus activation are reduced following environmental enrichment in an animal model of epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, 12(1), 30-38.
- Kornstein, S.G., Harvey, A.T., Rush, A.J., Wisniewski, S.R., Trivedi, M.H., Svikis, D.S., McKenzie, N.D., Bryan, C. y Harley R. (2005). Self-reported premenstrual exacerbation of depressive symptoms in patients seeking treatment for major depression. *Psychological Medicine*, 35, 683-692.
- Langen, B. y Dost, R. (2011). Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animal models: effect of dopamine D1 and alpha2 agonists. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, 3(1), 1-12.

- Larsson, F., Winblad, B. y Mohammed AH. (2002). Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73,193–207.
- Leal-Galicia, P., Castañeda-Bueno, M., Quiroz-Baez, R. y Arias, C. (2008). Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(3), 511-518.
- Lehmann, M.L. y Herkenham, M. (2011). Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *Journal of Neuroscience*, 31, 6159-6173.
- Lei, Y., Yaroslavsky, I. y Tejani-Butt, S.M. (2009). Strain differences in the distribution of N-methyl-d-aspartate and gamma (gamma)-aminobutyric acid-A receptors in rat brain. *Life Sciences*, 85(23-26), 794-799.
- Li, Y., Pehrson, A.L., Budac, D.P., Sánchez, C. y Gulinello M. (2012). A rodent model of premenstrual dysphoria: progesterone withdrawal induces depression-like behavior that is differentially sensitive to classes of antidepressants. *Behavioural Brain Research*, 234(2): 238-247.
- Löfgren, M., Johansson, I.M., Meyerson, B., Turkmen, S. y Bäckström T. (2009). Withdrawal effects from progesterone and estradiol relate to individual risk-taking and explorative behavior in female rats. *Physiology and Behavior*, 96(1): 91-97.
- Ma, X. y Lightman, S.L. (1998). The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *Journal of Physiology*, 510 (2) 605–614.

- Ma, X., Lightman, S.L. y Aguilera, G. (1999). Vasopressin and corticotropin-releasing hormone gene responses to novel stress in rats adapted to repeated restraint. *Endocrinology*, *140*(8): 3623-3632.
- Maghsoudi, N., Ghasemi, R., Ghaempanah, Z., Ardekani, A.M., Nooshinfar, E. y Tahzibi, A. (2014). Effect of Chronic Restraint Stress on HPA Axis Activity and Expression of BDNF and Trkb in the Hippocampus of Pregnant Rats: Possible Contribution in Depression during Pregnancy and Postpartum Period. *Basic and Clinical Neuroscience*, *5*(2), 131-137.
- Makino, S., Kaneda, T., Nishiyama, M., Asaba, K. y Hashimoto K. (2001). Lack of decrease in hypothalamic and hippocampal glucocorticoid receptor mRNA during starvation. *Neuroendocrinology*, *74*(2), 120-128.
- Maras, P. y Baram T. (2012). Sculpting the Hippocampus from within: Stress, Spines, and CRH. *Trends in Neuroscience*, *35*, 315–324.
- McCann, S., Kimura, M., Karanth, S., Yu, W.H., Mastronardi, C. y Rettori, V. (2000). The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. *Annals of the New York Academy of Science*, *917*, 4-18.
- McDougall, S.J., Paull, J.R., Widdop, R.E. y Lawrence, A.J. (2000). Restraint stress: differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, *35*(1 Pt 1), 126-129.
- McQuaid, R.J., Audet, M.C., Jacobson-Pick, S. y Anisman, H. (2013). The differential impact of social defeat on mice living in isolation or groups in an enriched environment: plasma corticosterone and monoamine variations. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(2), 351-363.

- Meaney, M. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24,161-192.
- Meaney, M. y Szyf, M. (2005). Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 7, 103–123.
- Medina-Mora, M.E., Borges, G., Lara, M.C., Benjet, C., Blanco, J.J., Fleiz, B.C., Villatoro, V.J., Rojas, G.E., Zambrano, R.J., Casanova, R.L. y Aguilar-Gaxiola, S. (2003). Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental*, 26(4), 1-16.
- Mehta, N.S., Wang, L. y Redei, E.E. (2013). Sex differences in depressive, anxious behaviors and hippocampal transcript levels in a genetic rat model. *Genes, Brain and Behavior*, 12(7), 695-704.
- Miklowitz, D.J., Goodwin, G.M., Bauer, M.S. y Geddes, J.R. (2008). Common and specific elements of psychosocial treatments for bipolar disorder: a survey of clinicians participating in randomized trials. *Journal of Psychiatric Practice*, 14(2), 77-85.
- Monteleone, P., Luisi, S., Tonetti, A., Bernardi, F., Genazzani, A.D., Luisi, M., Petraglia, F. y Genazzani, A.R. (2000). Allopregnanolone concentrations and premenstrual syndrome. *European Journal of Endocrinology*, 142, 269-273.
- Morley-Fletcher, S., Rea, M., Maccari, S. y Laviola, G.(2003). Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *European Journal of Neuroscience*, 18(12), 3367-3374.

- Morse, G. (1999). Positively reframing perceptions of the menstrual cycle among women with premenstrual syndrome. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 28, 165-174.
- Muir, J.L. y Pfister, H.P. (1987). Time course of the corticosterone and prolactin response following predictable and unpredictable novelty stress in *Rattus norvegicus*. *Physiology and Behavior*, 140(1), 103-107.
- Murphy, J.M., Laird, N.M., Monson, R.R., Sobol, A.M. y Leighton, A.H. (2000). A 40-year perspective on the prevalence of depression: the Stirling County Study. *Archives of General Psychiatry*, 57(3), 209-215.
- Natelson, B.H., Ottenweller, J.E., Cook, J.A., Pitman, D., McCarty, R. y Tapp, W.N. (1988). Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiology and Behavior*, 43(1), 41-56.
- Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O. y Eriksson, P.S. (1999). Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *Journal of Neurobiology*, 39, 569-578.
- Nithianantharajah, J. y Hannan, A.J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697-709.
- Novak, M.A., Hamel, A.F., Kelly, B.J., Dettmer, A.M. y Meyer, J.S. (2013). Stress, the HPA axis, and nonhuman primate well-being: A review. *Applied Animal Behaviour Science*, 143(2-4), 135-149.
- Nunez, C., Földes, A., Laorden, M.L., Milanes, M.V. y Kovács, K.J. (2007). Activation of stress-related hypothalamic neuropeptide gene expression during morphine withdrawal. *Journal of Neurochemistry*, 101(4), 1060-1071.

- Olsson, T., Mohammed, A.H., Donaldson, L.F., Henriksson, B.G. y Seckl, J.R. (1994). Glucocorticoid receptor and NGFI—a gene expression are induced in the hippocampus after environmental enrichment in adult rats. *Molecular Brain Research*, 23, 349–353.
- Paré, W.P. (2000). Investigatory behavior of a novel conspecific by Wistar Kyoto, Wistar and Sprague-Dawley rats. *Brain Res Bulletin*, 53, 759-765.
- Paré, W. y Redei, E. (1993). Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiology and Behavior*, 54, 1179-1185.
- Paré, W. (1993). Passive-avoidance behavior in Wistar–Kyoto (WKY), Wistar, and Fischer-344 rats. *Physiology and Behavior*, 54, 845–852.
- Patchev, V. y Almedia, O. (1996). Gonadal steroids exert facilitating and “buffering” effects on glucocorticoid-mediated transcriptional regulation of corticotropin-releasing hormone and corticosteroid receptor genes in rat brain. *Journal of Neuroscience*, 16, 7077–7084.
- Patchev, V.K., Hassan, A.H., Holsboer, D.F. y Almeida, O.F. (1996). The neurosteroid tetrahydroprogesterone attenuates the endocrine response to stress and exerts glucocorticoid-like effects on vasopressin gene transcription in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacology*, 15, 533-540.
- Paskitti, M.E., McCreary, B.J. y Herman, J.P. (2000). Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis. *Molecular Brain Research*, 80, 142–152.
- Pearlstein, T.B., Bachmann, G.A., Zacur, H.A. y Yonkers, K.A. (2005). Treatment of premenstrual dysphoric disorder with a new drospirenone-containing oral contraceptive formulation. *Contraception*, 72, 414-421.

- Pearlstein, T. y Steiner, M. (2008). Premenstrual dysphoric disorder: burden of illness and treatment update. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 33(4), 291–301.
- Pinel, J.P.J. y Treit, D. (1978). Burying as a defensive response in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92,708-712.
- Rapkin, A.J. (2005). New treatment approaches for premenstrual disorders. *American Journal of Managed Care*, 11, 480-491.
- Rex, A., Voigt, J.P., Gustedt, C., Beckett, S. y Fink, H. (2004) Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague-Dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology*, 177(1-2), 23-34.
- Rittenhouse, P.A., López-Rubalcava, C., Stanwood, G.D. y Lucki, I. (2002). Amplified behavioral and endocrine responses to forced swim stress in the Wistar-Kyoto rat. *Psychoneuroendocrinology*, 27(3): 303-318.
- Robbins, M., DeBerry, J. y Ness, T. (2007). Chronic psychological stress enhances nociceptive processing in the urinary bladder in high-anxiety rats. *Physiology and Behavior*, 91(5), 544-550.
- Roman, O., Seres, J., Pometlova, M. y Jurcovicova, J. (2004). Neuroendocrine or behavioral effects of acute or chronic emotional stress in Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats. *Endocrine Regulations*, 38(4), 151-155.
- Rosenfeld, A. y Weller, A. (2012). Behavioral effects of environmental enrichment during gestation in WKY and Wistar rats. *Behavioral Brain Research*, 233(2), 245-255.
- Rosenzweig, M.R. y Bennett, E.L. (1972). Cerebral changes in rats exposed individually to an enriched environment. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 80 304 -313.

- Roth, M.K., Bingham, B., Shah, A., Joshi, A., Frazer, A., Strong, R. y Morilak, D.A. (2012). Effects of chronic plus acute prolonged stress on measures of coping style, anxiety, and evoked HPA-axis reactivity. *Neuropharmacology*, 63,1118-1126.
- Saavedra, M., Contreras, C.M., Azamar-Arizmendi, G. y Hernández-Lozano, M. (2006). Differential progesterone effects on defensive burying and forced swimming tests depending upon a gradual decrease or an abrupt suppression schedules. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 83(1), 130-135.
- Sarkar, J., Wakefield, S., MacKenzie, G., Moss, S.J. y Maguire, J. (2011). Neurosteroidogenesis is required for the physiological response to stress: role of neurosteroid-sensitive GABAA receptors. *Journal of Neuroscience*, 31(50), 18198-18210.
- Scheuer, D.A. (2010). Regulation of the stress response in rats by central actions of glucocorticoids. *Experimental Physiology*, 95(1), 26-31.
- Schneider, T. y Popik, P. (2007). Increased depressive-like traits in an animal model of premenstrual irritability. *Hormones and Behavior*, 51(1), 142-148.
- Schrijver, N.C., Bahr, N.I., Weiss, I.C. y Wurbel, H. (2002). Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73, 209–224.
- Segovia, G., del Arco, A. y Mora F. (2009). Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 116(8), 1007-1016.
- Shah, N.R., Jones, J.B., Aperi, J., Shemtov, R., Kame, A. y Borenstein, J. (2008). Selective serotonin reuptake inhibitors for premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder: a meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology*, 111, 1175-182.

- Shepard, J.D. y Myers, D.A. (2008). Strain differences in anxiety-like behavior: association with corticotropin-releasing factor. *Behavioral Brain Research*, 186(2), 239-245.
- Shoji, H. y Mizoguchi, K. (2010). Acute and repeated stress differentially regulates behavioral, endocrine, neural parameters relevant to emotional and stress response in young and aged rats. *Behavioral Brain Research*, 211(2), 169-177.
- Shukla, P.K., Sittig, L.J., Andrus, B.M., Schaffer, D.J, Batra, K.K. y Redei, E.E. (2010). Prenatal thyroxine treatment disparately affects peripheral and amygdala thyroid hormone levels. *Psychoneuroendocrinology*, 35(6), 791-797.
- Silva, S.M., Paula-Barbosa, M.M. y Madeira, M.D. (2002). Prolonged alcohol intake leads to reversible depression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin immunoreactivity and mRNA levels in the parvocellular neurons of the paraventricular nucleus. *Brain Research*, 954(1), 82-93.
- Singh, J.S. y Hope, D.A. (2009). Cognitive-behavioral approaches to the treatment of social anxiety disorder. *Israel Journal of Psychiatry and Related Science*, 46(1):62-9.
- Smith, S.S., Gong, Q.H, Hsu, F.C., Markowitz, R.S., French-Mullen, J. y Li, X. (1998). GABA-A receptor $\alpha 4$ subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature*, 392, 926-930.
- Smith, S.S., Shen, H, Gong, Q.H. y Zhou, X. (2007). Neurosteroid regulation of GABA-A receptors: Focus on the $\alpha 4$ and δ subunits. *Pharmacology and Therapeutics*, 116(1), 58-76.
- Steiner, M. y Soares, C.N. (2008). The Premenstrual syndromes: PMS and PMDD. *Informa Healthcare*, 55, 131-9.
- Ströhle, A., Pasini, A., Romeo, E., Hermann, B., Spalletta, G., di Michel, F., Holsboer, F. y Rupprecht, R. (2000). Fluoxetine decreases concentrations of 3α , 5α -

- tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) in major depression. *Journal of Psychiatric Research*, 34, 183-186.
- Taylor, S.E, Klein, L.C., Lewis, B.P., Gruenewald, T.L., Gurung, R.A. y Updegraff, J.A. (2000). Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychological Review*, 107(3), 411-429.
- Tejani-Butt, S.M., Paré, W.P. y Yang, J. (1994). Effect of repeated novel stressors on depressive behavior and brain norepinephrine receptor system in Sprague-Dawley and Wistar Kyoto (WKY) rats. *Brain Research*, 649(1-2), 27-35.
- Tõnissaar, M., Mällo, T., Eller, M., Häidkind, R., Kõiv, K. y Harro, J.(2008). Rat behavior after chronic variable stress and partial lesioning of 5-HT-ergic neurotransmission: effects of citalopram. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32(1),164-177.
- Turner, A.M. y Greenough, W.T. (1985). Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Research*, 329, 195–203.
- Van de Weerd, H.A., Aarsen, E.L., Mulder, A., Kruitwagen, C.L., Hendriksen, C.F. y Baumans, V. (2002). Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 5, 87–109.
- Vega-Rivera, N.M., Fernández-Guasti, A., Ramírez-Rodríguez, G. y Estrada-Camarena, E. (2013). Acute stress further decreases the effect of ovariectomy on immobility behavior and hippocampal cell survival in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 38(8), 1407-1417.
- Vega-Rivera, N.M., Fernández-Guasti, A., Ramírez-Rodríguez, G. y Estrada-Camarena, E. (2014). Forced swim and chronic variable stress reduced hippocampal cell survival in OVX female rats. *Behavioral Brain Research*, 270,248-255.

- Ventura-Silva, A.P., Pêgo, J.M., Sousa, J.C., Marques, A.R., Rodrigues, A.J., Marques, F., Cerqueira, J.J., Almeida, O.F. y Sousa N. Stress shifts the response of the bed nucleus of the stria terminalis to an anxiogenic mode. *European Journal of Neuroscience*, 36(10), 3396-3406.
- Vittengl, J.R., Clark, L.A. y Jarrett, R. (2009). Deterioration in Psychosocial Functioning Predicts Relapse/Recurrence After Cognitive Therapy for Depression. *Journal of Affective Disorders*, 112(1-3), 135–143.
- Volpi, S., Rabadan-Diehl, C. y Aguilera G. (2004). Vasopressinergic regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis and stress adaptation. *Stress*, 7(2),75-83.
- Wang, A., Nie, W., Li, H., Hou, Y., Yu, Z., Fan, Q. y Sun, R. (2014). Epigenetic upregulation of corticotrophin-releasing hormone mediates postnatal maternal separation-induced memory deficiency. *PLoS One*, 9(4), e94394.
- Welberg, L., Thiruvikraman, K.V. y Plotsky, P.M. (2006). Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 31(5):553-564.
- Will, C.C., Aird, F. y Redei, E.E. (2003). Selectively bred Wistar-Kyoto rats: an animal model of depression and hyper-responsiveness to antidepressants. *Molecular Psychiatry*, 8(11), 925-932.
- Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134, 319-329.
- Wisłowska-Stanek, A., Lehner, M., Skórzewska, A., Krząścik, P. y Płaźnik A. (2016). Behavioral effects and CRF expression in brain structures of high- and low-anxiety rats after chronic restraint stress. *Behavioral Brain Research*, 310, 26-35.

- Wyatt, K., Dimmock, P., Jones, P., Obhrai, M. y O'Brien, S. (2001). Efficacy of progesterone and progestogens in management of premenstrual syndrome: systematic review. *British Medical Journal*, 323, 776-780.
- Yonkers, K.A., Brown, C., Pearlstein, T.B., Foegh, M., Sampson-Landers, C. y Rapkin, A. (2005). Efficacy of a new low dose oral contraceptive with drospirenone in premenstrual dysphoric disorder. *Obstetrics & Gynecology*, 106, 492-501.
- Yonkers, K.A., O'Brien, S. y Eriksson, E. (2008). Premenstrual Syndrome. *Lancet*, 371(9619), 1200–1210.
- Zanca, R.M., Braren, S.H., Maloney, B., Schrott, L.M., Luine, V.N. y Serrano, P.A. (2015). Environmental Enrichment Increases Glucocorticoid Receptors and Decreases GluA2 and Protein Kinase M Zeta (PKM ζ) Trafficking During Chronic Stress: A Protective Mechanism?. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, doi:10.3389/fnbeh.2015.00303.