



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA**



***EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS INDUCIDOS POR DIFERENTES  
TIEMPOS DE EXPOSICIÓN AL ESTRÉS***

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

**VALENCIA FLORES KENJI BARUCH**

DIRECTOR: DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO

REVISOR: DR. ÓSCAR ZAMORA ARÉVALO

SINODAL: DR. ARTURO BOUZAS RIAÑO

SINODAL: DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ

SINODAL: LIC. KATIA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

**APOYADO POR:  
DGAPA-PAPIIT 305715**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018**

---

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**¡LO LOGRÉ TITA!**

## Agradecimientos

Muchas personas me han acompañado a lo largo de mi vida y se han esforzado por ayudarme a cumplir mi sueño de ser investigador. Este es un primer paso que se requiere para alcanzar esa meta y les prometo que no será el último.

- Primero que nada, quiero agradecer a mi madre América por TODO. Por estar conmigo desde que nací, por cuidarme y trabajar arduamente para traer comida a la mesa, por educarme y exigirme cuando era necesario, por amarme incondicionalmente y por ver algo especial en mí y por darme un nombre del que nadie se olvida. Porque sin ella yo no estaría aquí buscando cumplir mis sueños. Mamá eres mi orgullo y mi modelo a seguir.
- Quiero agradecer a mi padre Victor porque su cuidado y fe en mí me da fuerza para seguir adelante. Porque su cariño y amor por sus hijos es infinito. Porque con sus palabras me siento el hombre más inteligente del mundo. Y por decirme las mejores palabras en situaciones difíciles “cuando todo esté en tu contra y nadie crea en ti, voltea a tu lado derecho y yo siempre estaré ahí” (Valencia-García, 2013). Gracias papá, eres sensacional.
- A mi otro padre Martín porque eres uno de mis mejores amigos y porque buscas enseñarme cosas más allá de lo escolar, porque te preocupa que sepa cambiar un foco, pintar, cocinar, lijar, martillar, etc. Porque sé que en ti encuentro amor y apoyo. Porque me dejabas aventarme a tus brazos cuando llegabas, por dejarme babearte la cara cuando niño. Porque conocías que me gustaba jugar y comer. Porque me dejaste llamarte y presentarte ante otras personas como el enano, como lo barrio, como mi otro papá.
- A mi tita (Berta Flores Narciso), que lo que más me duele es que yo quería leerte este párrafo en persona y no me dio tiempo. Lo único que me pedías era que terminara mi carrera y fuera feliz. Ahora lo estoy cumpliendo y agradezco TODO, TODO lo que hiciste por mí. No sabes cuánto te extraño y cuánto te quiero.
- A mi hermano Yosemite por haber crecido conmigo y por ser un buen hermano mayor. Por haberme guiado cuando no sabía a donde ir, por haber compartido conmigo todo su conocimiento. Por su cariño y apoyo incondicional y porque aún después de que se me fuera el tren, gritó como loco por ayuda. Hermano muchas gracias.
- A mi hermana Naomi que aún siendo la más chiquita me ha demostrado que con constancia y trabajo se pueden lograr muchas cosas. Gracias por dejarme enseñarte un poquito de lo que sé y por quererme con todo tu hipotálamo. Hermana siempre que pueda

te ayudaré y protegeré porque sé que tienes el potencial de grandes cosas. Gracias por todos los bloopers que has hecho y por ser una excelente hermana menor. Te quiero mucho.

- A Marlene por compartir cuatro años con este chico soñador. Por los besos y las caricias en situaciones difíciles, por buscar entenderme aún cuando ni yo lo puedo hacer. Porque me animas a seguir adelante y conseguir mis metas. Porque contigo he vivido experiencias que nunca imaginé experimentar. Porque en ti encontré a una de las personas más hermosas de esta vida. Las palabras no me alcanzan para decirte lo mucho que te amo. Gracias por ser como eres bbccia.
- Además, quiero agradecer a dos de mis más grandes mentores el Dr. Hugo y la Dra. Olga. Porque me muestran día con día como ser un científico de calidad, porque desde el inicio vieron en mi potencial de investigador y porque sin su orientación y amor por las neurociencias quizá me estaría titulando en otra área.
- Me gustaría agradecer a mis amigos de la carrera (Will, Lalo, Dru, Tani, Mada, Miranda, Karime, Ricardo Lozada), de la SDC (Misa, Gera, Jon, Alfred, Lidia, Arely, Chris, Emma, Dalia, Aline, Lu), del laboratorio (Martín, Ivette, Ulises, Bryan, Mariana Vargas, Paulina, Cecilia, Mariana Navarrete, Mariana Vergel y Diana), de la vida (Omar, Eddie, Damian, Luisillo, Diana Moreno, Roy y Floripundia) que de alguna manera me han apoyado y han compartido conmigo tantas historias que necesitaría otra tesis para contarlas jaja.
- Quiero hacer mención especial a Ulises por ayudarme a realizar este trabajo de investigación y por permitirme compartir mis pocos conocimientos y experiencias con él.
- Por último, pero no menos importante quiero agradecer a mis dos perros Nani alias “Nani Alberta” y Becca alias “La baby chipocles” que han llegado a mi vida en momentos difíciles y que hacen de ella algo mejor.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1 ANTECEDENTES.....	8
1.1 Historia y conceptualización del estrés.....	8
1.1.2 Estrés, algunos conceptos asociados .....	10
1.2 La activación del eje simpato-adreno-medular y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal y su respuesta al estrés.....	11
1.2.1 Glucocorticoides.....	14
1.2.2 Receptores a mineralocorticoides y glucocorticoides.....	16
1.2.3 Regulación de la respuesta de estrés.....	17
1.3 Protocolos de estrés .....	19
1.3.1 Protocolos de estrés agudo.....	19
1.3.2 Protocolos de estrés crónico .....	20
1.3.3 Protocolo de estrés crónico medio (CMS).....	20
1.3.4 Efectos del estrés crónico.....	21
1.4 Tiempos de exposición a estrés.....	23
1.4.1 Estrés Agudo.....	23
1.4.2 Estrés Crónico.....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	26
JUSTIFICACIÓN.....	26
OBJETIVO .....	27
HIPÓTESIS.....	27
MÉTODO.....	27
RESULTADOS.....	38
DISCUSIÓN .....	49
CONCLUSIÓN .....	55
REFERENCIAS.....	55
ANEXO 1.....	65

## RESUMEN

El estrés se define como una respuesta sistémica desencadenada por una amenaza real o percibida que aumenta la probabilidad de supervivencia de un organismo, donde la efectividad de la respuesta se evalúa con las consecuencias de la misma. Esta respuesta tiene gran importancia evolutiva para los mamíferos ya que les ha permitido responder ante situaciones que perciben como amenazantes. Por otro lado, cuando la exposición a estrés es corta (minutos a horas) se denomina aguda y durante periodos más largos de exposición a estrés (días, semanas y años), se le denomina crónica. Estos tipos de exposición, tanto aguda como crónica tienen deficiencias con respecto a su definición, es decir, existe una gran cantidad de definiciones que varían en la cantidad de tiempo de exposición.

La presente investigación se centra en estrés crónico y pretende contribuir a su conceptualización, específicamente con respecto al tiempo de exposición, de manera que se pueda establecer una ventana temporal donde se tenga noción de los efectos inducidos por el tiempo de exposición a estrés. Se ocupó el paradigma de estrés crónico impredecible durante diferentes ventanas temporales de exposición (5, 10, 14 y 21 días), para construir una curva tiempo-efecto que nos permita identificar el momento en el que el estrés modifica significativamente la conducta y el momento donde los cambios conductuales llegan a el punto máximo deseado para la investigación con este modelo.

Los resultados de la presente investigación sugieren que existe una ventana temporal corta donde inician los efectos estresantes y tipo depresivos en el modelo y aunque no se sugiere una ventana final, si identificamos que las alteraciones cognitivas no se producen en las ventanas más largas de exposición, lo que sugiere que las ventanas más largas no necesariamente empeoran la condición de estrés. En este sentido, la ventana de 10 días de exposición a estrés, es la que muestra de manera más completa los efectos que busca este modelo. Esta información es importante para comenzar a estandarizar los paradigmas de estrés crónico con respecto a la temporalidad de exposición, de manera que no sobrepasemos esta línea temporal y el modelo esté induciendo otro tipo de cambios asociados a otras patologías. Además, aún quedan múltiples

cuestiones en este modelo, por lo que se propone explorar aún más estos paradigmas para añadir información que sea de utilidad para su posterior aplicación.

## **INTRODUCCIÓN**

El estrés se define como una respuesta sistémica desencadenada por una amenaza real o percibida que aumenta la probabilidad de supervivencia de un organismo, donde la efectividad de la respuesta se evalúa con las consecuencias de la misma. La respuesta de estrés regula la actividad del sistema por medio de la activación del eje simpato-adreno-medular (SAM) y del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) que desencadena una cascada de procesos que finalizan con la liberación de cortisol/corticosterona y de adrenalina, noradrenalina y vasopresina (Gotlip, et al., 2008; Smeets, 2010).

Dentro de la investigación en el tema de estrés, existen diferentes paradigmas para su estudio, uno de ellos es el que se denomina estrés crónico y se refiere a tiempos prolongados de exposición a estrés (días, meses a años) (Joëls & Baram, 2009). La metodología asociada a este paradigma tiene problemas relacionados con la definición en términos de la temporalidad de exposición y por tanto con la aplicación.

Aunque los efectos conductuales y cognitivos del estrés crónico han recibido mucho interés en los últimos años (Willner, 2017), la mayoría de la investigación varía debido a que no existe un consenso con respecto a ¿cuánto tiempo es suficiente y necesario para que este modelo funcione adecuadamente?, pocos investigadores evalúan los diferentes tiempos de exposición para clarificar la definición que toman de estrés crónico y por tanto modificar los paradigmas que actualmente aplican.

Por ello, la presente propuesta sugiere que la investigación de los tiempos de exposición a estrés puede servir como una herramienta que permita una mejor comprensión y evaluación de los efectos inducidos por estrés crónico en modelos animales, además busca proponer un cambio en la metodología de aplicación de estrés crónico impredecible incluyendo una ventana específica de aplicación.

## 1 ANTECEDENTES

### 1.1 HISTORIA Y CONCEPTUALIZACIÓN DEL ESTRÉS

El estrés es una respuesta que ha acompañado a la vida desde tiempos muy antiguos, sin embargo, a pesar de que propiamente surge como concepto en la década de los 50's del siglo pasado, ha sido difícil de definir (Willner, 2017). Esto debido a la amplia gama de aspectos que involucra esta respuesta (p.j. fisiológicos, psicológicos, etc.). Sin embargo, existen diferentes propuestas (fisiológicas, psicológicas, cognitivas y conductuales) para poder definir este concepto.

La historia de éste término inicia con Claude Bernard que en 1859 explicó cómo las células y tejidos de organismos pluricelulares, podían ser protegidas por lo que actualmente conocemos como estrés, esto es, que las células realizaban una serie de cambios en su medio interno para minimizar los cambios alrededor de un estado determinado biológicamente, promoviendo un estado estable (Fink, 2010). Cincuenta años después, Walter Cannon, sugirió el término homeostasis (del griego *homioios*, o similar, y *stasis*, o posición) y lo definió como la operación coordinada de procesos fisiológicos que mantienen la mayoría de los estados estables del organismo (Cannon, 1932; Fink, 2010). Propiamente ni Bernard ni Cannon definieron el término estrés, pero sus contribuciones permitieron la construcción de este concepto. Siguiendo con la historia del término estrés, aunque el concepto el proviene de la ingeniería, y se refiere a las fuerzas que se enfocan en una estructura y causan un estado de deformación (tensión) (Hermans et al., 2014), el concepto clásico que se utilizó durante mucho tiempo en las ciencias de la salud, lo propuso Hans Selye (conocido como el padre del estrés), donde él define al estrés como “la respuesta no específica del cuerpo ante cualquier demanda” (Selye, 1936). Selye llegó a este término por medio de su práctica médica donde observaba que sus pacientes tenían una variedad de síntomas “no específicos” producto de una respuesta común a una experiencia estresante. Estas observaciones en conjunto con otros experimentos de laboratorio le permitieron proponer el término de “síndrome de adaptación general”, que se definía como la descarga del sistema nervioso simpático que le permitía al organismo pelear o huir ante una situación que lo amenazara (Fink, 2010). Fue así como Selye plantó en la mira de la investigación éste fenómeno.

A partir de este punto existen muchas propuestas de diferentes autores, que han tratado de definir el concepto de estrés, incluyendo o eliminando diversos aspectos, en este sentido,

Chrousos & Gold (1992) retoman lo dicho por Cannon, Bernard y por supuesto Selye, definiendo el estrés como el estado de desarmonía o amenaza de la homeostasis, donde la respuesta adaptativa puede ser específica o puede ser generalizada y no específica. Un poco más adelante, McEwen (2000a), define al estrés como la amenaza real o percibida hacia la integridad fisiológica o psicológica de un individuo que resulta en respuestas fisiológicas y/o conductuales. Por otro lado, algunas disciplinas como la biomedicina, al estudiar esta respuesta, comienzan también a proponer su definición de estrés, y lo definen como las situaciones en que los glucocorticoides y las catecolaminas están elevados por un evento de demanda del sistema (Levine, 2005).

Otra propuesta de definición es la de Kim, Diamond, Haven & Blvd (2002), donde sugieren tres componentes en la definición de estrés. El primero indica que el estrés requiere excitabilidad o arousal, que se puede medir operacionalmente usando electroencefalografía, actividad motora y neuroquímica (adrenalina y glucocorticoides). Segundo indica que la experiencia debe ser percibida como aversiva y tercero indica que debe haber una falta de control (i.e. predictibilidad), este último elemento determina la magnitud de la experiencia y la susceptibilidad de un individuo para desarrollar secuelas fisiológicas y conductuales.

Recientemente el término, “Alostasis” (que ya había sido planteado por Selye, Sterling y Ever en 1980 como heterostásis) (Fink, 2010), ha sido retomado en la literatura del estrés y se refiere al mantenimiento de la estabilidad a través del cambio, siendo entonces, un proceso fundamental a través del cual los organismos activamente se ajustan a los eventos. La alostasis distingue entre los sistemas que son esenciales para la vida (homeostasis) y aquellos que mantienen estos sistemas en balance (alostasis) (McEwen and Wingfield, 2003; McEwen, 2000b). Siguiendo esta idea, McEwen & Wingfield (2003) plantean otra modificación en la definición, esta vez considerando el término alostasis. La nueva conceptualización que toman ellos es que el estrés describe los eventos que amenazan a un individuo (incluyendo los eventos que se relacionan con un ciclo de vida normal) y que provocan respuestas alostáticas de tipo fisiológicas o psicológicas.

Las definiciones aquí mencionadas se han centrado en aspectos específicos de la respuesta de estrés (p.j. los niveles hormonales, amenaza a la homeostasis, procesos de regulación alostáticos, etc.), por lo tanto, actualmente existen muchas definiciones que, si bien no son erradas, no involucran el panorama completo.

Para esta investigación, se definió al estrés como una respuesta sistémica desencadenada por una amenaza real o percibida que aumenta la probabilidad de supervivencia de un organismo y donde la efectividad de la respuesta se evalúa con las consecuencias de la misma. Ésta definición toma en cuenta que no solo el sistema nervioso central puede desencadenar la respuesta de estrés, también el sistema nervioso periférico y el sistema inmune (lo cual le da la característica de ser sistémica); segundo cuando se habla de la percepción de una amenaza, se está teniendo en cuenta la interpretación y/o el reconocimiento del estímulo que potencialmente puede desencadenar la respuesta; tercero, al hablar de un aumento en la probabilidad de supervivencia me refiero a que por sí sola, la respuesta de estrés no siempre será adaptativa y junto con el cuarto punto “se evalúa con las consecuencias de la misma” el valor adaptativo o no adaptativo se dará cuando la respuesta haya tenido éxito o no en el contexto del organismo. Además, se definirá estresor como cualquier estímulo que amenaza o es percibido como amenazante y que desencadena la respuesta de estrés en el organismo.

### **1.1.2 ESTRÉS, ALGUNOS CONCEPTOS ASOCIADOS.**

Muchos autores proponen que no todas las reacciones al estrés son iguales, debido a las diferencias en la vulnerabilidad del organismo, la reacción emocional que tenga frente a la situación estresante y la habilidad que tengan de enfrentar esos estresores (Fink, 2016).

Autores como Levi (1971) distinguen entre estrés “positivo” y “negativo”, donde la situación que desencadenaba la respuesta le proporcionaba dichas connotaciones. Quinones et al. (2015) caracterizan la respuesta de estrés positivo cuando el individuo percibe al estresor como un desafío, sin embargo, cuando percibe al estresor como una amenaza, se desencadenan respuestas de estrés negativo.

Sin embargo, en 1974 Selye introduce los términos de “eustrés” y “distrés” para distinguir entre respuestas de estrés iniciadas por emociones negativas y aquellas iniciadas por emociones positivas. Además, Berk (2001) retoma el término eustrés propuesto por Selye y lo define como “un fenómeno positivo que disminuye los efectos biológicos del distrés”. Sin embargo, aclara que no todos los efectos positivos contrarrestan los efectos “clásicos” o negativos del estrés.

Dentro de la evidencia que sustenta estos dos términos, Aschbacher (2013), sugiere que bajo ciertas circunstancias la exposición a estrés (eustrés), puede tener el potencial de mejorar el desempeño del organismo. Por ejemplo, Berk (2001) reporta que existen cambios inducidos por el eustrés y que estos son de ayuda en contextos clínicos para modular aspectos específicos y

optimizar respuestas inmunológicas en la prevención o disminuyendo los síntomas de la enfermedad. Además, añade que las conductas complementarias que generan eustrés como el ejercicio, dieta y la interacción social apropiada modulan parámetros biológicos a través de la modificación de la carga alostática. Sin embargo, se debe tener mucho cuidado con estos conceptos, debido a que en muchas ocasiones son entendidos como diferentes tipos de respuestas de estrés, y no es así, la respuesta de estrés es la misma en ambas condiciones, más bien se deben considerar los términos eustrés y distrés como las consecuencias del estrés, es decir, si la respuesta fue efectiva en el contexto del organismo, será eustrés y si no, se considerará distrés. Por último, aunque el término estrés, históricamente lleva una connotación negativa, debemos considerar su importancia para procesos como la sobrevivencia y adaptación en situaciones donde se ve amenazado el individuo, su descendencia, su territorio o la especie entera (Sánchez-Castillo et al., 2014).

## **1.2 LA ACTIVACIÓN DEL EJE SIMPATO-ADRENO-MEDULAR Y EL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-ADRENAL Y SU RESPUESTA AL ESTRÉS**

La respuesta fisiológica de estrés involucra un eficiente y altamente conservado conjunto de sistemas que responden para mantener la integridad fisiológica del organismo, incluso en las circunstancias más demandantes (Ulrich-Lai & Herman, 2009).

Existen dos sistemas fisiológicos relacionados con la respuesta de estrés, el primero es el eje simpato-adreno-medular (SAM) que de manera general se encarga de las respuestas agudas y de corto plazo, mientras el segundo es el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) que se encarga de las respuestas crónicas y de largo plazo (Gotlip, et al., 2008).

En respuesta a un estímulo que se percibe como amenazante, el eje SAM se activa (*ver Figura 1*) rápidamente por medio del Sistema Nervioso Simpático (SNS) (rama del Sistema Nervioso Autónomo (SNA)) (Smeets, 2010), por medio de las neuronas preganglionares simpáticas en la zona toracolumbar de la columna celular intermediolateral que activan los órganos que inervan (p.j. del sistema cardiovascular y de las visceras abdominales), además de activar las células cromafin de la médula adrenal, lo que incrementa los niveles de adrenalina y noradrenalina (Ulrich-Lai & Herman, 2009), mientras se inhibe la respuesta del Sistema Nervioso Parasimpático (SNP) (también rama del SNA) (Smeets, 2010). Además, es importante destacar que la excitación del SNS disminuye rápidamente (debido a la activación de los núcleos preganglionares parasimpáticos ubicados en la zona cráneo-sacra de la médula espinal que

activan núcleos postganglionares ubicados cerca o en los órganos inervados y que generalmente se oponen a las respuestas del SNS) dando como resultado respuestas de corta duración (Figura 2) (Ulrich-Lai & Herman, 2009). El SNS inicia la respuesta en órganos como corazón, arterias y piel (sudoración en las palmas de las manos y pies), además de dilatar la pupila, aumentar la tasa cardiaca, el flujo sanguíneo y la captura de oxígeno en pulmones (Smeets, 2010), todo esto con ayuda de la adrenalina y noradrenalina que es liberada por la médula adrenal (Bitsika et al., 2014). La adrenalina y la noradrenalina liberada mediante esta activación no pueden pasar la barrera hemato-encefálica (BHE) y por lo tanto no puede afectar al cerebro directamente. Sin embargo, pueden estimular el nervio vago que activará el locus coeruleus y los núcleos del tracto solitario, que resultará en un aumento de noradrenalina en el cerebro (de Kloet et al., 2005).

Por otro lado, el eje HPA, en comparación con el SAM, responde de manera más lenta a los estímulos que son percibidos como amenaza, y lo hace por medio de una cascada hormonal, en lugar de una vía nerviosa directa (Guyton & Hall, 2006). El eje HPA es el mayor sistema endócrino que se activa durante un evento estresante y su activación produce como resultado, el que un organismo pueda modular su conducta ante las demandas que ejerce el ambiente. Este eje ejerce una influencia sobre una variedad de procesos fisiológicos como la digestión, la respuesta inmune, emociones, la metabolización de energía y la conducta sexual, además tiene importancia evolutiva ya que se ha conservado a través de las especies (Du & Pang, 2015; O'Connor et al., 2000).

La respuesta biológica desde este eje inicia cuando los sistemas sensoriales perciben un evento y lo comparan con otras experiencias previas, si se percibe el estímulo o el evento como estresante (Fink, 2016), entonces el cerebro activa el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) (Lupien et al., 2009), las neuronas de éste núcleo sintetizan y secretan a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y vasopresina (AVP) en la circulación portal de la eminencia medial; la CRH activa la hipófisis anterior que sintetiza hormona adrenocorticotropa (ACTH). ACTH viaja a través del torrente sanguíneo y estimula la corteza adrenal que secreta cortisol (en humanos, monos y peces) y corticosterona (en roedores) al torrente sanguíneo (Figura 1) (De Kloet et al., 2005) Los glucocorticoides que empiezan a circular en sangre (que actúan a nivel central y periférico) promueven la movilización de la energía almacenada y potencian numerosos efectos simpáticos como la vasoconstricción periférica. Además de que la corteza adrenal es inervada directamente por el SNS que puede regular la liberación de glucocorticoides (Ulrich-Lai & Hermans, 2009).

La liberación de glucocorticoides producto del eje HPA, en conjunto con la respuesta del SAM y el glucagón liberado por el páncreas, son los principales responsables de la elevación de glucosa en sangre y el mantenimiento de la presión sanguínea durante el estrés, que permite al organismo disponer de una mayor cantidad de energía para reaccionar frente al estímulo percibido como amenazante (Smeets, 2010).

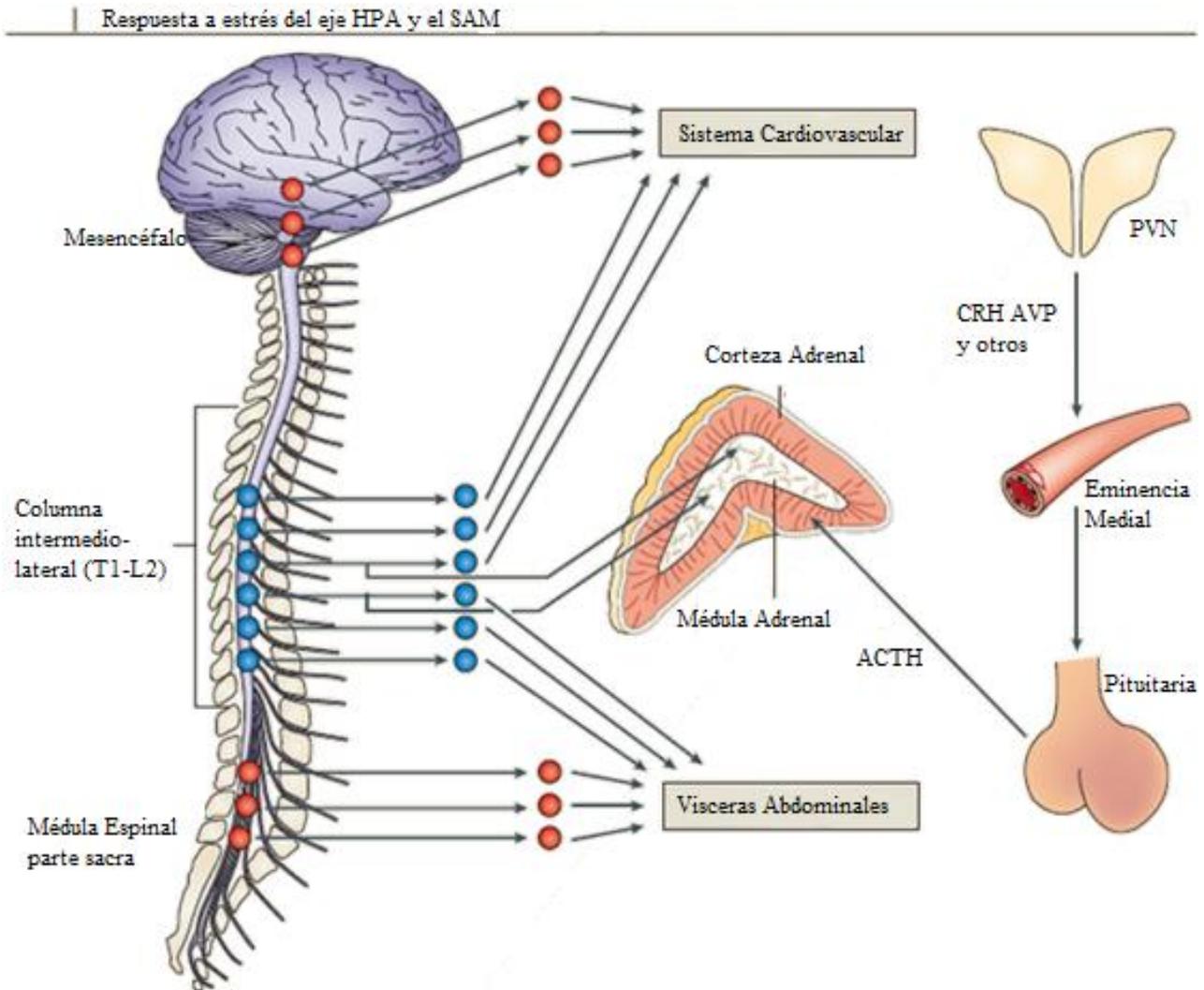
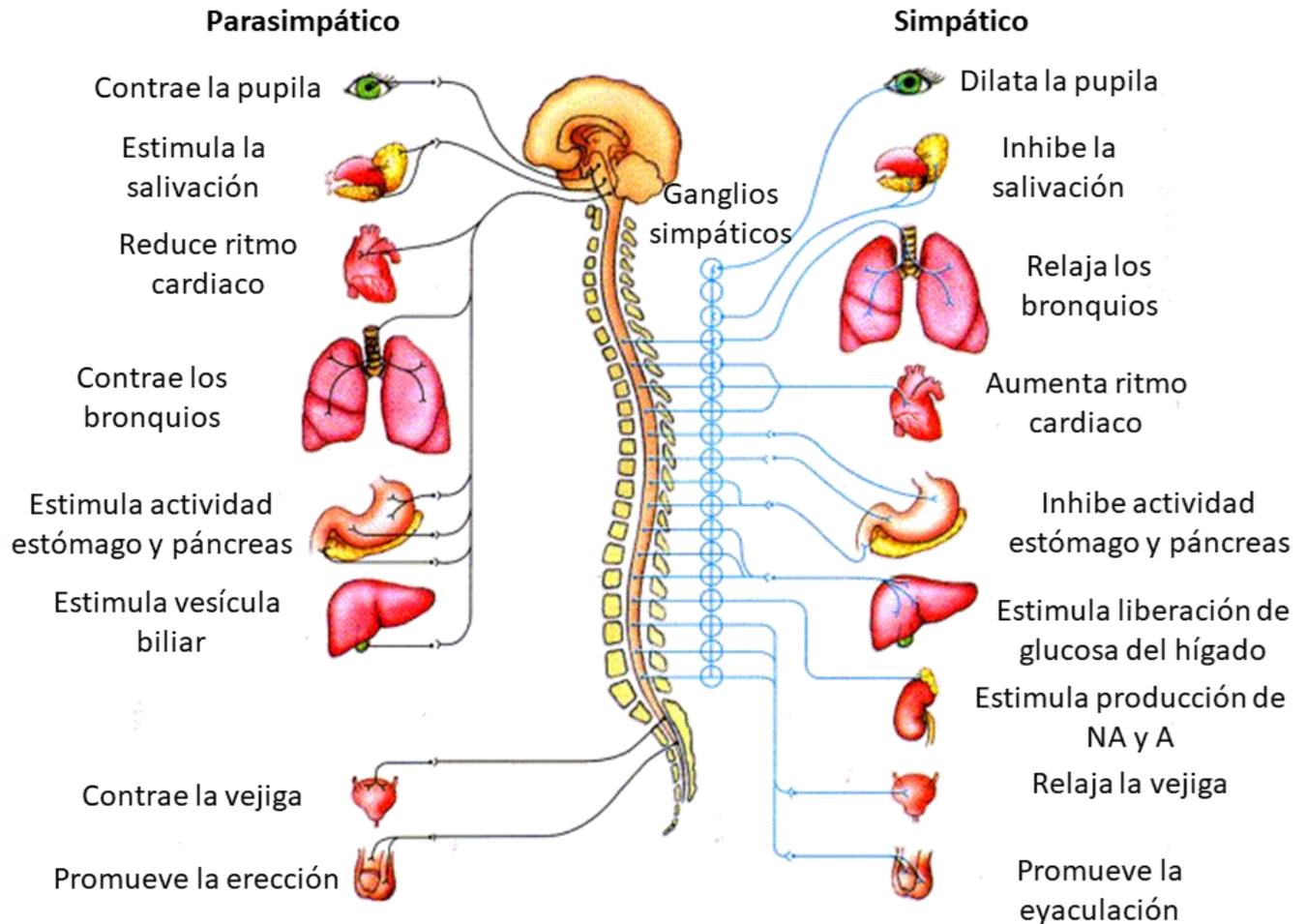


Figura 1. Muestra la activación del eje SAM (lado izquierdo) y eje HPA (lado derecho) durante la respuesta de estrés. El eje SAM inicia su activación por medio de neuronas de la rama simpática (círculos azules) que activan los órganos que inervan (p.j. visceras abdominales y corazón) además de producir estimulación directa a la médula adrenal para liberar adrenalina y noradrenalina. El eje HPA inicia su activación en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) que permite la liberación de hormona liberadora de corticotropina (CRH) y vasopresina (AVP) a la eminencia medial para que viaje e impacte a la hipófisis anterior, permitiendo que

*esta libere hormona adrenocorticotropa (ACTH) al torrente sanguíneo, para que tenga efecto en la corteza adrenal y segregue cortisol (tomada y modificada de Ulrich-Lai & Hermans, 2009).*

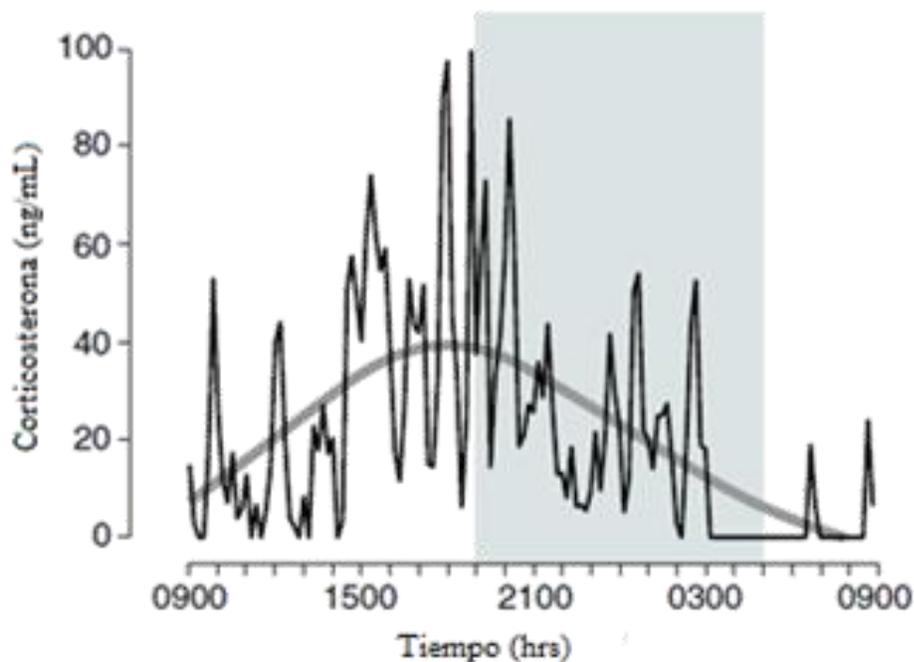


*Figura 2 – Esquema que muestra las regiones de la médula espinal que forman la rama simpática (SNS) y parasimpática (SNP) del sistema nervioso autónomo (SNA). Durante la respuesta de estrés el SAM por medio de la rama simpática excita la actividad de órganos como los bronquios, corazón, estómago, médula suprarrenal, etc. Además de inhibir la actividad de la rama parasimpática. Sin embargo, la rama simpática rápidamente vuelve a activarse permitiendo la modulación de la actividad de la rama simpática.*

### 1.2.1 GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides (GCs) son hormonas derivadas del colesterol y son esenciales para la vida, mostrando amplios efectos en múltiples sistemas para regular funciones fisiológicas que

permiten el mantenimiento de los niveles basales o estados estables del organismo (Chrousos et al., 2004). Su precursor es la 11-dehidro-corticoesterona y se sintetizan por la reductasa 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD) tipo 1, además son inactivados por la 11  $\beta$  HSD tipo 2 en células del riñón, colon y glándulas sudoríparas (Holmes & Seckl, 2006; Geerling and Loewy, 2009). Una función importante de los GCs es la regulación del metabolismo de glucosa (por su capacidad de incrementar la concentración de glucosa en sangre toman su nombre) (Sapolsky et al., 2000), además son esenciales para la regulación del tono vascular, la función inmune y para la función del sistema nervioso central (SNC), por lo que una disfunción de este sistema tiene significantes implicaciones clínicas (Kadmiel & Cidlowski, 2013). Otro aspecto importante de los GCs es la regulación circadiana que tienen, en varios organismos como en los humanos, los picos de cortisol se dan en la fase diurna (activa) y decrecientan hacia la fase nocturna (no activa) (Doczy et al., 2009), por otro lado, en ratas se sabe que tienen su pico en el periodo nocturno y decrecienta en el periodo diurno (*ver Figura 3*) (Spiga et al., 2014).



*Figura 3 Gráfica del ritmo circadiano que sigue el cortisol en ratas. Se muestra la medición de corticoesterona en el eje de las y y el tiempo en horas en el eje de las x. Las mediciones de corticoesterona varían en el tiempo mostrando actividad circadiana, teniendo su pico máximo a las 18:00 hrs aproximadamente (en el periodo nocturno) y decrecientando hasta su nivel más bajo a las 9:00 hrs (en el periodo diurno) (tomado y modificado de Spiga et al., 2014).*

Debido a que la activación del eje HPA termina con la producción de cortisol o corticosterona, estas hormonas se han utilizado como un indicador de la respuesta de estrés (O'Connor et al., 2000), sin embargo, la liberación de glucocorticoides no solo ocurre con la presencia de un estímulo físico (acción moderatoria), también puede ocurrir de forma anticipatoria a un evento adverso (Acción preparativa), esta liberación es guiada por experiencia previa (memoria), predisposiciones instintivas y/o la predicción de la ocurrencia de un evento amenazante (Doczy et al., 2009; Sapolsky et al., 2000).

### **1.2.2 RECEPTORES A MINERALOCORTICOIDES Y A GLUCOCORTICOIDES**

A nivel SNC hay dos tipos de receptores que regulan la actividad genómica de los glucocorticoides, estos son los receptores mineralocorticoides (MR) y los receptores a glucocorticoides (GR) (De Kloet, 2013; Doczy et al., 2009). En ausencia de GCs, ambos MR y GR se encuentran en el citoplasma como complejos heteroméricos inactivos. Cuando los GCs atraviesan la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular y se forma el complejo ligando-receptor, los GR y los MR sufren cambios conformacionales y se trasladan al núcleo (Ricketson et al., 2007). Ambos receptores reciben a la misma hormona (cortisol o corticoesterona), pero tienen diferente afinidad y están distribuidos de formas diferentes, lo cual contribuye a las diferencias en su función biológica (Balsevich et al., 2017). En roedores los MR tienen mayor afinidad que los GR, y se ocupan ampliamente durante la fase diurna, mientras que los GR se saturan en respuesta al estrés o en el pico de GCs durante el ritmo circadiano (de Kloet et al., 2005). Con respecto a la localización de estos receptores, los GR tienen una amplia distribución a nivel periférico, en tejidos y varios tipos de células y a nivel SNC se localizan tanto en neuronas como en glía, con una alta concentración en sistema límbico, hipocampo, amígdala PVN y en neuronas monoaminérgicas ascendentes. En comparación, los MR muestran menor distribución que los GR, sin embargo, también se expresan abundantemente en sistema límbico, hipocampo, amígdala, septum y corteza prefrontal. Por otro lado, se cree que la activación de los MR se relaciona con el mantenimiento de los circuitos relacionados al estrés y con el inicio de la respuesta aguda de estrés y los GR se activan solo cuando hay altas concentraciones de GCs, en la respuesta tardía del estrés y en la finalización de la respuesta de estrés por medio de la inhibición del eje HPA (Balsevich et al., 2017; de Kloet et al., 2005; Herman et al., 2003; Van Eekelen et al., 1988).

### 1.2.3 REGULACIÓN DE LA RESPUESTA DE ESTRÉS

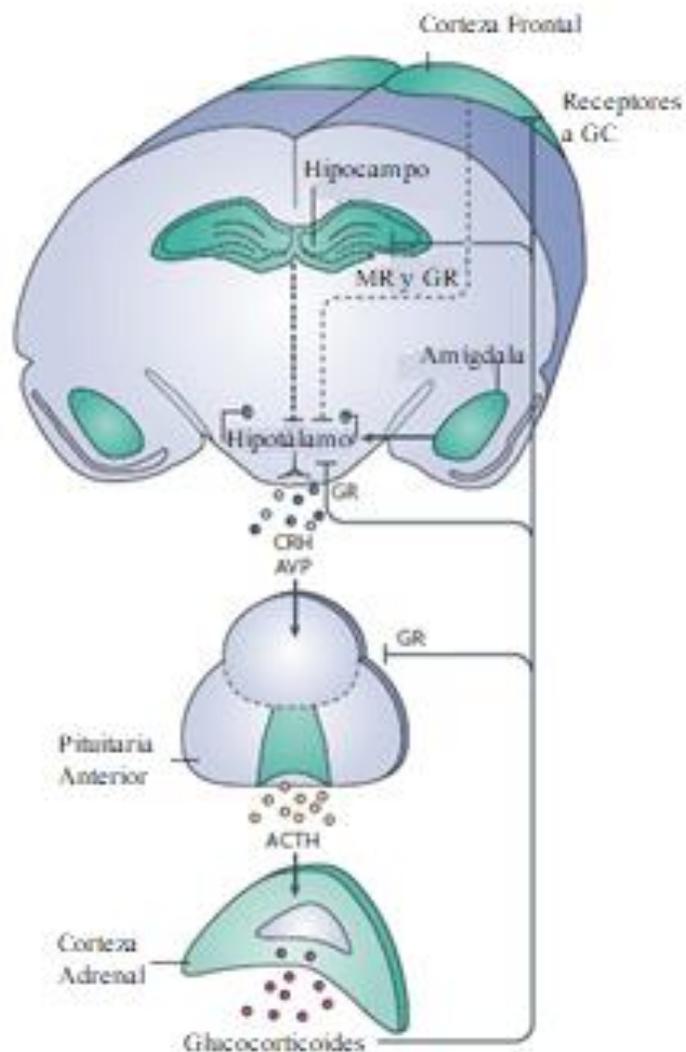
La respuesta de estrés se regula por diferentes sistemas, aquí describiremos tres niveles que involucran estructuras, receptores a glucocorticoides y niveles de glucosa en el cuerpo. Existen múltiples regiones cerebrales que median el control de la activación del eje HPA. Dentro de todas las regiones, se ha demostrado que el sistema límbico es responsable en gran parte de estas respuestas. Las estructuras límbicas involucradas, incluyen al hipocampo, corteza prefrontal y amígdala (Doczy et al., 2009; Balsevich et al., 2017; de Kloet et al., 2005).

Existe evidencia que indica que el hipocampo se relaciona con la inhibición del eje HPA (Jacobson & Sapolsky, 1991). La estimulación del hipocampo decrementa la secreción de GCs, mientras que la lesión de este incrementa la liberación de GCs (Dunn & Orr, 1984; Fendler et al., 1960) e incrementa la expresión genética de CRH en PVN, lo que sugiere que el PVN es un punto importante para la inhibición hipocampal (Herman et al., 1995). Además, la estimulación hipocampal decrementa la tasa cardíaca, la presión sanguínea y la tasa respiratoria en ratas, y aunque no tiene conexión directa con el tallo cerebral, el hipocampo se conecta con la Corteza Prefrontal medial (CPFm), sugiriendo que también modula la función autónoma por medio de la PFCm (Ruit & Neafsey, 1990).

Al igual que el hipocampo, la corteza prefrontal (PFC) está relacionada con la inhibición del eje HPA. La región de la PFCm se ha relacionado con la finalización de la respuesta del eje HPA, debido a que regula la duración de secreción de GCs (Ulrich-Lai & Hermans, 2009). De forma contraria, se ha reportado que la PFC infralímbica incrementa la presión sanguínea, mientras que la lesión o inhibición de esta área disminuye las respuestas cardiovasculares (Resstel et al., 2006).

Por otro lado, la amígdala es una estructura compleja que modula las respuestas autónomas y neuroendócrinas (Ulrich-Lai & Hermans, 2009). El núcleo central de la amígdala (CeA) es el principalmente relacionado con la respuesta de estrés, y se le considera un nodo de integración de la respuesta de estrés, debido a la participación que tiene en la modulación de respuestas autónomas y las conductas relacionadas al estrés (Davis, 1992). El CeA se activa cuando hay un evento aversivo y ante amenazas sistémicas, también modula el ritmo cardíaco durante eventos aversivos de tipo psicológico (Ulrich-Lai & Hermans, 2009), además su lesión atenúa la secreción de GCs en ratas (Doczy et al., 2009).

Otro sistema que regula la respuesta del eje HPA es el de los GCs. Los GCs actúan con retroalimentación negativa en la liberación de ACTH y CRH a nivel de la pituitaria, así como de CRH en hipotálamo (*ver Figura 4*) (Lupien et al., 2009; Doczy et al., 2009).



*Figura 4. Esquema de activación y retroalimentación negativa del eje HPA. La activación del eje HPA que se ha descrito previamente, finaliza con la liberación de glucocorticoide. Los glucocorticoides viajan y a través de la activación de los receptores a glucocorticoides (GR) inhiben la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH) a nivel de la pituitaria. También inhiben la liberación de hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP) a nivel del hipotálamo por medio de la activación de los GR. (Tomada y modificada de Lupien et al., 2009).*

La retroalimentación negativa de los GCs se relaciona con mecanismos genómicos (que cambian las configuraciones del núcleo de la célula) y no genómicos (que no tienen efectos en el núcleo de la célula). La retroalimentación rápida (no genómica) ocurre después de minutos, y es responsable de la rápida finalización de la activación del PVN y de la inhibición de la liberación de ACTH. Se cree que está mediada por la activación de los GR membranales en el hipotálamo y en la pituitaria. Mientras que la retroalimentación tardía (genómica) ocurre en un periodo de tiempo más largo, y está mediada por GR nucleares en el PVN y en la pituitaria (Herman, 2010).

Existen otros mecanismos periféricos ajenos a los GCs por los cuales se regula la respuesta del eje HPA, por ejemplo, el incremento en la cantidad de glucosa en el cuerpo. Esta glucosa se utiliza para recuperar la cantidad de energía gastada durante el estrés; inhibe la proliferación de células T, así controlando la respuesta inflamatoria; e inhibe otros sistemas hormonales reduciendo el gasto de energía (Herman et al., 2003).

Por otro lado, cuando los sistemas de regulación son rebasados, no son suficientes para detener la respuesta de estrés o la inhiben de manera crónica, tendremos que la respuesta que en un principio es necesaria para la supervivencia, se convierte en un factor de riesgo para padecer diversos trastornos psiquiátricos. Como el trastorno de ansiedad generalizada, fobias, trastorno de estrés postraumático, depresión mayor, etc.. Sin embargo, factores como el proceso de desarrollo, las diferencias individuales, las predisposiciones genéticas, las experiencias a lo largo de la vida, la forma en que reaccionan al estrés y las consecuencias a largo plazo que puedan presentar, pueden contribuir a la capacidad de la respuesta fisiológica y conductual para regular los factores de estrés (McEwen, 2009).

Se ha propuesto que los cambios neuro-adaptativos que resultan de la estimulación exacerbada de una o más vías que regulan al CRH durante la exposición a estrés pueden iniciar o predisponer al organismo a padecer trastornos como ansiedad y depresión (Carrasco & Van de Kar, 2003).

### **1.3 PROTOCOLOS DE ESTRÉS**

Los modelos animales son la herramienta básica para entender la patofisiología de los trastornos y para el desarrollo de nuevos tratamientos (Kumar et al., 2013). Dentro de la investigación con estrés, de manera general podemos clasificar los protocolos de investigación animal en dos.

#### **1.3.1 PROTOCOLOS DE ESTRÉS AGUDO**

Los modelos animales para estrés agudo descritos por Kumar et al. (2013) pueden ser:

- 1) Con estresores físicos: choques eléctricos, nado forzado, inmovilización, privación de sueño, ruidos fuertes y conflicto social
- 2) Estresores psicológicos: aislamiento social, exposición a objetos no familiares y exposición a orina de depredador

### **1.3.2 PROTOCOLOS DE ESTRÉS CRÓNICO**

Los modelos animales de estrés crónico descritos por Kumar et al. (2013) pueden ser:

- 1) Con estresores crónicos: Esto incluye repetición y alternación de la exposición a estresores físicos y psicológicos, previniendo la habituación a los estresores.
- 2) Modelo de bulbotomía olfatoria: implica una destrucción bilateral de los bulbos olfatorios (se sabe que causa alteraciones conductuales, bioquímicas y de cascadas celulares similares a las que presentan pacientes con depresión mayor)
- 3) Modelo de traumatismo craneoencefálico: Se produce un choque en una parte del cráneo rompiendo o solo quebrando el hueso, se sabe que activa cascadas neuroinflamatorias, de estrés oxidativo y daño excitotóxico.

### **1.3.3 PROTOCOLO DE ESTRÉS CRÓNICO MEDIO (CMS)**

Dentro de los paradigmas descritos en el apartado anterior, uno de los protocolos más utilizados con estresores crónicos es el *estrés crónico medio* (CMS) que ha sido llamado de diferentes formas a lo largo del tiempo (CUS (estrés crónico impredecible), CUMS (estrés crónico impredecible medio), CVS (estrés crónico variable), CUSB (batería de estrés crónico impredecible) etc.) sin diferir en la idea central de aplicación que es una exposición continua (lo que le da la característica crónica) de micro estresores que son aleatorizados en el tiempo (lo que le da la característica de impredecible) (Willner, 2017). Este protocolo tiene sus inicios en la década de los 80's del siglo pasado con Katz y sus colaboradores quienes reportaron que los animales sometidos a este modelo mostraban un decremento en el consumo de líquidos débilmente azucarados, lo cual reflejaba un decremento en el impacto hedónico que tenía el endulzante (Katz, 1982). Sin embargo, dada las normas éticas de 1986 en el manejo de animales para procedimientos científicos en el Reino Unido, se solicitó que se redujera la intensidad del paradigma, eliminando choques intensos en las patas, inmersión forzada en agua sumamente fría y privaciones prolongadas (mayores a 24 horas) de agua o comida (Willner, 2017). Después de las modificaciones, se sugirió la aplicación de microestresores y se le acuñó el nombre de "*estrés crónico medio* (CMS)". La primera publicación exponía a los roedores de 5-9 semanas y se

reportó nuevamente el impacto hedónico del protocolo, además de que los antidepresivos revertían estos cambios producidos por el CMS (Willner et al., 1987).

Posteriormente se planteó como un modelo que producía un estado anhedónico en roedores y se ha estudiado desde los 80's como un modelo que puede mimetizar algunas características de la depresión mayor con validez predictiva (responsividad selectiva a antidepresivos aplicados crónicamente y no a la aplicación aguda), aparente (comparado con la lista de síntomas del DSM-V, como anhedonia, decremento en conducta motivada como sexual y agresiva, relativa pérdida de peso, patrones de sueño alterados, etc.) y de constructo (similar a constructos psicológicos, como la respuesta a eventos reforzantes) (Willner, 2017). Además, Dziejzicka-Wasylewska (1997) indicó que lo único que no puede mimetizar el modelo, son los síntomas humanos que solo son accesibles por verbalización y la habilidad disminuida para pensar, concentrarse o para tomar decisiones. Sin embargo, desde los años 2000 este último punto se ha comenzado a explorar, y se ha reportado daños cognitivos en pruebas que requieren habilidades espaciales y memoria de reconocimiento (Cuadrado-Tejedor et al., 2011; Orsetti et al., 2007; Willner, 2017).

#### **1.3.4 EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO**

Muchos de los efectos que produce el CMS en los sistemas neuroquímicos, así como a nivel estructural en el cerebro de ratas y ratones, son muy similares a los que se describen en los cerebros de pacientes con depresión mayor (Hill et al., 2012). También, existe evidencia que indica que el estrés crónico está asociado con la depresión (Dumont & Provost, 1999; Hammen, 2005; Salavecz et al., 2014; Willner, 2017).

El factor crítico para que el CMS funcione, recae en la activación del eje HPA, la falla en los sistemas de retroalimentación negativa y la liberación crónica de GCs para inducir un estado anhedónico (Kvarta et al., 2015), sin embargo, también se ha reportado esta y otras conductas tipo-depresivas en la ausencia de altos niveles de GCs (Remus et al., 2015).

Dentro de las estructuras que se ven comprometidas por la exposición al CMS, el hipocampo es una de ellas, debido a que sufre un deterioro en las células granulares, lo que lleva a la pérdida de la capacidad de inhibición del hipocampo en el eje HPA. Estos efectos incluyen una activación inicial de microglía que es característica de una neuropatología (Walker et al., 2013). También el CMS decrementa la expresión de CREB (un factor de transcripción nuclear), lo que decrementa la expresión de BDNF y como consecuencia se encoge el árbol dendrítico de las neuronas hipocampales, hay pérdida de neuronas granulares y decrementa la neurogénesis lo cual explica el decremento en el volumen hipocampal (Song et al., 2006; Bessa et al., 2009; Jayatissa et al.,

2010), además este cambio morfológico se ha observado en pacientes que padecen depresión mayor (Videbech & Ravnkilde, 2004; Campbell et al., 2004).

Otra de las áreas afectadas por el CMS es la PFC, que al igual que hipocampo tiene un papel importante en la retroalimentación negativa que ejerce sobre el eje HPA (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Dentro de los efectos que produce el CMS en la PFC es la atrofia de dendritas de células piramidales, lo que decrementa los disparos de estas células (Guo et al., 2014) y decrementa la expresión de BDNF y otras proteínas como sinapsina 1 y conexina 43 (Chen et al., 2016), junto con pérdida glial (Elsayed et al., 2012) y decremento en el volumen de la PFC (Bessa et al., 2009).

Otra estructura que está relacionada con la respuesta de estrés es la amígdala. Esta, a diferencia de hipocampo y PFC, ejerce retroalimentación positiva activando el eje HPA, y esta activación vuelve a activar amígdala, controlándose este sistema por hipocampo (Myers et al., 2012). Lo que significa que el deterioro de la retroalimentación negativa que ejerce el hipocampo sobre el eje HPA, incrementaría la actividad de la amígdala; efecto que se ha observado en protocolos de CMS (Delgado y Palacios et al., 2011), además de incrementar la longitud y la densidad dendrítica (Qiao et al., 2016).

El incremento en la actividad de la amígdala por el CMS decrementa la actividad de las células dopaminérgicas del sistema mesolímbico en el área ventral tegmental (VTA) (Chang & Grace 2014). Por otro lado, no solamente la actividad de estructuras como hipocampo, corteza prefrontal y amígdala se ven afectadas por el estrés crónico. También el sistema mesolímbico dopaminérgico ha sido relacionado con los efectos del CMS. Dentro de sus afectaciones se le atribuye el efecto anhedónico que se observa después del CMS, debido a que Di Chiara et al. (1999), observaron un decremento en la liberación de dopamina en el Núcleo Acumbens Shell en respuesta a una recompensa, mientras que aumenta la liberación de dopamina en la misma región en respuesta a un estímulo aversivo, y un decremento en la expresión de receptores D2 en núcleo acumbens (Dziedzicka-Wasylewska et al., 1997). El efecto del CMS es transmitido vía pálido ventral a la habénula lateral (reconocida por mediar la respuesta a los estados emocionales negativos por medio de las vías ascendentes dopaminérgicas y de 5HT), que conecta con el núcleo tegmental dorsomedial, que conecta con VTA y finaliza con núcleo acumbens, lo que explicaría la dificultad de detectar el efecto anhedónico causado por el CMS que otros cambios que emanan de otras estructuras (Proulx et al., 2014).

## **1.4 TIEMPOS DE EXPOSICIÓN A ESTRÉS**

La investigación básica en estrés trabaja con los paradigmas mencionados anteriormente, por lo que la respuesta de estrés dependiendo de la temporalidad se hace importante, debido a que de ella depende qué efectos vamos a observar y estudiar en nuestro modelo animal.

### **1.4.1 ESTRÉS AGUDO**

El tiempo de exposición a eventos adversos modifica la respuesta que presenta el sistema ante el mismo. Cuando las amenazas no están mucho tiempo presentes (es decir, el tiempo de exposición al estresor no rebasa un periodo de tiempo corto (minutos a horas)), se dice que la respuesta de estrés es aguda (Dickerson & Kemeny, 2004). La respuesta aguda permite la preparación de los recursos disponibles (de tipo fisiológicos y cognitivos) para enfrentar la amenaza actual o amenazas inminentes (Sánchez-Castillo et al., 2014). En este sentido, algunas de las respuestas que generan los organismos a causa del estrés, son:

1. Distribución de energía en orden para mantener el funcionamiento de los músculos y del sistema nervioso central (SNC).
2. Incremento de recursos atencionales dirigidos al estímulo estresor.
3. Incremento de ritmo respiratorio y cardiaco.
4. Redistribución de la corriente sanguínea a través de los músculos y del SNC.
5. Modulación del sistema inmune.
6. Regulación a la baja de la respuesta reproductiva sexual.
7. Pérdida del control intestinal.
8. Decremento del consumo de alimentos y el apetito.

Todas estas respuestas coordinadas interrumpen la operación del sistema para aumentar la probabilidad de supervivencia, además cuando la demanda termina o el estresor desaparece del ambiente, la respuesta adaptativa es el retorno a la actividad basal del sistema (Sánchez-Castillo et al., 2014; Hermans et al., 2014; Joëls & Baram, 2009; Vaessen et al., 2015).

Siguiendo la idea anterior, la respuesta de estrés es caracterizada por la secreción de mediadores de estrés que son un repertorio de señales moleculares que se disparan con especificidad espacial y temporal durante la respuesta de estrés. Estos mediadores pueden ser los glucocorticoides y catecolaminas (como noradrenalina, dopamina y serotonina), que permiten la respuesta de adaptación al estresor, es decir los recursos que se emplean se usan para modificar el estado base del sistema y que mediante los cambios (como aumento de arousal o aumento de tasa

cardiaca) el organismo genera una conducta que le permita adaptarse a la demanda. Sin embargo, cuando esta respuesta permanece en el tiempo (e.i, la respuesta sigue activa a pesar de que el estresor ya no está presente), deja al sistema incapaz de afrontar estresores de manera exitosa, lo que se denomina disfunción asociada al estrés crónico (Joëls & Baram, 2009; Monteiro et al., 2015).

#### **1.4.2 ESTRÉS CRÓNICO**

El estrés crónico (exposiciones largas de tiempo desde días, semanas a años) provoca cambios sostenidos y progresivos en la expresión de genes particulares (a través de los corticoides y sus receptores glucocorticoides), además provoca alteraciones estructurales en neuronas (por ejemplo, en estructuras como el hipocampo y amígdala), puede inducir disfunciones inmunes y un incremento en los patrones de disparo neuronal en el cerebro por ejemplo en amígdala. Además, puede llevar a una desregulación en el sistema y predisponer al individuo a un amplio rango de psicopatologías como la ansiedad, depresión y demencia (Contreras et al., 2013; Joëls & Baram, 2009; Monteiro et al., 2015; Vaessen et al., 2015; Wang et al., 2015; Gonzalez-Rivera et al., 2016).

Actualmente se tienen muchos problemas al definir el estrés crónico, ya que algunos autores como Miller, Chen y Zhou (2007), mencionan que se define como el estrés que persiste durante un periodo prolongado de tiempo (sin especificar la temporalidad) y que el estrés puede pasar de agudo a crónico, sin embargo, no se define como es que esto ocurre o cual es la ventana temporal en la cual se basan para identificar estos cambios.

La *Tabla 1* muestra una recopilación de artículos de investigación en el tema de estrés crónico, se puede observar que las ventanas de duración que utilizan sus protocolos difieren; se aplican protocolos desde 10 días, hasta 56 días de exposición. Esto puede resultar problemático debido a que los resultados pueden variar dependiendo del tipo de estresor, la intensidad, la predictibilidad del protocolo y por supuesto de la duración de la exposición a estrés. Estos aspectos pueden estar detrás de toda la gama de diferentes efectos producidos por el estrés (Stepanichev et al., 2016; Harpaz et al., 2013).

**Tabla 1**

**Tabla de revisión de efectos de protocolos y tiempos de exposición al estrés crónico impredecible.**

Título	Autor/ año	Sujetos	Duración	Efectos
Unpredictable chronic mild stress induced behavioral deficits: A comparative study in male and female rats	Farhan, M. et al., 2014	Wistar machos y hembras adultas	10 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>📉 Tasa de crecimiento</li> <li>📉 Consumo de alimento y agua</li> <li>📉 Actividad locomotora y erguimientos en campo abierto</li> <li>📈 Latencia al movimiento en hembras en campo abierto</li> </ul>
Chronic stress effects on working memory: Association with prefrontal cortical tyrosine hydroxylase	Lee & Goto, 2015	Sprague-Dawley machos adultos	21 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>📉 Desempeño en memoria de trabajo</li> <li>📉 Transmisión de DA y NA</li> <li>📉 Tirosina hidroxilasa en áreas paralímbicas</li> </ul>
Impaired adrenal medullary function in a mouse model of depression induced by unpredictable chronic stress	Santana, M. et al., 2015	C57/BL6 machos 3 meses de edad	21 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>📈 Peso y volumen glándula adrenal</li> <li>📈 NA y A día 7</li> <li>📉 NA y A día 21</li> <li>📈 Enzimas, transportadores y complejos SNARE en día 7</li> <li>📈 Enzimas, transportadores y complejos SNARE en día 21</li> <li>📉 Latencia a entrar al compartimento oscuro</li> <li>📉 Memoria a corto plazo</li> <li>● Peso corporal</li> </ul>
Preventive and therapeutic effect of treadmill running on chronic stress-induced memory deficit in rats	Radahmadi et al., 2015	Wistar macho adultos	21 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>📉 Consumo de sacarosa</li> <li>📈 Inmovilidad en nado forzado</li> <li>📉 Cruces y acicalamiento en campo abierto</li> <li>● Erguimientos en campo abierto</li> </ul>
Resveratrol exerts antidepressant properties in the chronic unpredictable mild stress model through the regulation of oxidative stress and mTOR pathway in the rat hippocampus and prefrontal cortex	Li et al., 2016	Wistar macho adultos	28 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>📉 Consumo de sacarosa</li> <li>📈 Inmovilidad en nado forzado</li> <li>📉 Cruces y acicalamiento en campo abierto</li> <li>● Erguimientos en campo abierto</li> </ul>
Attenuation of social interaction-associated ultrasonic vocalizations and spatial working memory performance in rats exposed to unpredictable chronic stress	Riaz, M. et al. 2015	Sprague-Dawley machos adultos	28 y 35 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>📉 Peso corporal</li> <li>● Preferencia de sacarosa</li> <li>📉 Latencia a buscar alimento</li> <li>📈 Vocalizaciones de anticipación (anhedonia)</li> <li>📉 Desempeño de memoria espacial en laberinto radial</li> </ul>
Chronic mild stress in submissive mice: Marked polydipsia and social avoidance without hedonic deficit in the sucrose preference test	Gross & Pinhasov 2016	Sabra 2 meses de edad	30 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>📉 Preferencia de sacarina semana 2 y 3</li> <li>● Preferencia de sacarina semana 4 y 5</li> <li>📉 Locomoción en campo abierto</li> <li>● Desempeño en laberinto elevado</li> </ul>
BDNF and COX-2 participate in anti-depressivemechanisms of catalpol in rats undergoing chronic unpredictable mild stress	Wang, J. et al.,2015	Sprague-Dawley machos adultos	35 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>📉 Corticosterona</li> <li>📈 BDNF en hipocampo y Cx frontal</li> <li>📈 COX2, mRNA y PGE2 en hipocampo y Cx frontal</li> </ul>
Does Chronic Unpredictable Stress during Adolescence Affect Spatial Cognition in Adulthood?	Chaby, et al., 2015	Sprague-Dawley machos adultos	40 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Aprendizaje espacial</li> <li>📉 Retención espacial</li> <li>📉 Incorporación de información espacial</li> <li>📈 Latencia a encontrar plataforma en laberinto acuático de Morris</li> </ul>
An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice	Monteiro, S. et al., 2015	C57BL/6 machos	56 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Peso corporal</li> <li>● Peso del timo</li> <li>📈 Peso glándula adrenal</li> <li>📈 Corticosterona</li> <li>📈 Tiempo en brazos cerrados en laberinto elevado</li> <li>● Distancia en campo abierto</li> <li>● Erguimientos en campo abierto</li> <li>📈 Inmovilidad en nado forzado</li> <li>📈 Inmovilidad en suspensión de cola</li> <li>📉 Memoria espacial en laberinto acuático de Morris</li> <li>📈 Timocitos y células linfoides</li> </ul>

**Nota:** 📉 Indica un decremento de la conducta/proceso/función. 📈 Indica un aumento en la conducta/proceso/función. ● Indica que no hay cambios en la conducta/proceso/función. DA – Dopamina, NA- noradrenalina, BDNF- Factor neurotrófico derivado del cerebro, Cx- corteza, COX-ciclooxigenasa, PGE-Prostaglandina

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Cuando se investiga la respuesta de estrés, nos topamos con múltiples panoramas que no son muy claros, desde la misma concepción de estrés, hasta la conceptualización de sus efectos, protocolos y tiempos de exposición. Actualmente la investigación en estrés ha ido creciendo, particularmente en estrés crónico ha aumentado el número de artículos publicados, laboratorios y países que trabajan este tema. Este crecimiento ha buscado describir las bases biológicas de los efectos conductuales del estrés crónico, sin embargo, las nuevas investigaciones parten de las bases que se han planteado anteriormente, y se siguen arrastrando conceptos y protocolos que tienen un sustento débil, es decir, se retoman las dificultades de conceptualizar al estrés crónico y sus tiempos de exposición. Particularmente los tiempos de exposición se han definido haciendo uso de palabras como “breve exposición” o “exposiciones prolongadas”, y si bien esto nos da una idea general, no nos indica en términos reales cuánto dura la exposición a estrés. Este fallo en la conceptualización ha dejado un agujero abierto a la interpretación y como consecuencia no tenemos claridad cuando se construye o aplica un protocolo de estrés, en este caso centrándome en el estrés crónico. Por ejemplo, la investigación en este tema presenta paradigmas de exposición que van desde los 10 y hasta más de 56 días de estrés en modelos animales, sin justificar la temporalidad que aplican en su protocolo, y los que, si la justifican sus citas regresan hasta antes de los años 90 donde el protocolo recién se estaba construyendo y puliéndose. Entonces, tenemos investigación muy reciente con metodología muy antigua que se construyó sin la exploración y estandarización adecuada.

## **JUSTIFICACIÓN**

Los modelos de CMS no están libres de limitaciones. Uno de sus principales problemas que no se ha atendido, es la exposición a estrés prolongada que puede atravesar las barreras de las normas éticas en modelos animales (De Felipe et al., 1989). Otra de las limitaciones más grandes del CMS es la dificultad de replicar resultados. Esto se cree que surge de dificultades objetivas para repetir procedimientos fiables durante un largo periodo. Esto crea grandes variaciones en datos producidos por diferentes laboratorios que siguen el mismo protocolo (Yin et al., 2016).

Esto sugiere que hace falta una estandarización más rigurosa del procedimiento y debido a las diferentes metodologías que se utilizan en estrés crónico, buscamos plantear un protocolo basado en evidencia empírica buscando rangos temporales mucho más acotados que los que actualmente tenemos. Por lo que es necesario explorar los tiempos de exposición para clarificar

los efectos que provoca mayor o menor tiempo de exposición a estrés, por medio de una curva tiempo-efecto y aportar datos que permitan mejorar los aspectos para el estudio del estrés.

Por otro lado, existen dificultades que se enmarcan dentro del contexto social; la población que está expuesta a diferentes condiciones estresantes (p.j. laborales, familiares, económicas, etc.) provoca constantes respuestas de estrés con las que su sistema debe lidiar y como es esperado en algunos casos esta exposición continua desencadena alguna patología. Por ello es necesario tratar de definir en qué punto esa exposición continua podría estar afectando al individuo y una primera aproximación se puede dar desde la investigación básica. En este sentido, es importante identificar el punto en el que se comienzan a presentar las alteraciones por estrés y prevenir estos cambios. Bajo estos argumentos, comenzamos esta investigación.

## **OBJETIVO**

- Identificar en qué ventana temporal los cambios conductuales generados por la exposición a CMS se relacionan con los efectos esperados por este modelo.

## **HIPÓTESIS**

- Los cambios conductuales que ejerce la ventana de 5 días de exposición a CMS mimetiza de una manera más efectiva los modelos de CMS.
- Los cambios conductuales que ejerce la ventana de 10 días de exposición a CMS mimetiza de una manera más efectiva los modelos de CMS.
- Los cambios conductuales que ejerce la ventana de 14 días de exposición a CMS mimetiza de una manera más efectiva los modelos de CMS.
- Los cambios conductuales que ejerce la ventana de 21 días de exposición a CMS mimetiza de una manera más efectiva los modelos de CMS.

## **MÉTODO**

### **1. Sujetos**

Ochenta y cuatro ratas Wistar macho provenientes del bioterio de la Facultad de Psicología de la U.N.A.M. Con una edad de 3 meses al inicio del experimento, con un peso aproximado de 250-300 grs al inicio del experimento. En condiciones estándar de laboratorio, agua ad libitum y alimento controlado rat chow, con ciclo de luz oscuridad (12:12), en cajas comunales (4-5 sujetos por caja). El trato, así como los procedimientos aquí mencionados se hicieron bajo los estándares

de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

## 2. Batería de estrés crónico impredecible

Se aplicó una batería de estrés crónico impredecible (CMS), que ha sido estandarizada para su uso en el laboratorio de Neuropsicofarmacología y Estimación Temporal de la U.N.A.M. (Rosemberg-García, et al., 2013; Ruiz-García, et al., 2013; Sánchez-Castillo, et al., 2015). Consta de 10 días de exposición a diversos estresores de manera aleatoria (ver Tabla 2). Los estresores consisten en 20 minutos de restrictor de movimiento, 3 horas de cama mojada, 12 horas de luz prendida durante la noche, 3 horas de cama inclinada, 5 minutos de inmersión en agua fría a 16°C y 12 horas de privación de agua de noche. Las ratas control (no expuestas al paradigma de estrés) fueron almacenadas en cajas diferentes, sin contacto con los animales estresados.

La CMS se extenderá en cuatro ventanas de duración, 5, 10 (Rosemberg-García, et al., 2013; Ruiz-García, et al., 2013; Sánchez-Castillo, et al., 2015), 14 (Campos et al., 2013) y 21 (Lee & Goto, 2015) días para cada grupo respectivamente.

*Tabla 2*

*Descripción de la Batería de estrés crónico impredecible CMS*

Día	Paradigma
1	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
2	Cama mojada 3 h (12:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
3	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
4	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
5	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
6	Cama mojada 3 h (12:00h); Privación de agua noche 12h (20:00h)
7	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
8	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
9	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
10	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)

*Nota: Protocolo estandarizado en el laboratorio de Neuropsicofarmacología y Estimación Temporal, Facultad de Psicología UNAM. (Rosemberg-García, et al., 2013; Ruiz-García, et al., 2013; Sánchez-Castillo, et al., 2015).*

Las modificaciones de la batería para las distintas ventanas temporales se realizaron de la siguiente forma:

En el caso de la ventana de 5 días de exposición (CMS 5), se redujo el número de días, pero se mantuvo el mismo número de estresores, tipo, aplicación y se semialeatorizó (con la regla de que estresores del mismo tipo, no se repitieran en días consecutivos) (ver Tabla 3).

*Tabla 3*

*Descripción de la batería de CMS de 5 días de exposición*

<b>Día</b>	<b>CMS 5</b>
<b>1</b>	Cama mojada 3 h (12:00h); Privación de agua noche 12h (20:00h)
<b>2</b>	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
<b>3</b>	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
<b>4</b>	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
<b>5</b>	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)

*Nota: Protocolo CMS modificado para su aplicación durante 5 días.*

En el caso de la ventana de exposición de 10 días (CMS 10), se mantuvo el diseño estandarizado en el laboratorio (ver Tabla 4).

*Tabla 4*

*Descripción de la batería de CMS de 10 días de exposición*

<b>Día</b>	<b>CMS 10</b>
<b>1</b>	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
<b>2</b>	Cama mojada 3 h (12:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
<b>3</b>	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
<b>4</b>	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
<b>5</b>	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
<b>6</b>	Cama mojada 3 h (12:00h); Privación de agua noche 12h (20:00h)
<b>7</b>	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
<b>8</b>	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
<b>9</b>	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
<b>10</b>	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)

*Nota: Protocolo estandarizado en el laboratorio de Neuropsicofarmacología y Estimación Temporal, Facultad de Psicología UNAM. (Rosemberg-García, et al., 2013; Ruiz-García, et al., 2013; Sánchez-Castillo, et al., 2015).*

En el caso de la ventana de exposición de 14 días (CMS 14) y 21 días (CMS 21) se modificó el protocolo CMS prolongando el número de días para alcanzar la ventana temporal objetivo. Se evitó exponer a los animales al mismo estresor en días consecutivos para evitar habituación durante la exposición (ver Tabla 5 y Tabla 6).

Tabla 5

Descripción de la batería de CMS de 14 días de exposición

Día	CMS 14
1	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
2	Cama mojada 3 h (12:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
3	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
4	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
5	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
6	Cama mojada 3 h (12:00h); Privación de agua noche 12h (20:00h)
7	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
8	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
9	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
10	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
11	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
12	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
13	Cama mojada 3 h (12:00h); Privación de agua noche 12h (20:00h)
14	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)

*Nota: Protocolo CMS modificado para su aplicación durante 14 días.*

Tabla 6

Descripción de la batería de CMS de 21 días de exposición

Día	CMS 21
1	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
2	Cama mojada 3 h (12:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
3	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
4	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
5	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
6	Cama mojada 3 h (12:00h); Privación de agua noche 12h (20:00h)
7	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
8	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
9	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
10	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
11	Cama mojada 3 h (12:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
12	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
13	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
14	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
15	Cama mojada 3 h (12:00h); Privación de agua noche 12h (20:00h)
16	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
17	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00)
18	Agua Fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
19	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)
20	Cama mojada 3 h (12:00h); Privación de agua noche 12h (20:00h)
21	Restrictor 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h)

*Nota: Protocolo CMS modificado para su aplicación durante 21 días.*

De manera general, los grupos se conformaron de forma aleatoria y se identificaron de la siguiente forma:

- CMS 5 (n=10)
- CMS 10 (n=9)
- CMS 14 (n=10)
- CMS 21 (n=9)

### **3. Pruebas Conductuales**

- **Laberinto de Barnés (LB)**

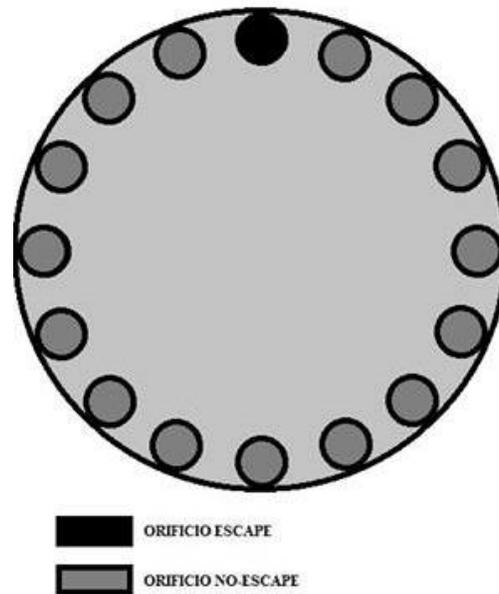
Las características del laberinto son:

- 95 cm (diámetro).
- 70 cm (elevación desde suelo).
- 16 agujeros de 4cm (diámetro), con un espacio de 4cm entre agujero.

Esta prueba permite estudiar el aprendizaje y la memoria espacial, así como otras tareas más complejas en ratas y ratones (Pompl, 1999). Consiste en un laberinto donde se utiliza luz como estímulo aversivo. El refuerzo que recibe el animal es escapar de este estímulo. Se coloca debajo de un solo agujero, el agujero de escape, este se utiliza para escapar de los estímulos aversivos, también se coloca debajo de los demás agujeros cajones falsos en los que parece posible introducirse, pero cuyo espacio disponible es en realidad tan pequeño que impide que el animal se pueda esconder (*Figura 5*).

Consta de 4 fases:

1. *Habitación a la plataforma (Llevar al animal al agujero de escape y dejarle permanecer durante 2 min.)*
2. *Entrenamiento (4 ensayos de 3 min cada uno con un intervalo entre ensayos de 15 minutos)*
3. *Segunda sesión de entrenamiento (4 ensayos de 3 min cada uno con intervalo entre ensayos de 15 minutos)*
4. *Fase de evaluación (4 ensayos 3 min cada uno con intervalo entre ensayos de 15 minutos; 12hrs. o 24hrs. después; se registra latencia de escape y frecuencia de errores)*



*Figura 5. Laberinto de Barnes. Esquema de la plataforma del laberinto, con orificios de escape y no escape. Se registra la frecuencia de errores y la latencia al escape.*

- **Campo Abierto (CA)**

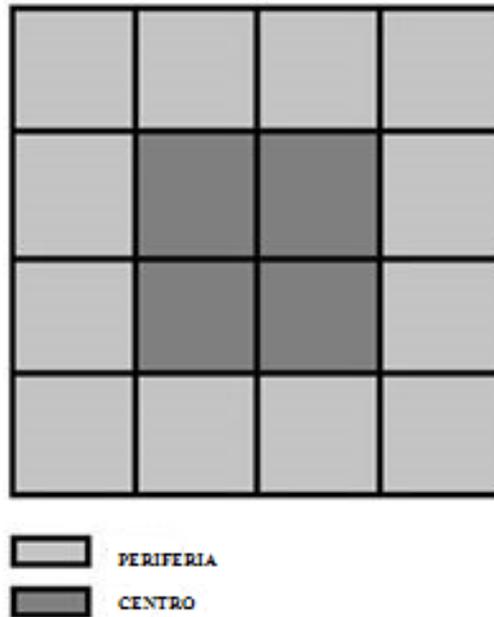
Las características de esta prueba son:

- Arena de 100 cm x 100 cm x 50 cm; largo x ancho x altura

Prueba de conducta libre que evalúa aspectos locomotores, de exploración y de ansiedad (Sestakova et al., 2013). Es una caja de policarbonato de color negro, dividida en 16 cuadrantes equidistantes (4x4) (*Figura 6*).

Se hacen mediciones durante 5 min en una sola sesión. Se coloca al sujeto en el centro del campo (zona central) y se graba la sesión para su análisis posterior. El registro conductual se hace en bins de 30 segundos y se mide:

- Cruces Periferia (frecuencia)
- Cruces centro (frecuencia)
- Inmovilidad (frecuencia y tiempo)
- Congelamiento (frecuencia y tiempo)
- Acicalamiento (frecuencia y tiempo)
- Erguimiento (frecuencia)



*Figura 6. Campo abierto- se muestra la cuadrícula y las zonas (central o periférica) por las que la rata puede pasar. Se registran cruces, inmovilidad, congelamiento, acicalamiento y erguimiento del animal. Estas conductas tienen su interpretación para la evauación de locomoción general y ansiedad.*

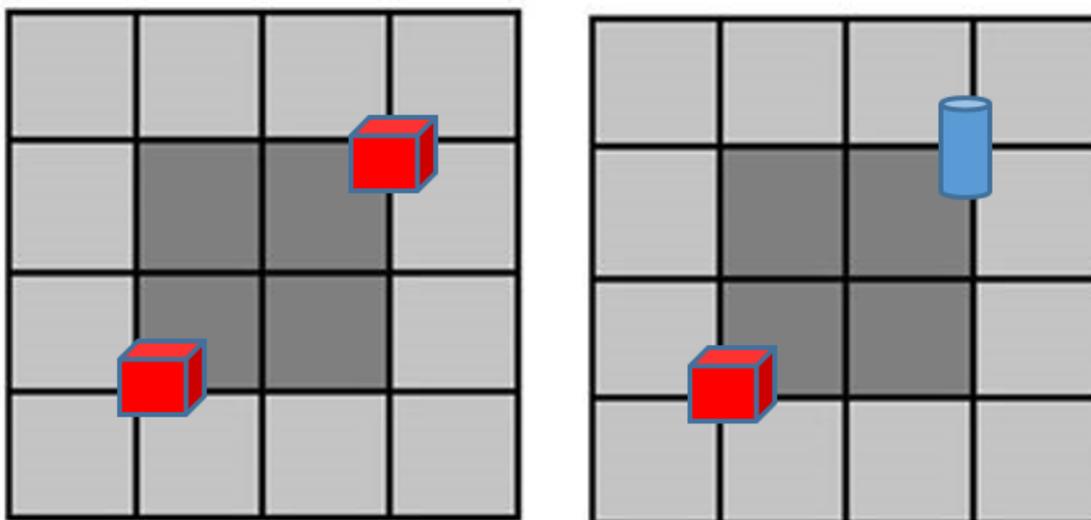
- **Reconocimiento de Objetos Novedosos (RdO)**

Las características de la prueba y los objetos que se utilizan son:

- Arena de campo abierto (*Figura 6*)
- Dos cubos de madera (6 cm x 6 cm x 6 cm, largo x ancho x altura) pintados con pintura acrílica roja.
- Una taza de porcelana color naranja (8.5 cm x 7.5 cm, diámetro x altura).

Esta tarea permite evaluar la memoria de reconocimiento de las ratas y está conformada por cuatro sesiones (Cohen & Stackman., 2015). La primera sesión es de habituación en la caja sin objetos para prevenir neofobia; se coloca al sujeto en el centro de la caja y se le permite la exploración. En la segunda y tercera sesión se le permite al sujeto la exploración de dos objetos idénticos (cubos de madera de 6 cm x 6 cm color rojo) ubicados de forma equidistante en esquinas opuestas de la caja. La cuarta, y última, sesión consiste en la exposición del sujeto a uno de los objetos conocidos (cubo rojo de madera) y otro distinto. Las sesiones se realizaron cada 24 horas, cada una de ellas con duración de 5 minutos. Los objetos se colocaron en esquinas contrarias a 25 cm de distancia de las paredes de la arena de campo abierto contrabalanceando la posición en cada una de las evaluaciones conductuales e intrasujetos, se adhirieron a la caja para

evitar que los sujetos las movieran (Figura 7). Se grabaron las sesiones para su posterior análisis. Se toma en cuenta el tiempo que permanece explorando cada uno de los objetos (objeto familiar y novedoso) en la sesión cuatro. Se considera como exploración que la nariz se encuentre a una distancia  $\geq 1$ cm del objeto o tocando el mismo. Con las medidas registradas en la sesión cuatro de esta tarea se obtiene un Índice de Discriminación que se obtiene a partir de la siguiente fórmula:  $(ON - OF) / (ON + OF)$ , donde: **ON** corresponde al tiempo que exploran el objeto novedoso y **OF** corresponde al tiempo que pasan explorando el objeto familiar.



*Figura 7. Reconocimiento de Objetos Novedosos*  
*Esquema de la posición de los objetos en la tarea de Reconocimiento de Objetos Novedosos.*  
*Se registra el tiempo de exploración en cada objeto. Lado izquierdo representa sesión 2 y 3.*  
*Lado derecho representa sesión 4 (Prueba)*

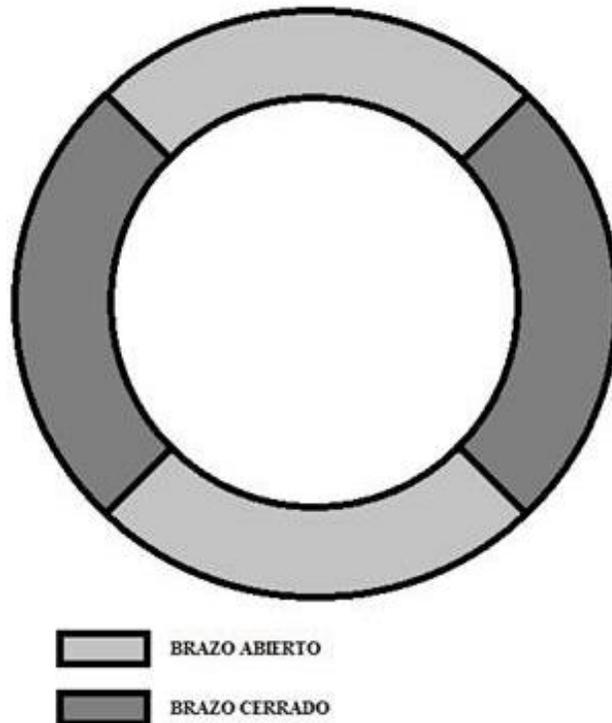
- **Laberinto Cero Elevado (LC)**

Las características de esta prueba son:

- 120 cm (diámetro).
- 64 cm (elevación desde suelo).

Es una modificación del laberinto en cruz elevado y es una prueba que mide ansiedad en los animales (Sestakova et al., 2013). Consta de una plataforma circular elevada con dos partes cerradas (por paredes laterales) y otras dos abiertas (sin paredes laterales) (Figura 8). Para iniciar, se coloca al sujeto en un brazo cerrado y se graba la sesión para su posterior análisis.

Se mide durante 5 minutos la permanencia de la rata en cada área (cerrada o abierta), así como la frecuencia de entradas a un área diferente del laberinto y la conducta de evaluación de riesgo.



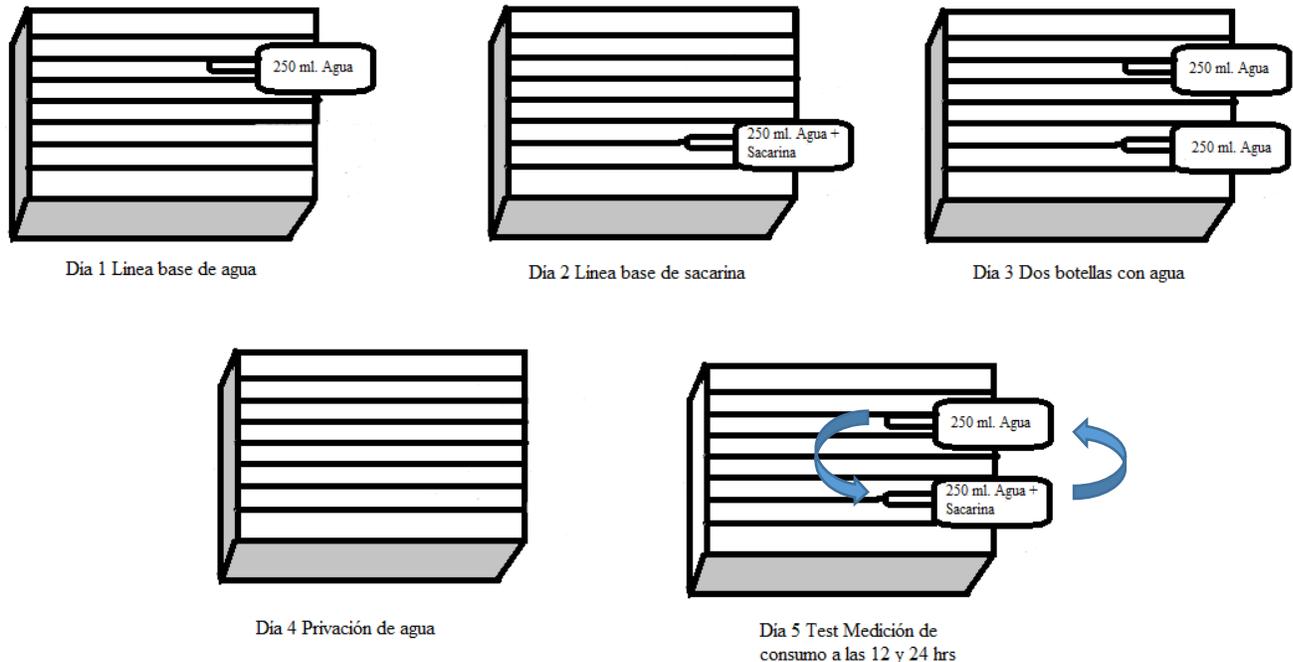
*Figura 8. Laberinto Cero Elevado – Muestra las áreas abiertas (Brazo abierto) y las áreas cerradas (Brazo cerrado). Se registran los cruces a brazo abierto y a brazo cerrado; el tiempo de permanencia en cada brazo y la evaluación de riesgo.*

- **Prueba de preferencia de Sacarina (PdS)**

Prueba que mide el consumo y preferencia de soluciones dulces altamente palatables y el decremento de esta conducta se interpreta como conductas tipo-depresivas en los roedores (Wilner, 2017; Willner et al., 1987). Su aplicación se realiza durante 5 días consecutivos (Figura 9):

1. Día 1 – Línea base de consumo de agua duración 24 horas, se coloca a las 18:00 horas (Botella con 250 ml de agua)
2. Día 2 - Se retira la botella con agua del día 1 a las 18:00 horas y se realiza la línea base de consumo de sacarina con duración de 24 horas, se coloca a las 18:00 horas (en cuanto se retira la botella de agua; 250 ml de agua con sacarina (3 gr/L))
3. Día 3 – Se retira la botella de agua con sacarina del día 2 a las 18:00 horas y se espera 1 hora para poder colocar a las 19:00 horas dos botellas con agua (250 ml cada una) y se retiran a las 20:00 horas para comenzar un periodo de privación de agua de 24 horas.

4. Día 4 – Continúa la privación de agua hasta las 20:00 horas. En cuanto termina la privación de agua se coloca una botella con agua y una de agua con sacarina (250 ml cada una a las 20:00 horas)
5. Día 5 – Se realiza la primera medición a las 12 horas (8:00 horas), se cambian de lado las botellas de cada rata y se hace una segunda medición a las 24 horas (20:00 horas)



*Figura 9 – Procedimiento de Preferencia de Sacarina. Se registra la línea base de consumo de agua y de sacarina durante el día 1 y 2. El día 3 se presentan dos botellas con agua para habituar al roedor a la presencia de dos botellas en su casa hogar. El día 4 inicia la privación de agua para aumentar la motivación al consumo durante la prueba. El día 5 inicia la prueba de preferencia y se miden los consumos de ambas botellas una vez en la mañana y otra en la noche. Después de la primera medición se invierten las botellas para evitar un consumo sesgado a la ubicación de la botella.*

### **Diseño Experimental**

Los sujetos permanecieron durante 5 días en el bioterio para que se habituaran al nuevo ambiente de vivienda y para tomar la línea base de peso. Posteriormente fueron manipulados durante 5 minutos cada uno durante 5 días antes del inicio del experimento y se comenzó con la restricción de alimento (1hr/día), monitoreando el peso para no disminuir más allá del 85% de su línea base. Esto con el motivo de asegurar que las ratas pudieran introducirse en los tubos de restricción de movimiento en los grupos de exposición a estrés (CMS) y en los grupos control (CTRL) para mantener las mismas condiciones. Después, los sujetos fueron asignados aleatoriamente a 1





que la presentación de los estresores de forma aleatoria no modificaba los efectos inducidos por el CMS y con esta lógica se construyó la ventana de 5 días de exposición.

## **II. Formación del grupo control general (CTRL)**

Se utilizó un grupo control por cada ventana de exposición con la intención de esclarecer si la edad al momento de la evaluación o si el orden de las pruebas tenía un efecto en la conducta de los sujetos.

Los grupos se formaron aleatoriamente y se identificaron de la siguiente forma:

- CTRL 5 (n=9)
- CTRL 10 (n=9)
- CTRL 14 (n=8)
- CTRL 21 (n=9)

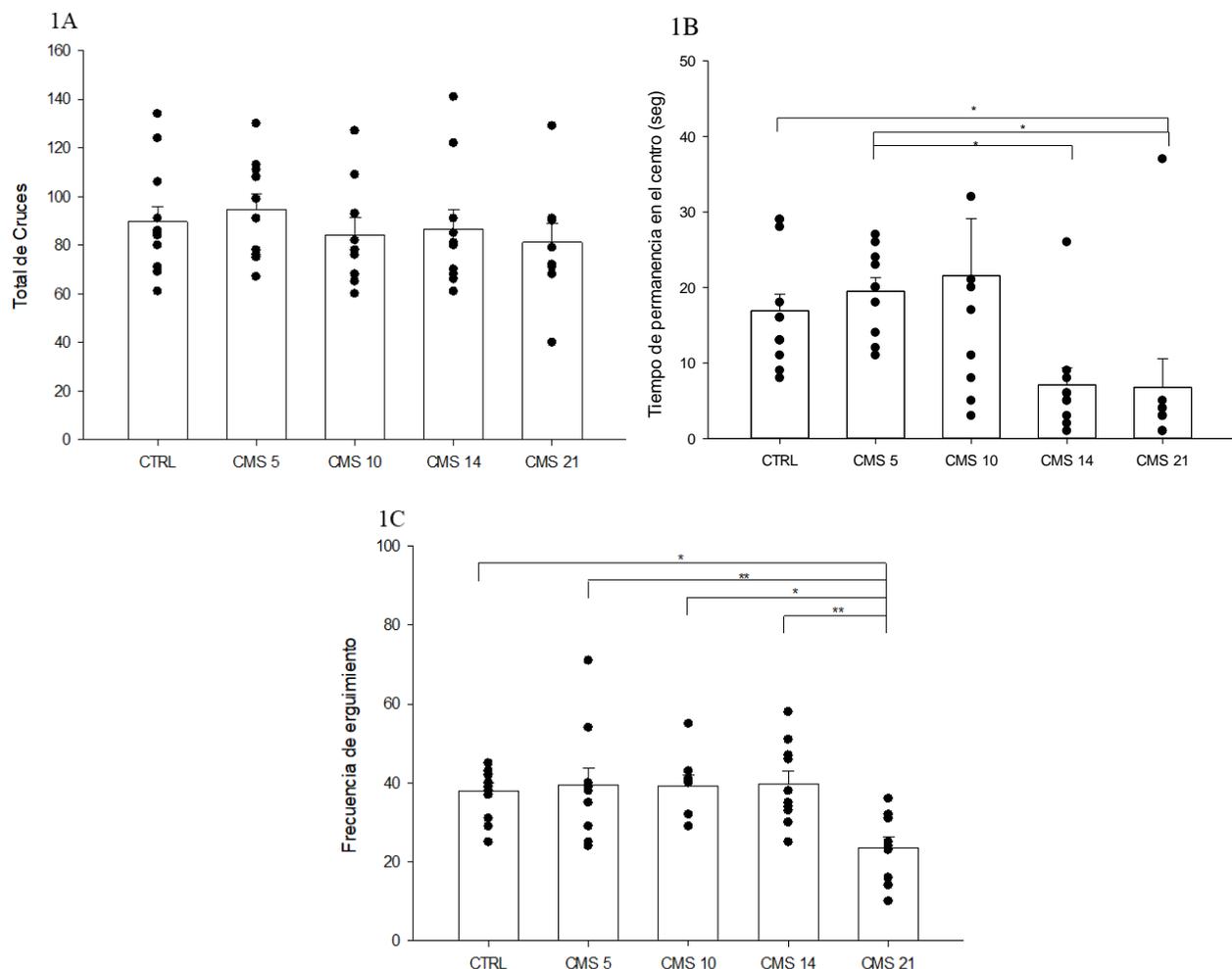
Posteriormente se compararon los resultados entre grupos control. El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas en las conductas de todas las pruebas entre los grupos control (ver Anexo 1), excepto por la frecuencia de acicalamiento en campo abierto ( $H[3]=16.818$ ,  $p < 0.05$ ) donde el análisis a posteriori con el método de Dunn indicó que las diferencias se encontraban entre CTRL 10 vs CTRL 14 ( $p < 0.05$ ) y CTRL 10 y CTRL 21 ( $p < 0.05$ ). Debido a que la conducta de acicalamiento mostraba diferencias entre grupos control, no se tomó en cuenta para la comparación con los grupos experimentales (de exposición a estrés), sin embargo, dado que las demás conductas no presentaron diferencias estadísticamente significativas, esto nos indicó que la edad y el orden de las pruebas conductuales no son variables que modifiquen los resultados de la evaluación. Por lo tanto, como los grupos control no eran diferentes entre sí, se hizo un muestreo aleatorio estratificado donde se tomaron los datos de 3 ratas de cada grupo control y se formó un grupo control general (CTRL) que constó de 12 ratas que por sus características (incluía sujetos de todas las edades y con diferente orden de aplicación de las pruebas) fueron las que se compararon contra cada ventana de exposición de estrés.

## **III. Comparación control general y grupos de exposición a CMS**

- **Resultados Campo Abierto**

**Total de cruces, tiempo de permanencia en el centro y frecuencia de erguimiento**

Con respecto al total de cruces en el campo, el análisis de Kruskal Wallis de una vía (tiempo de exposición) indicó que no existen diferencias significativas entre los grupos ( $H[4,45]=2.341$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 1; Figura 1A*). También indicó que hay diferencias entre grupos en el tiempo de permanencia en el centro ( $H[4,45] =20.389$ ,  $p < 0.05$ ), y el análisis a posteriori con el método de Dunn indicó que esas diferencias eran significativas entre CMS 5 y CMS 21 ( $p < 0.05$ ), CMS 5 y CMS 14 ( $p < 0.05$ ) y CTRL vs CMS 21 ( $p < 0.05$ ). Para la conducta de erguimiento el ANOVA de una vía (tiempo de exposición) indicó diferencias significativas entre los grupos ( $F[4,45]=4.654$ ,  $p < 0.05$ ), posteriormente la prueba post-hoc Tukey señaló que las diferencias existían entre CMS 14 vs CMS 21 ( $p < 0.05$ ), CMS 5 vs CMS 21 ( $p < 0.05$ ), CMS 10 vs CMS 21 ( $P < 0.05$ ) y CTRL vs CMS 21 ( $P < 0.05$ ) (*Panel 1; Figura 1C*).



*Panel 1 –Evaluación de motricidad general y de conductas tipo-ansiedad en campo abierto. Total de cruces (Figura 1A); Tiempo de permanencia en el centro del campo (Figura 1B); Frecuencia de erguimiento (Figura 1C). Los grupos de estrés se identificaron de la siguiente manera: CMS 5 (5 días de exposición a CMS), CMS 10 (10 días de exposición a CMS), CMS 14*

(14 días de exposición a CMS) y CMS 21 (21 días de exposición a CMS), mientras que el grupo control se identificó con CTRL. La significancia se marcó de la siguiente forma: \* ( $P < 0.05$ ); \*\* ( $P < 0.01$ ) y \*\*\* ( $P < 0.001$ ). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.

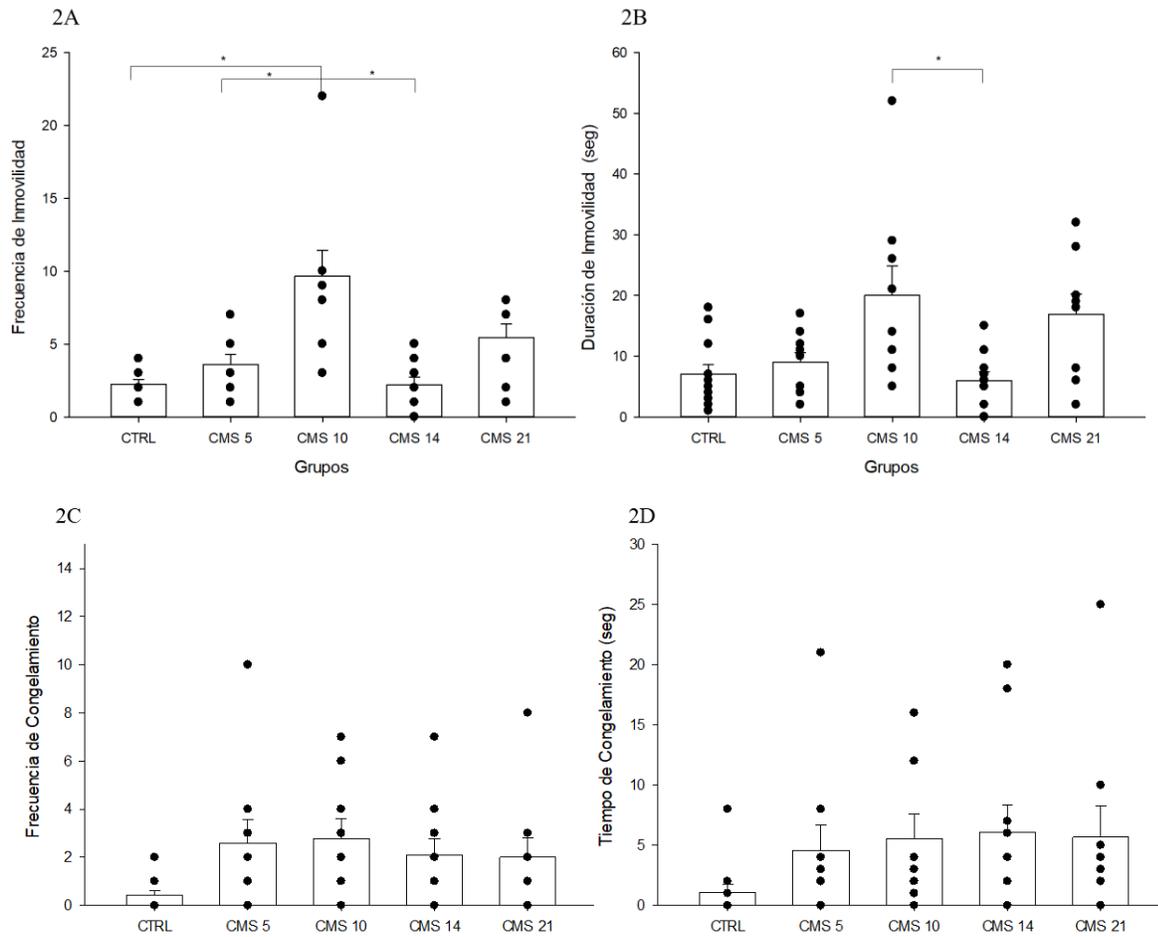
Tabla 10

EVALUACIÓN	CONDUCTA	PRUEBA	POST-HOC	Comparaciones significativas	
	Cruces totales	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	...	...	
CA	Permanencia en centro	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	MÉTODO DE DUNN	CMS 5	CMS 21
				CMS 5	CMS 14
				CTRL	CMS 21
	Erguimiento	ANOVA DE UNA VÍA	PRUEBA DE TUKEY	CMS 21	CMS 5 CMS 10 CMS 14 CTRL

Nota: Resumen de las comparaciones estadísticas en Campo Abierto para las conductas: cruces totales, permanencia en centro y erguimiento.

**Inmovilidad (frecuencia y duración), Congelamiento (frecuencia y duración) y Acicalamiento (frecuencia y duración).**

En el caso de la frecuencia de inmovilidad el análisis con Kruskal-Wallis de una vía (tiempo de exposición) indicó diferencias significativas entre los grupos ( $H[4,45]=22.958$ ,  $p < 0.05$ ), el análisis post-hoc con el método de Dunn indicó que las diferencias se encontraban entre CMS 10 vs CMS 14 ( $p < 0.05$ ), CMS 10 vs CTRL ( $p < 0.05$ ), CMS 10 vs CMS 5 ( $p < 0.05$ ) (Panel 2; Figura 2A) y para la duración de la inmovilidad el análisis con Kruskal-Wallis de una vía (tiempo de exposición) indicó diferencias significativas entre los grupos ( $H[4,45]=15.044$ ,  $p < 0.05$ ), posteriormente el análisis post-hoc con el método de Dunn indicó diferencias entre CMS 10 vs CMS 14 ( $p < 0.05$ ) (Panel 2; Figura 2B). Con respecto al congelamiento, el análisis con Kruskal-Wallis de una vía (tiempo de exposición) indicó que había diferencias significativas entre los grupos en frecuencia de congelamiento ( $H[4,45]=10.045$ ,  $p > 0.05$ ), sin embargo, el análisis a posteriori con el método de Dunn indicó que las diferencias no eran significativas entre CMS 10 y CTRL ( $p > 0.05$ ) (Panel 2; Figura 2C), tampoco hubo diferencias significativas en la duración del congelamiento ( $H[4,45]=8.288$ ,  $p > 0.05$ ) (Panel 2; Figura 2D).



*Panel 2 – Evaluación de conductas tipo-ansiedad por diferentes ventanas de exposición a CMS en campo abierto. Frecuencia de inmovilidad (Figura 2A); Tiempo de inmovilidad (Figura 2B); Frecuencia de Congelamiento (Figura 2C); Tiempo de congelamiento (Figura 2D). La significancia se marcó de la siguiente forma: \* ( $P < 0.05$ ); \*\* ( $P < 0.01$ ) y \*\*\* ( $P < 0.001$ ). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.*

Tabla 11

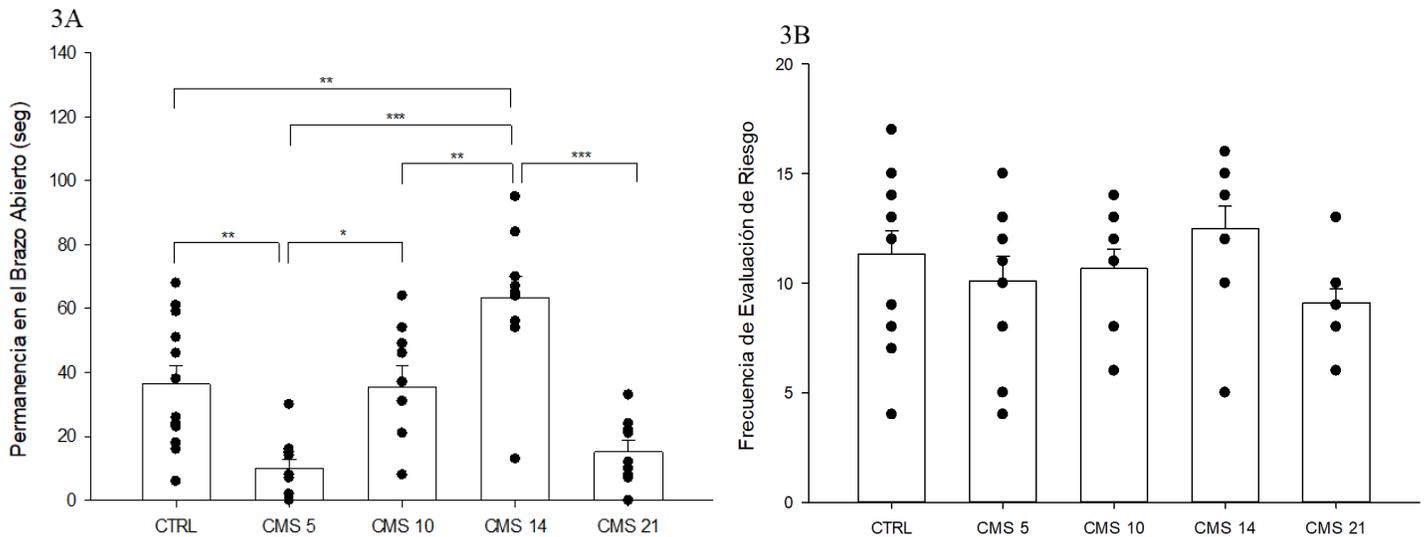
EVALUACIÓN	CONDUCTA	PRUEBA	POST-HOC	Comparaciones significativas	
CA	Frecuencia de inmovilidad	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	MÉTODO DE DUNN	CMS 10	CMS 14 CMS 5 CTRL
	Duración de inmovilidad	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	MÉTODO DE DUNN	CMS 10	CMS 14
	Frecuencia de congelamiento	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	MÉTODO DE DUNN	...	...
	Duración de congelamiento	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	...	...	...

*Nota: Resumen de las comparaciones estadísticas en Campo Abierto para las conductas: inmovilidad (frecuencia y duración) y congelamiento (frecuencia y duración).*

- **Resultados Laberinto en Cero Elevado**

**Permanencia en brazo Abierto, Cruce a Brazo Abierto y Evaluación de Riesgo**

El ANOVA de una vía (tiempo de exposición) indicó que había diferencias entre los grupos en la permanencia en el brazo abierto ( $F[4,45]= 14.578$ ,  $p < 0.05$ ), posteriormente el análisis post-hoc con la prueba de Tukey indicó que las diferencias se encontraban entre CMS 14 vs CMS 5 ( $p < 0.05$ ), CMS 14 vs CMS 21 ( $p < 0.05$ ), CMS 14 vs CMS 10 ( $p < 0.05$ ), CMS 14 vs CTRL ( $p < 0.05$ ), CTRL vs CMS 5 ( $p < 0.05$ ) y CMS 10 vs CMS 5 ( $p < 0.05$ ) (*Panel 3; Figura 3A*). Por último, el ANOVA de una vía (tiempo de exposición) indicó que no había diferencias significativas entre los grupos en la frecuencia de evaluación de riesgo ( $F[4,45]= 1.608$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 3; Figura 3B*).



Panel 3 – Evaluación de conductas tipo- ansiedad en laberinto en cero elevado. Permanencia en Brazo Abierto (Figura 3A) y Frecuencia de Evaluación de Riesgo (Figura 3C). La significancia se marcó de la siguiente forma: \* ( $P < 0.05$ ); \*\* ( $P < 0.01$ ) y \*\*\* ( $P < 0.001$ ). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.

Tabla 12

EVALUACIÓN	CONDUCTA	PRUEBA	POST-HOC	Comparaciones significativas
LC	Permanencia en brazo abierto	ANOVA DE UNA VÍA	TUKEY	CMS 5
				CMS 10
				CMS 21
				CTRL
				CMS 10
				CTRL
	Evaluación de riesgo	ANOVA DE UNA VÍA	...	...

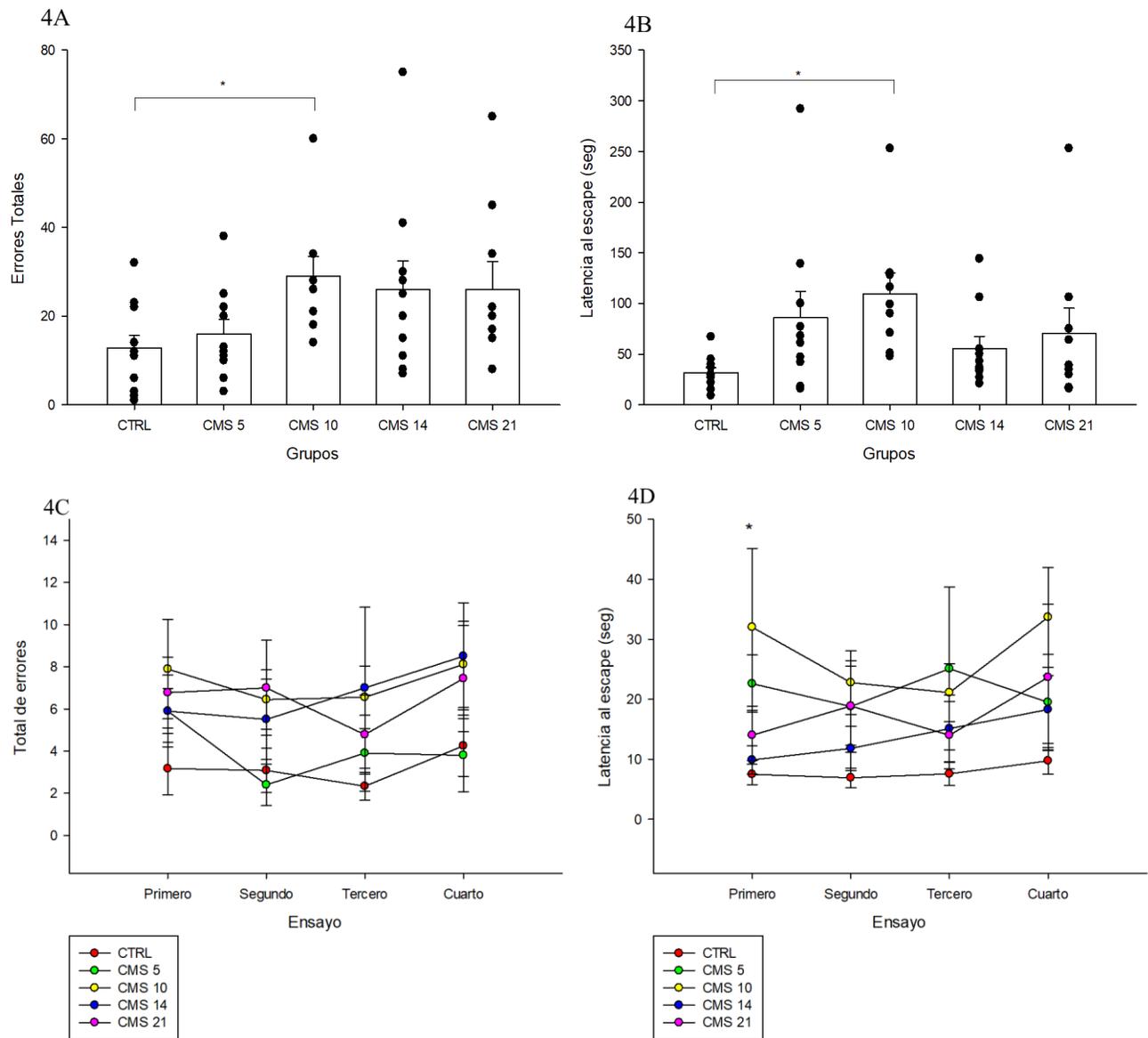
Nota: Resumen de las comparaciones estadísticas en Laberinto Cero Elevado para las conductas permanencia en brazo abierto y evaluación de riesgo.

### • Resultados Laberinto de Barnés

#### Errores Totales y Latencia al Escape

El análisis con Kruskal-Wallis de una vía (tiempo de exposición) indicó que había diferencias significativas en el total de errores ( $H[4,45] = 10.286$ ,  $p < 0.05$ ), posteriormente el análisis con el método de Dunn indicó que la diferencia se encontraba en la comparación entre CTRL y CMS 10 ( $p < 0.05$ ) (Panel 4; Figura 4A), además, el análisis con Kruskal-Wallis de una vía (tiempo de exposición) mostró diferencias significativas en la latencia al escape ( $H[4,45] = 15.450$ ,  $p < 0.05$ ), posteriormente se analizó con el método de Dunn, y nos indicó diferencia significativa en la

comparación entre CMS 10 vs CTRL ( $p < 0.05$ ) (*Panel 4; Figura 4B*). Posteriormente se hizo un análisis de errores y latencia al escape por ensayo, el análisis con Kruskal-Wallis de una vía (tiempo de exposición) reveló que no había diferencias significativas entre los errores de cada grupo en el primer ensayo ( $H[4,45]= 7.373$ ,  $p > 0.05$ ), el segundo ( $H[4,45]= 8.605$ ,  $p > 0.05$ ), tercero ( $H[4,45]= 5.621$ ,  $p > 0.05$ ) ni el cuarto ensayo ( $H[4,45]= 7.599$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 4; Figura 4C*). Pero para la latencia al escape, el análisis con Kruskal-Wallis de una vía (tiempo de exposición) indicó diferencias solamente en el primer ensayo ( $H[4,45]= 13.796$ ,  $p < 0.05$ ) y el análisis post hoc con el método de Dunn reveló que la diferencia existía entre el grupo CTRL vs CMS 10 ( $p < 0.05$ ), para el resto de los ensayos el análisis con Kruskal-Wallis de una vía (tiempo de exposición) no mostró diferencias significativas (para el segundo ( $H[4,45]= 9.093$ ,  $p > 0.05$ ), el tercero ( $H[4,45]= 6.546$ ,  $p > 0.05$ ) ni el cuarto ensayo ( $H[4,45]= 6.878$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 4; Figura 4D*).



Panel 4 – Evaluación de memoria espacial en laberinto de barnés. Errores Totales (Figura 4A), Latencia al Escape (Figura 4B), Total de errores por ensayo (Figura 4C) y Latencia al escape por ensayo (Figura 4D). La significancia se marcó de la siguiente forma: \* ( $P < 0.05$ ); \*\* ( $P < 0.01$ ) y \*\*\* ( $P < 0.001$ ). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.

Tabla 13

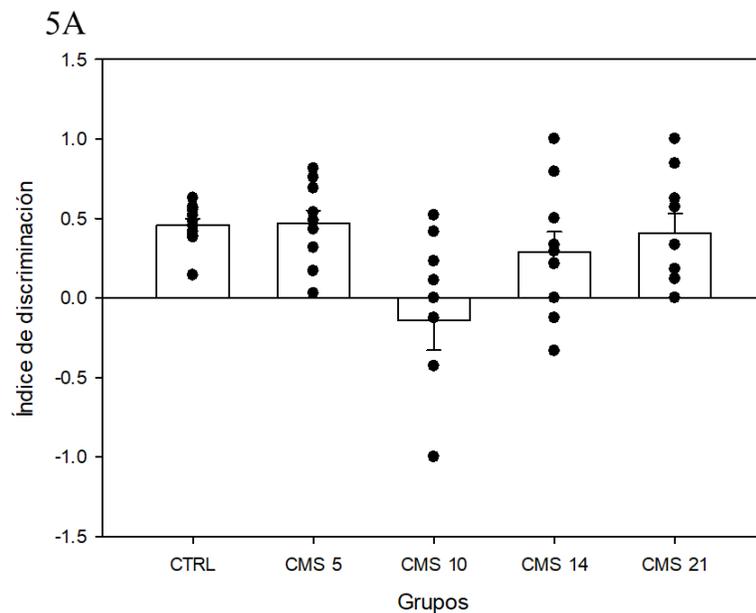
EVALUACIÓN	CONDUCTA	PRUEBA	POST-HOC	Comparaciones significativas	
LB	Errores	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	MÉTODO DE DUNN	CMS 10	CTRL
	Latencia al escape	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	MÉTODO DE DUNN	CMS 10	CTRL
	Errores (primer ensayo)	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	...	...	...
	Latencia al escape (primer ensayo)	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	MÉTODO DE DUNN	CMS 10	CTRL

Nota: Resumen de las comparaciones estadísticas en Laberinto de Barnes para las mediciones: Errores, Latencia al escape y Latencia al escape (primer ensayo).

• **Resultados Reconocimiento de Objetos Novedosos**

**Índice de Discriminación**

El análisis con Kruskal-Wallis de una vía (tiempo de exposición) indicó que había diferencias significativas en el índice de discriminación ( $H[4,45]= 11.108, p < 0.05$ ), posteriormente el análisis post-hoc con el método de Dunn indicó que no había diferencias significativas en la comparación entre CMS 5 vs CMS 10 ( $p > 0.05$ ) (Panel 5; Figura 5A)



Panel 5 – Evaluación de memoria de reconocimiento en reconocimiento de objetos novedosos. Índice de Discriminación (Figura 5A). La significancia se marcó de la siguiente forma: \* ( $P < 0.05$ ); \*\* ( $P < 0.01$ ) y \*\*\* ( $P < 0.001$ ). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.

Tabla 14

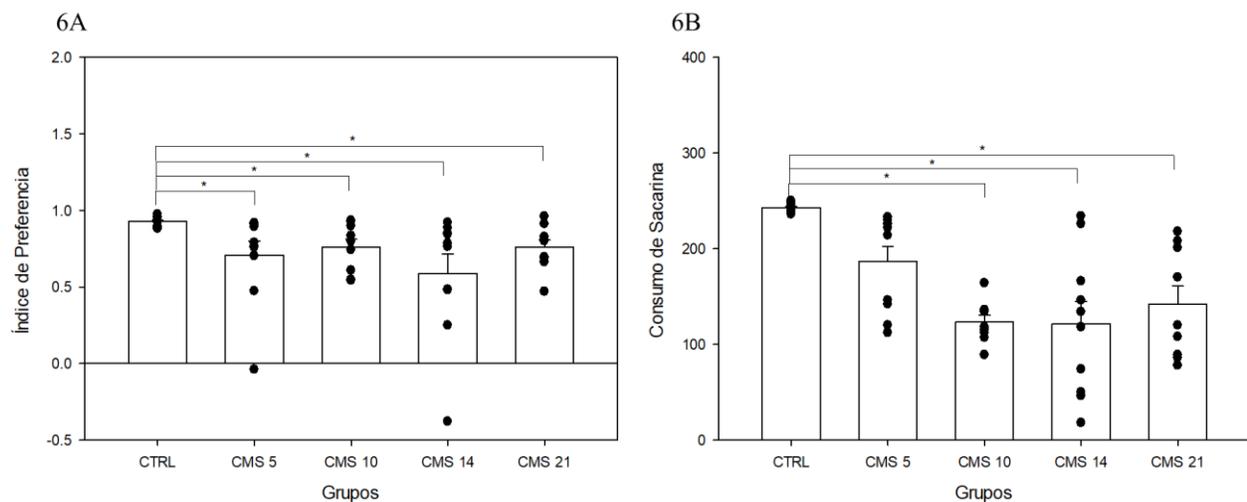
EVALUACIÓN	Conducta	PRUEBA	POST-HOC	Comparaciones significativas
RdO	Índice de discriminación	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	MÉTODO DE DUNN	...

Nota: Resumen de las comparaciones estadísticas en Reconocimiento de Objetos novedosos para el índice de discriminación.

- **Resultados Preferencia de Sacarina**

### Índice de Preferencia y Consumo Total de Sacarina

El análisis con Kruskal-Wallis de una vía (tiempo de exposición) indicó que había diferencias significativas en el índice de preferencia ( $H[4,45]= 18.771, p < 0.05$ ), posteriormente el análisis post-hoc con el método de Dunn indicó que las diferencias estaban en la comparación entre CTRL vs CMS 5 ( $p < 0.05$ ), CTRL vs CMS 10 ( $p < 0.05$ ), CTRL vs CMS 14 ( $p < 0.05$ ) y CTRL vs CMS 21 ( $p < 0.05$ ) (Panel 6; Figura 6A). Por otro lado, el análisis con Kruskal-Wallis de una vía (tiempo de exposición) indicó que había diferencias significativas en el consumo total de sacarina ( $H[4,45]= 31.136, p > 0.05$ ), el análisis post-hoc con el método de Dunn mostró que las diferencias se encontraban en las comparaciones entre CTRL vs CMS 110 ( $p < 0.05$ ), CTRL vs CMS 14 ( $p < 0.05$ ) y CTRL vs CMS 21 ( $p < 0.05$ ) (Panel 6; Figura 6B).



Panel 6 – Evaluación de conductas tipo-depresión en preferencia de sacarina. Índice de Preferencia (Figura 6A) y Consumo Total de Sacarina (Figura 6B). La significancia se marcó de la siguiente forma: \* ( $P=<0.05$ ); \*\* ( $P=<0.01$ ) y \*\*\* ( $P=<0.001$ ). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.

Tabla 15

EVALUACIÓN	Conducta	PRUEBA	POST-HOC	Comparaciones significativas	
PdS	Índice de preferencia	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	MÉTODO DE DUNN	CTRL	CMS 5
					CMS 10
					CMS 14
	Consumo total de sacarina	KRUSKAL-WALLIS UNA VÍA	MÉTODO DE DUNN	CTRL	CMS 21
					CMS 10
					CMS 14
CMS 21					

*Nota: Resumen de las comparaciones estadísticas en Preferencia de Sacarina para el índice de preferencia y consumo total de sacarina.*

La *Tabla 16* resume los efectos conductuales tipo-ansiedad, tipo-depresión y cognitivos observados por las ventanas de exposición a CMS.

Tabla 16

Evaluación	Prueba	CMS 5	CMS 10	CMS 14	CMS 21
<b>Ansiedad</b>	CA	NO	SI	NO	SI
	LC	SI	NO	NO	NO
<b>Depresión</b>	PdS	SI	SI	SI	SI
<b>Cognitivo</b>	LB	NO	SI	NO	NO
	RdO	NO	NO	NO	NO

*Nota - Resumen de los efectos conductuales observados en cada ventana de exposición a CMS. SI (indica que en la prueba se observaron cambios conductuales que se relacionan con conductas tipo). NO (indica que en la prueba no se observaron cambios conductuales que se relacionan con conductas tipo). CMS 5 (estrés 5 días); CMS 10 (estrés 10 días); CMS 14 (estrés 14 días); CMS 21 (estrés 21 días) LC (laberinto cero); LB (laberinto de barnés); CA (campo abierto); RdO (reconocimiento de objetos novedosos); PdS (preferencia de sacarina).*

## DISCUSIÓN

En la presente investigación, la ventana de 5 días de exposición a estrés demostró causar en los sujetos conductas tipo-ansiedad en la prueba de laberinto en cero elevado. Por otro lado, los grupos expuestos a 10, 14 y 21 días de CMS desarrollaron conductas tipo-depresión, reveladas por un decremento en el consumo de sacarina y un decremento en el índice de preferencia de sacarina, además, solo los grupos de 10 y 21 días de exposición mostraron conductas tipo ansiedad en la prueba de CA. Sin embargo, solamente la ventana de 10 días mostró alteraciones

en LB que evalúa aspectos cognitivos (memoria espacial). Esto sugiere que la ventana 10 días de CMS se posicionaría como el tiempo suficiente para establecer las conductas tipo-ansiedad, tipo-depresión y las alteraciones cognitivas, lo cual se interpreta como la ventana de exposición a estrés que mejor refleja los efectos buscados en este protocolo. Estos datos proporcionan valiosa información para la investigación con estrés crónico impredecible. A pesar de que se ha reportado que las consecuencias del estrés pueden variar por el tiempo de exposición (Stepanichev et al., 2016; Willner et al., 2017) bajo nuestro conocimiento este es el primer estudio que forma una curva tiempo-efecto que se centra en los cambios conductuales (de tipo-ansiedad, tipo-depresión y cognitivos) del organismo para validar los efectos buscados en este modelo.

La locomoción (a veces denominada actividad horizontal), es un aspecto que se evalúa en los paradigmas de CMS ya que según Willner (2017) su disminución es un aspecto que se observa en pacientes con depresión mayor y que se busca mimetizar en este modelo. Se ha propuesto que la locomoción está mediada por aspectos como la exploración (Pare, 1964) o el estado emocional negativo de las ratas (miedo) (Ader, 1965), aunque actualmente la más aceptada es la exploración, estas interpretaciones aún están validándose (Ramos & Mordéme, 1998). En nuestros datos de campo abierto, el número total de cruces no mostró ser diferente entre los grupos, coincidiendo con lo reportado por Pechlivanova et al. (2012) y Vieira (2017) donde la locomoción no se vio afectada por el CVS, por otro lado, nuestros datos no coinciden con los reportados por Farhan et al. (2014) o los de Li et al. (2016) donde encuentran que las ratas expuestas al CUS decrementan su movilidad en el campo abierto y tampoco coinciden con lo reportado por Stepanichev et al. (2016) donde reporta que la exposición a CUMS incrementa la movilidad en el campo abierto. Sin embargo, a pesar de que nuestro modelo no logró mimetizar este aspecto observado en pacientes con depresión mayor, esto nos permite descartar que algunos de los efectos observados en las demás pruebas sean explicados por alteraciones motoras en los sujetos.

El tiempo permanencia en el centro del campo abierto se ha utilizado como indicador de ansiedad en los roedores debido a que espontáneamente prefieren permanecer y caminar en la periferia del campo (actividad denominada tigmotaxis) a permanecer y caminar en el centro (Prut et al., 2003), típicamente la exposición a CMS reduce el tiempo que pasan los animales en el centro del campo en comparación con el control (Gonzalez-Rivera et al., 2016; Guo et al., 2009; Prut et al., 2003), lo cual coincide con la ventana de exposición de 21 días (y no con las de 5, 10 y 14 días), debido a que disminuye el tiempo que permanecen en el centro.

Otra conducta que se evalúa en el campo abierto es el erguimiento (muchas veces denominado actividad vertical) y esta conducta está relacionada con la exploración del animal en su entorno (Ramos & Mordéme, 1998). El erguimiento se ve comúnmente disminuido por la exposición a estrés crónico (Li et al., 2016; Farhan et al., 2014; Fan et al., 2011; Pechlivanova et al., 2012; Fracchia et al., 1992) y en nuestros datos esto mismo se reflejó únicamente el grupo de 21 días mostrando una reducción significativa en comparación con el grupo control y los demás grupos de exposición.

Otra de las conductas que se miden en los modelos de CMS es el congelamiento, sin embargo, en muchas ocasiones se ha definido como la inmovilidad del animal en el entorno y debido a que congelamiento e inmovilidad están relacionados con el sistema motivacional del miedo, se han interpretado como la misma conducta. Sin embargo, Blanchard et al. (2001), reportó distintos tipos de congelamiento en roedores dependiendo de la proximidad del estresor e indica que uno de ellos (lo que consideramos como inmovilidad), se presenta ante estresores que no están presentes pero que pueden presentarse y que conductualmente involucra aproximación y una postura de exploración del potencial peligro, de manera que evalúa el riesgo de la situación. El otro tipo de congelamiento según Blanchard et al. (2001) se presenta ante estresores presentes y a distancias muy cortas del sujeto e involucra un cese total de movimiento (exceptuando el que se requiere para la respiración). A pesar de que ambas son conductas mediadas por los sistemas motivacionales de miedo (Sestakova et al., 2013), tienen distinta importancia evolutiva debido a que se despliegan en contextos diferentes y por ello, en esta investigación distinguimos entre inmovilidad y congelamiento en los sujetos.

En nuestros resultados solamente el grupo de 10 días de exposición a estrés muestra un incremento significativo en la frecuencia de inmovilidad en el campo abierto en comparación con el grupo control, lo que sugiere que la exposición a 10 días de CMS provoca conductas de miedo en los sujetos y que se relacionan con ansiedad, sin embargo, cuando aumentamos el tiempo de exposición a estrés, esta conducta disminuye quizá porque la continuidad en la exposición prepara al sistema a situaciones posteriores y no presenta miedo ante esta situación novedosa. Este dato nos indica que no solamente la ventana de 21 días muestra conductas tipo ansiedad, sino que también desde esta temporalidad de exposición estamos produciendo un estado ansioso en los sujetos y esto se vuelve un aspecto importante a mimetizar para el modelo debido a que se ha observado altos niveles de ansiedad en pacientes con depresión mayor (Willner et al., 2017). Por otro lado, la conducta de congelamiento en frecuencia y duración no es significativamente

diferente entre los grupos probablemente porque según Blancard et al. (2001) ningún estresor está presente físicamente y esto no permite el despliegue de esta conducta.

En cuanto al laberinto cero elevado, la permanencia en brazo abierto como el número de entradas a este brazo se han relacionado con conductas tipo-ansiedad, donde el decremento en el tiempo de permanencia es interpretado como mayor ansiedad (Sestakova et al., 2013). Además, se puede medir la evaluación de riesgo, aunque la interpretación de esta conducta es controversial, por ejemplo, Rodgers & Dalvi (1997) reportan que su aumento indica menor ansiedad en el animal, mientras que Sestakova et al. (2013) lo relacionan con sistemas motivacionales de miedo, interpretando su aumento como índice de ansiedad. Nuestra investigación interpretó esta conducta como lo hace Sestakova et al. (2013), debido a que actualmente es la explicación más aceptada. En nuestros datos, solamente el grupo de exposición de 5 días muestra un decremento en la permanencia en brazo abierto como en el cruce a brazo abierto, lo que indicaría mayores niveles de ansiedad, sin embargo, esta interpretación no es congruente con lo observado en campo abierto, lo que podría indicar que debido a que este grupo fue evaluado en un principio con LC, pudo haber mostrado conductas tipo-ansiedad y que con el tiempo de evaluación se fue recuperando, indicando que la proximidad de la evaluación con exposiciones breves de estrés pueden ser un factor que modifique la evaluación. Por otro lado, la ventana de 14 días incrementa su tiempo de permanencia en brazo abierto comparado contra el control, lo cual es un dato que no esperábamos. Esto podría indicar que esta ventana de exposición específicamente puede caer en un periodo donde el sistema trate de ajustarse a los cambios que se venían dando por la exposición a estrés crónico. Por último, este periodo de ajuste podría no continuar si el organismo continúa siendo expuesto a estrés, debido a que la ventana de 21 días parece que mantiene el estado ansioso mostrado en CA y se observa disminución en el tiempo que pasa en el brazo abierto, aunque no alcanza diferencias estadísticamente significativas. Con respecto a la evaluación de riesgo, la frecuencia de esta conducta no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo que es muy similar a nuestra medición del congelamiento en CA. Este dato refuerza nuestra idea de que la exposición a este modelo, no logra aumentar la frecuencia de estas respuestas y que con la exposición continua a estrés los sujetos pueden dejar de mostrar miedo, aunque se requiere investigar más a fondo este aspecto.

Dentro de las pruebas de evaluación cognitiva, el laberinto de Barnes se utiliza para poner a prueba la memoria de referencia espacial de los roedores (Barnes, 1979). Esta tarea está relacionada a la función hipocampal y aprovecha la tendencia de los animales a escapar de

ambientes aversivos (Akirav, Sandi & Richter-Levin, 2001), además se ha observado que el estrés crónico altera el desempeño de los roedores en tareas de dominios espaciales (Hutchinson et al., 2012) y para evaluar este desempeño, típicamente se miden el total de errores y la latencia al escape (Sharma et al., 2010). En nuestros resultados, solamente el grupo de CMS 10 mostró diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo control en el número total de errores, además, en la latencia al escape, nuevamente el CMS 10 mostró un aumento en el tiempo que tardaban los roedores en resolver la prueba, lo cual es un marcador de alteración en la memoria de referencia espacial (Rosenfeld & Ferguson, 2014), además cuando se hizo un análisis por ensayo para identificar la latencia primaria (que se refiere a la latencia al escape solamente en el primer ensayo) (Harrison et al., 2006), encontramos diferencias significativas solo en esta latencia en el grupo de 10 días de exposición a estrés, lo que indica que existen alteraciones en el aprendizaje relacionado a la memoria espacial (Rosenfeld & Ferguson, 2014), debido a que los sujetos en ese grupo, fueron más lentos en la recuperación de la información para resolver el primer ensayo, sin embargo, dado que en los otros ensayos no encontramos diferencias significativas, esto nos indica que esta primer recuperación de la información una vez que resolvían la tarea facilitaba en los siguientes ensayos la resolución de la misma.

Por otro lado, dentro de las evaluaciones cognitivas, el reconocimiento de objetos novedosos es una tarea que permite evaluar memoria no espacial en roedores, este proceso se ha relacionado con la función hipocampal, además aprovecha la tendencia natural de los roedores a explorar objetos novedosos no amenazantes (Cohen & Stackman, 2015). Típicamente lo que se reporta en esta tarea, es el índice de discriminación, donde valores positivos sugieren preferencia por el objeto novedoso, mientras valores negativos indican preferencia por el objeto familiar y un valor de cero indica que no existe preferencia por ningún objeto. Existen reportes que indican que ratas estresadas crónicamente no reconocen el objeto novedoso en tareas que implican memoria de reconocimiento (Orsetti et al., 2007). Nuestros datos no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo que sugiere que las alteraciones cognitivas de memoria espacial presentadas por el grupo CMS 10 no necesariamente se ven acompañadas de alteraciones en memoria de reconocimiento aunque ambas se han relacionado con el funcionamiento hipocampal. Esto nos permite plantear la pregunta de si los efectos de esta batería están centrándose en zonas específicas de algunas estructuras y que si dependiendo del tiempo de exposición se pueden agravar estos daños, por ello es necesario continuar la investigación con esta ventana de exposición para evaluar desde la morfología hasta la expresión de factores como

el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) a nivel hipocampal, debido a que el decremento del volumen con el decremento en el BDNF se ha asociado con alteraciones cognitivas como consecuencia de la exposición a CMS (Czeh et al., 2001). Por otro lado, como ninguna de las ventanas superiores a 10 días mostró alteraciones en memoria espacial y no espacial, sugerimos que puede haber una recuperación de la función con el paso del tiempo, habituación a los estresores, a la condición estresante o debido a que estas evaluaciones son agudas. Estos aspectos podrían clarificarse con evaluaciones de los niveles de cortisol y con evaluaciones conductuales a largo plazo.

La última evaluación de este trabajo fue con la prueba de preferencia de sacarina, dado que la anhedonia se considera un fenómeno cardinal de los trastornos depresivos, el déficit hedónico es considerado como una característica primordial que se debe establecer en los modelos de CMS y que normalmente se evalúa con prueba de consumo de sacarina (Carvelani et al., 2017). En nuestros datos todos los grupos de exposición a estrés mostraron cambios significativos en la preferencia de sacarina comparados con el grupo control y los grupos de 10, 14 y 21 días de exposición mostraron un decremento significativo en el consumo total de sacarina. Tanto la preferencia como el decremento en el consumo de sacarina se han reportado constantemente en la literatura y son fundamentales para indicar que el modelo está funcionando, de hecho, autores como Guo et al. (2009) y Grippo et al. (2005) reportan que el consumo de un líquido débilmente azucarado se ve disminuido desde la primera semana de exposición a CMS, lo que se relaciona con nuestros datos ya que observamos cambios en la preferencia de sacarina, así como un decremento en el consumo total de sacarina desde los 5 días, aunque comienza a ser estadísticamente significativo desde la ventana de 10 días y que, con el paso de los días de exposición a estrés, este fenómeno se va estableciendo más claramente. Este aspecto resulta ser muy importante, porque en la literatura normalmente los efectos causados por los paradigmas de estrés crónico se validan solamente con la prueba de preferencia de sacarina, dejando de lado los demás aspectos que se deben mimetizar para tener un alcance mayor de efectividad de mimetizar la depresión mayor. En este sentido, estos datos sugieren que si bien, la mimetización del aspecto anhedónico es crucial, este no debe ser suficiente para establecer la funcionalidad de un modelo, se deben agregar los aspectos de ansiedad y alteraciones cognitivas para mejorar el alcance explicativo que nos ofrecen estos modelos.

## CONCLUSIÓN

La presente investigación evaluó conductualmente a varios grupos expuestos a estrés en diferentes ventanas temporales. Los resultados indican que los efectos esperados por el modelo de CMS (conductas tipo ansiedad, tipo depresión y alteraciones cognitivas) se presentan desde los 10 días de exposición y que varían después de 14 días de exposición.

Estos resultados sugieren que la ventana de 10 días de exposición es la más efectiva para mimetizar los aspectos buscados en los protocolos de CMS. Además, esta investigación sugiere que ventanas más largas de exposición no muestran efectos más severos del estrés, además de que con mayor temporalidad de exposición parece haber incluso una recuperación en los sujetos expuestos, lo que va en contra de mucha de la metodología aplicada actualmente en este modelo. Surgen muchas dudas que deben clarificarse con respecto a la recuperación de los sujetos expuestos al CMS, la habituación al estresor o a la condición estresante, las evaluaciones a corto y largo plazo, además de relacionarse con las respuestas hormonales, factores de crecimiento, la reversión con fármacos (ej antidepresivos y antiinflamatorios) y los cambios estructurales que típicamente se reportan en los pacientes con depresión mayor para poder esclarecer cuál es la ventana de exposición a estrés que resulta más efectiva para mimetizar las características de este trastorno.

## REFERENCIAS:

Ader, R. (1965). Effects of early experience and differential housing on behavior and susceptibility to gastric erosions in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 60(2), 233.

Akirav, I., Sandi, C., & Richter-Levin, G. (2001). Differential activation of hippocampus and amygdala following spatial learning under stress. *European Journal of Neuroscience*, 14(4), 719-725.

Aschbacher, K., O'Donovan, A., Wolkowitz, O. M., Dhabhar, F. S., Su, Y., & Epel, E. (2013). Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9), 1698-1708.

Balsevich, G., Petrie, G. N., & Hill, M. N. (2017). Endocannabinoids: Effectors of Glucocorticoid Signaling. *Frontiers in Neuroendocrinology*.

Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, 93(1), 74.

Berk, L. S., Felten, D. L., Tan, S. A., Bittman, B. B., & Westengard, J. (2001). Modulation of

neuroimmune parameters during the eustress of humor-associated mirthful laughter. *Alternative therapies in health and medicine*, 7(2), 62-76.

Bessa, J. M., Ferreira, D., Melo, I., Marques, F., Cerqueira, J. J., Palha, J. A., ... & Sousa, N. (2009). The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Molecular psychiatry*, 14(8), 764-773.

Bitsika, V., Sharpley, C. F., Sweeney, J. A., & McFarlane, J. R. (2014). HPA and SAM axis responses as correlates of self-vs parental ratings of anxiety in boys with an Autistic Disorder. *Physiology & behavior*, 127, 1-7.

Blanchard, D. C., Griebel, G., & Blanchard, R. J. (2001). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 205-218.

Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., & MacQueen, G. M. (2004). Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *American Journal of Psychiatry*, 161(4), 598-607.

Campos, A. C., Ortega, Z., Palazuelos, J., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., Díaz-Alonso, J., ... & Galve-Roperh, I. (2013). The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(06), 1407-1419.

Cannon, W., (1932). The wisdom of the body. *Physiol. Rev.* 9, 399–431.

Carrasco, G.A. & Van de Kar, L.D. (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology* 463: 235-272.

Chaby, L. E., Sheriff, M. J., Hirrlinger, A. M., Lim, J., Fetherston, T. B., & Braithwaite, V. A. (2015). Does chronic unpredictable stress during adolescence affect spatial cognition in adulthood?. *PloS one*, 10(11), e0141908.

Chang, C. H., & Grace, A. A. (2014). Amygdala-ventral pallidum pathway decreases dopamine activity after chronic mild stress in rats. *Biological psychiatry*, 76(3), 223-230.

Chen, J., Wang, Z. Z., Zuo, W., Zhang, S., Chu, S. F., & Chen, N. H. (2016). Effects of chronic mild stress on behavioral and neurobiological parameters—Role of glucocorticoid. *Hormones and behavior*, 78, 150-159.

Chrousos, G.P., Gold, P.W., (1992). The concepts of stress systems disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *JAM* 267, 1244–1252.

Chrousos, G. P., Charmandari, E., & Kino, T. (2004). Glucocorticoid action networks—an introduction to systems biology.

Cohen, S., & Stackman Jr. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review, In *Behavioural Brain Research*, Volume 285, Pages 105-117, ISSN 0166-4328,

Contreras, C. M., Gutiérrez-García, A. G., & Molina-Jiménez, T. (2013). Anterior olfactory organ removal produces anxiety-like behavior and increases spontaneous neuronal firing rate in basal amygdala. *Behavioural brain research*, 252, 101-109.

Cuadrado-Tejedor, M., Ricobaraza, A., Del Río, J., Frechilla, D., Franco, R., Pérez-Mediavilla, A., & Garcia-Osta, A. (2011). Chronic mild stress in mice promotes cognitive impairment and CDK5-dependent tau hyperphosphorylation. *Behavioural brain research*, 220(2), 338-343.

Czeh , B. , Michaelis , T. , Watanabe , T. , Frahm , J. , de Biurrun , G. , van Kampen , M. , Bartolomucci, A. , & Fuchs , E. ( 2001 ). Stress - induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* , 98 , 12796 – 12801 .

Davis, M. (1992). The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual review of neuroscience*, 15(1), 353-375.

Delgado y Palacios, R., Campo, A., Henningsen, K., Verhoye, M., Poot, D., Dijkstra, J., ... & Van der Linden, A. (2011). Magnetic resonance imaging and spectroscopy reveal differential hippocampal changes in anhedonic and resilient subtypes of the chronic mild stress rat model. *Biological psychiatry*, 70(5), 449-457.

De Felipe, M. D. C., Jiménez, I., Castro, A., & Fuentes, J. (1989). Antidepressant action of imipramine and iprindole in mice is enhanced by inhibitors of enkephalin-degrading peptidases. *European journal of pharmacology*, 159(2), 175-180.

De Kloet, E. R. (2013). Functional profile of the binary brain corticosteroid receptor system: mediating, multitasking, coordinating, integrating. *European journal of pharmacology*, 719(1), 53-62.

De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), 463-475.

Dickerson, S. S., & Kemeny, M. E. (2004). Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychological bulletin*, 130(3), 355.

Di Chiara, G., Loddo, P., & Tanda, G. (1999). Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. *Biological psychiatry*, 46(12), 1624-1633.

Doczy, E. J., Seroogy, K., Harrison, C. R., & Herman, J. P. (2009). Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, glucocorticoids, and neurologic disease. *Immunology and allergy clinics of North America*, 29(2), 265-284.

- Du, X., & Pang, T. Y. (2015). Is dysregulation of the HPA-axis a core pathophysiology mediating co-morbid depression in neurodegenerative diseases?. *Frontiers in psychiatry*, 6.
- Dumont, M., & Provost, M. A. (1999). Resilience in adolescents: Protective role of social support, coping strategies, self-esteem, and social activities on experience of stress and depression. *Journal of youth and adolescence*, 28(3), 343-363.
- Dunn, J. D., & Orr, S. E. (1984). Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation. *Experimental Brain Research*, 54(1), 1-6.
- Dziedzicka-Wasylewska, M., Willner, P., & Papp, M. (1997). Changes in dopamine receptor mRNA expression following chronic mild stress and chronic antidepressant treatment. *Behavioural pharmacology*, 8(6-7), 607-618.
- Elsayed, M., Banasr, M., Duric, V., Fournier, N. M., Licznanski, P., & Duman, R. S. (2012). Antidepressant effects of fibroblast growth factor-2 in behavioral and cellular models of depression. *Biological psychiatry*, 72(4), 258-265.
- Fan, S. J., Jiang, H., Yang, L. J., Liu, X., Song, J., & Pan, F. (2011). Effects of adrenergic agents on stress-induced brain microstructural and immunochemical changes in adult male Wistar rats. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 193(5), 418-424.
- Farhan, M., Ikram, H., Kanwal, S., & Haleem, D. J. (2014). Unpredictable chronic mild stress induced behavioral deficits: A comparative study in male and female rats. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 27(4), 879-884.
- Fendler, K., Karmos, G., & Telegdy, G. (1960). The effect of hippocampal lesion on pituitary-adrenal function. *Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 20, 293-297.
- Fink, G. (2010). Stress: definition and history. *Stress science: neuroendocrinology*, 3-9.
- Fink, G. (2016). *Stress, Definitions, Mechanisms, and Effects Outlined: Lessons from Anxiety*.
- Fracchia, L. N., Jatuff, A. G., & Alvarez, E. O. (1992). The effect of chronic unpredictable stress on locomotor and exploratory activity in male rats with different endogenous prolactin levels. *Journal of neural transmission*, 89(3), 179-192.
- Geerling, J. C., & Loewy, A. D. (2009). Aldosterone in the brain. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 297(3), F559-F576.
- Gonzalez-Rivera, I., Valencia-Flores, K.B., Galicia-Castillo, O., Velazquez-Martinez, D., Paz-Trejo, D., & Sanchez-Castillo, H. An exploration of behavioral and anatomical effects of a traumatic stress model. Program No. 165.09/YY2. 2016 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2016. Online.

Gross, M., & Pinhasov, A. (2016). Chronic mild stress in submissive mice: marked polydipsia and social avoidance without hedonic deficit in the sucrose preference test. *Behavioural brain research*, 298, 25-34.

Guo, F., Zhang, Q., Zhang, B., Fu, Z., Wu, B., Huang, C., & Li, Y. (2014). Burst-firing patterns in the prefrontal cortex underlying the neuronal mechanisms of depression probed by antidepressants. *European Journal of Neuroscience*, 40(10), 3538-3547.

Guo, J. Y., Li, C. Y., Ruan, Y. P., Sun, M., Qi, X. L., Zhao, B. S., & Luo, F. (2009). Chronic treatment with celecoxib reverses chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior via reducing cyclooxygenase-2 expression in rat brain. *European journal of pharmacology*, 612(1), 54-60.

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2006). *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 365-382.

Hammen, C. (2005). Stress and depression. *Annu. Rev. Clin. Psychol.*, 1, 293-319.

Harpaz I, Abutbul S, Nemirovsky A, Gal R, Cohen H, Monsonego A. (2013) Chronic exposure to stress predisposes to higher autoimmune susceptibility in C57BL/6 mice: glucocorticoids as a double-edged sword. *Eur J Immunol* 43:758–69. doi:10.1002/eji.201242613

Harrison, F. E., Reiserer, R. S., Tomarken, A. J., & McDonald, M. P. (2006). Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning & memory*, 13(6), 809-819.

Herman, J. P. (2010). Stress response: Neural and feedback regulation of the HPA axis. *Stress Science: Neuroendocrinology*, 75.

Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., & Cullinan, W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers In Neuroendocrinology*, 24(3), 151-180

Herman, J. P., Cullinan, W. E., Morano, M. I., Akil, H., & Watson, S. J. (1995). Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Journal of neuroendocrinology*, 7(6), 475-482.

Hermans, E. J., Henckens, M. J., Joëls, M., & Fernández, G. (2014). Dynamic adaptation of large-scale brain networks in response to acute stressors. *Trends in Neurosciences*, 37(6), 304-314.

Hill, M. N., Hellemans, K. G., Verma, P., Gorzalka, B. B., & Weinberg, J. (2012). Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(9), 2085-2117.

Holmes, M. C., & Seckl, J. R. (2006). The role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in the brain. *Molecular and cellular endocrinology*, 248(1), 9-14.

Hutchinson, K. M., McLaughlin, K. J., Wright, R. L., Ortiz, J. B., Anouti, D. P., Mika, A., ... & Conrad, C. D. (2012). Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity. *Neurobiology of learning and memory*, 97(2), 250-260.

Jacobson, L., & Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine reviews*, 12(2), 118-134.

Jayatissa, M. N., Henningsen, K., Nikolajsen, G., West, M. J., & Wiborg, O. (2010). A reduced number of hippocampal granule cells does not associate with an anhedonia-like phenotype in a rat chronic mild stress model of depression. *Stress*, 13(2), 95-105.

Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 459-466.

Johnson, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16(2), 115-130.

Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in pharmacological sciences*, 34(9), 518-530.

Katz, R. J. (1982). Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 16(6), 965-968.

Kim, J. J., Diamond, D. M., Haven, N., & Blvd, B. B. D. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(6), 453-62. <https://doi.org/10.1038/nrn849>

Kumar, A., Rinwa, P., Kaur, G., & Machawal, L. (2013). Stress: Neurobiology, consequences and management. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 5(2), 91.

Kvarta, M. D., Bradbrook, K. E., Dantrassy, H. M., Bailey, A. M., & Thompson, S. M. (2015). Corticosterone mediates the synaptic and behavioral effects of chronic stress at rat hippocampal temporoammonic synapses. *Journal of neurophysiology*, 114(3), 1713-1724.

Lee, Y. A., & Goto, Y. (2015). Chronic stress effects on working memory: association with prefrontal cortical tyrosine hydroxylase. *Behavioural brain research*, 286, 122-127.

Levi, L. (1971). *Society, Stress and disease*, Vol. 1, The psychosocial environment and psychosomatic disease. London: Oxford. University Press.

Levine, S. (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*, 30(10), 939-946.

Li, T., Liu, H., Wang, X., Xie, Y., Bai, X., Wu, L., ... & Liu, D. (2016). Resveratrol exerts antidepressant properties in the chronic unpredictable mild stress model through the regulation of

oxidative stress and mTOR pathway in the rat hippocampus and prefrontal cortex. *Behavioural brain research*, 302, 191-199.

Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 434-445.

Miller, G. E., Chen, E., & Zhou, E. S. (2007). If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychological bulletin*, 133(1), 25.

Monteiro S, Roque S, de Sá-Calçada D, Sousa N, Correia-Neves M and Cerqueira JJ (2015) An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. *Front. Psychiatry* 6:6. doi: 10.3389/fpsy.2015.00006

McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM (2012). Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology*. 62:3–12.

McEwen, B. S. (2000a). Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biological psychiatry*, 48(8), 721-731.

McEwen, B., (2000b). Stress, definition and concepts of. In: Fink, G. (Ed.), *Encyclopedia of Stress*, vol. 3. Academic Press, San Diego, pp. 508–509.

McEwen, B. S. (2001). Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 933(1), 265-277.

McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and behavior*, 43(1), 2-15.

McEwen, B.S. (2009) Stress: Homeostasis, Rheostasis, Allostasis and Allostatic Load. En Fink, G. (Ed.) *Stress Science: Neuroendocrinology* (pp.10-14) San Diego, California: El Sevier.

McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N., & Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nature neuroscience*, 18(10), 1353-1363.

Myers, B., McKlveen, J. M., & Herman, J. P. (2012). Neural regulation of the stress response: the many faces of feedback. *Cellular and molecular neurobiology*, 32(5), 683-694.

Orsetti, M., Colella, L., Dellarole, A., Canonico, P. L., & Ghi, P. (2007). Modification of spatial recognition memory and object discrimination after chronic administration of haloperidol, amitriptyline, sodium valproate or olanzapine in normal and anhedonic rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 10(3), 345-357.

O'Connor, T.M., O'Halloran, D.J., Shanahan, F., (2000). The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *Q. J. Med.* 93, 323–333.

Pare, W. P. (1964). Relationship of various behaviors in the open-field test of emotionality. *Psychological Reports*, 14(1), 19-22.

Pechlivanova, D., Tchekalarova, J., Alova, L., Petkov, V., Nikolov, R., Yamikova, S. (2012). Effect of long-term caffeine administration on depressive-like behavior in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Behavioral Pharmacology*, 23(4), 339-347

Pompl PN, Mullan MJ, Bjugstad K, Arendash GW (1999). Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APP (SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Methods* 87 (1), 87–95

Proulx, C. D., Hikosaka, O., & Malinow, R. (2014). Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nature neuroscience*, 17(9), 1146-1152.

Qiao, H., Li, M. X., Xu, C., Chen, H. B., An, S. C., & Ma, X. M. (2016). Dendritic spines in depression: what we learned from animal models. *Neural plasticity*, 2016.

Quinones, C., & Rodriguez-Carvajal, R. (2015). Testing a eustress/distress model of service with a smile.

Radahmadi, M., Alaei, H., Sharifi, M. R., & Hosseini, N. (2015). Preventive and therapeutic effect of treadmill running on chronic stress-induced memory deficit in rats. *Journal of bodywork and movement therapies*, 19(2), 238-245.

Ramos, A., & Mormède, P. (1998). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22(1), 33-57.

Remus, J. L., Stewart, L. T., Camp, R. M., Novak, C. M., & Johnson, J. D. (2015). Interaction of metabolic stress with chronic mild stress in altering brain cytokines and sucrose preference. *Behavioral neuroscience*, 129(3), 321.

Resstel, L. B. M., Joca, S. R. L., Guimaraes, F. G., & Correa, F. M. A. (2006). Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience*, 143(2), 377-385.

Riaz, M. S., Bohlen, M. O., Gunter, B. W., Henry, Q., Stockmeier, C. A., & Paul, I. A. (2015). Attenuation of social interaction-associated ultrasonic vocalizations and spatial working memory performance in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Physiology & behavior*, 152, 128-134.

Ricketson, D., Hostick, U., Fang, L., Yamamoto, K. R., & Darimont, B. D. (2007). A conformational switch in the ligand-binding domain regulates the dependence of the glucocorticoid receptor on Hsp90. *Journal of molecular biology*, 368(3), 729-741.

Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(6), 801-810.

Rosemberg-García I.J., Torres-Carrillo P., Ruíz-García A., Paz-Trejo D. & Sánchez-Castillo H.,

(2013). Contextual memory in rats exposed to chronic stress. Program No. 98.15/Jjj34. Neuroscience 2013 Abstracts. San Diego Ca: Society for Neuroscience, 2013. Online.

Rosenfeld, C. S., & Ferguson, S. A. (2014). Barnes Maze Testing Strategies with Small and Large Rodent Models. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (84), 51194. Advance online publication. <http://doi.org/10.3791/51194>

Ruit, G., & Neafsey, E. J. (1990). Hippocampal input to a “visceral motor” corticobulbar pathway: an anatomical and electrophysiological study in the rat. *Experimental brain research*, 82(3), 606-616.

Ruíz-García A., Torres-Carrillo P., Rosemberg-García I.J., Paz-Trejo D. & Sánchez-Castillo, H. (2013). Conditioning taste aversion after a chronic stress exposure in rats. Program No. 582.10/LLL60. Neuroscience 2013 Abstracts. San Diego Ca: Society for Neuroscience, 2013. Online.

Salavecz, G., Stauder, A., Purebl, G., 2014. Work related stress and depression.

Sánchez-Castillo, H., Paz-Trejo, D., Ramírez, J. V., González, P. Z., & Migliaro, M. (2014). Neurobiology of Posttraumatic Stress Disorder (PTSD) and its Frontostriatal Implications: a short review. *Actualidades en Psicología*, 28(117), 13-20.

Sánchez-Castillo H., Torres-Carrillo P., Rojas-Lita, B., Mendoza-Rosales, C.E., Migliaro, M., Paz-Trejo D., Solís, V.M. & Hong, E. (2015). Long-term effects caused by the exposure to unpredictable chronic stress. Program No. 812.08/X41. Neuroscience 2015 Abstracts. Chicago, Illinois: Society for Neuroscience, 2015. Online.

Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews*, 21(1), 55-89.

Selye, H. (1936). A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. <https://doi.org/10.1038/138032a0>

Selye H. (1974). *Stress without distress*. Philadelphia, PA: J.B. Lippincott Co.

Sestakova, N., Puzserova, A., Kluknavsky, M., & Bernatova, I. (2013). Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary toxicology*, 6(3), 126-135.

Sharma, S., Rakoczy, S., & Brown-Borg, H. (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life sciences*, 87(17), 521-536.

Smeets, T. (2010). Autonomic and hypothalamic–pituitary–adrenal stress resilience: Impact of cardiac vagal tone. *Biological psychology*, 84(2), 290-295.

Song, L., Che, W., Min-Wei, W., Murakami, Y., & Matsumoto, K. (2006). Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 83(2), 186-193.

Spiga, F., Walker, J. J., Terry, J. R., & Lightman, S. L. (2014). HPA axis-rhythms. *Comprehensive Physiology*.

Santana, M. M., Rosmaninho-Salgado, J., Cortez, V., Pereira, F. C., Kaster, M. P., Aveleira, C. A., ... & Cavadas, C. (2015). Impaired adrenal medullary function in a mouse model of depression induced by unpredictable chronic stress. *European Neuropsychopharmacology*, 25(10), 1753-1766.

Stepanichev, M. Y., Tishkina, A. O., Novikova, M. R., Levshina, I. P., Freiman, S. V., Onufriev, M. V., ... & Gulyaeva, N. V. (2016). Anhedonia but not passive floating is an indicator of depressive-like behavior in two chronic stress paradigms. *Acta Neurobiol Exp*, 76, 324-333.

Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(6), 397.

Vaessen, T., Hernaes, D., Myin-Germeys, I., & van Amelsvoort, T. (2015). The dopaminergic response to acute stress in health and psychopathology: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 56, 241-251.

Van Eekelen, J. A. M., Jiang, W., De Kloet, E. R., & Bohn, M. C. (1988). Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *Journal of neuroscience research*, 21(1), 88-94.

Videbech, P., & Ravnkilde, B. (2004). Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *American Journal of Psychiatry*, 161(11), 1957-1966.

Walker, R., F., Nilsson, M., & Jones, K. (2013). Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Current drug targets*, 14(11), 1262-1276.

Wang, J. M., Yang, L. H., Zhang, Y. Y., Niu, C. L., Cui, Y., Feng, W. S., & Wang, G. F. (2015). BDNF and COX-2 participate in anti-depressive mechanisms of catalpol in rats undergoing chronic unpredictable mild stress. *Physiology & behavior*, 151, 360-368.

Willner, P. (2017). The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of stress*, 6, 78-93.

Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., & Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93(3), 358-364.

Yin, X., Guven, N., & Dietis, N. (2016). Stress-based animal models of depression: do we actually know what we are doing?. *Brain research*, 1652, 30-42.

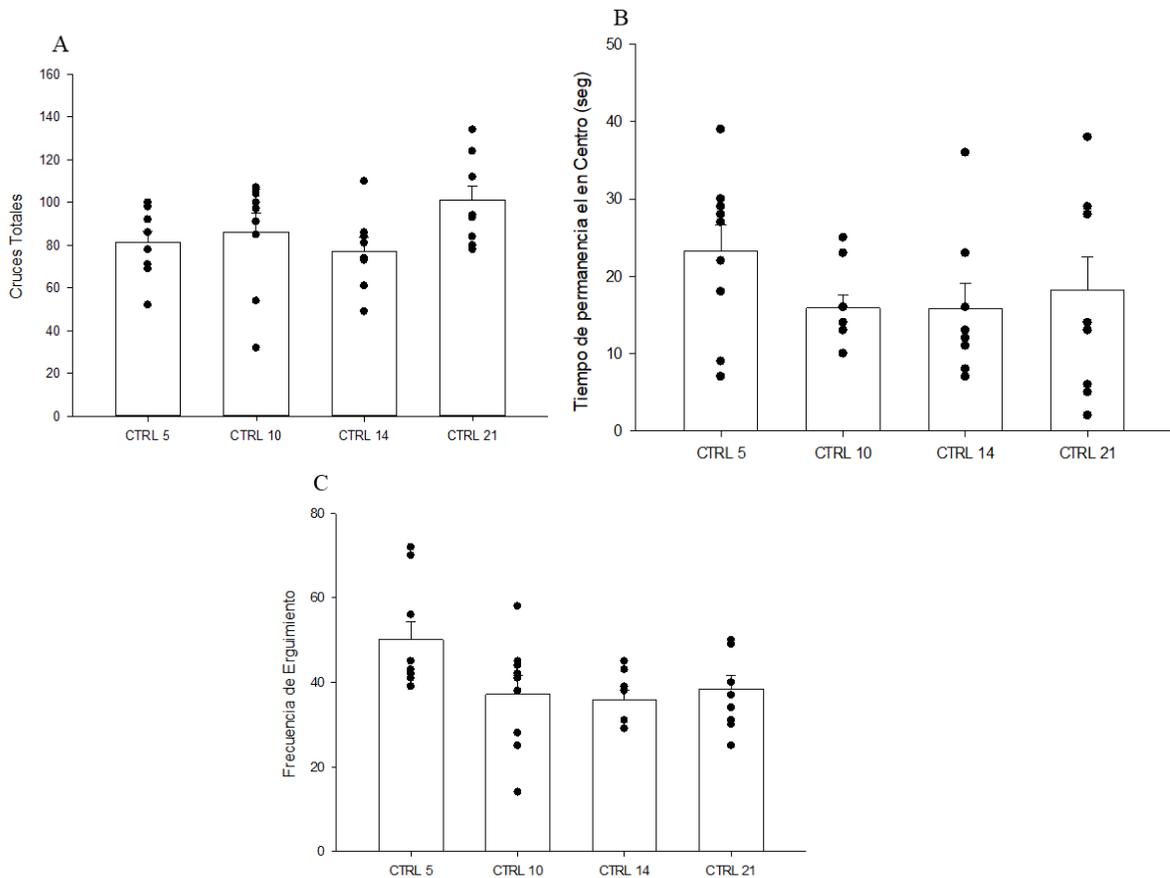
## ANEXO 1

### Comparación grupos control

- **Resultados Campo Abierto**

#### Tiempo de permanencia en el centro, total de cruces y frecuencia de erguimiento

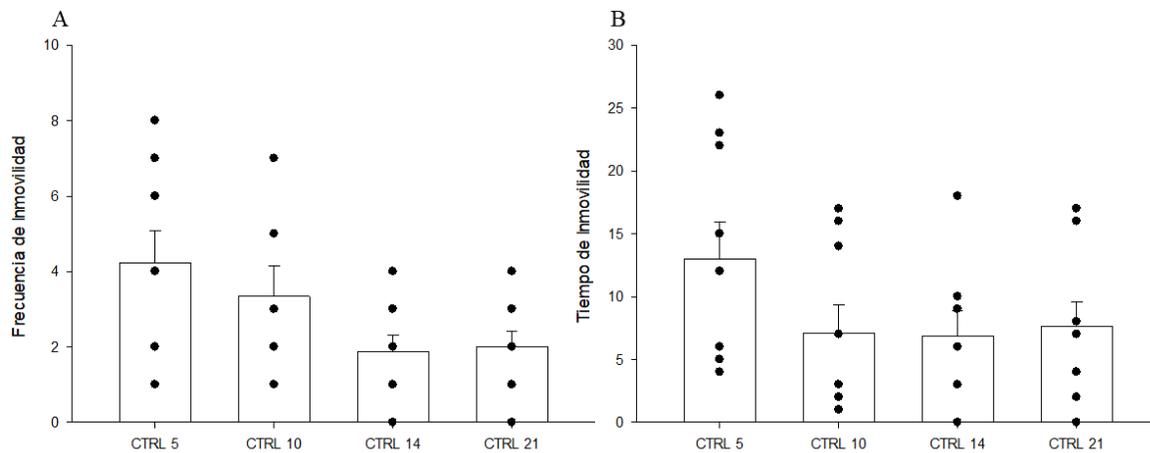
Con respecto al total de cruces en el campo, el ANOVA de una vía (tiempo de exposición) indicó que no existen diferencias significativas entre los grupos ( $F[3,31]=2.303$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 7; Figura A*), tampoco para el tiempo de permanencia en el centro ( $F[3,31]=1.805$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 7; Figura B*), sin embargo, si hubo diferencias en la frecuencia de erguimiento ( $F[3,31]=3.232$ ,  $p < 0.05$ ), pero estas diferencias no fueron significativas con el análisis post-hoc prueba de Tukey en la comparación CTRL 5 vs CTRL14 ( $p > 0.05$ ) (*Panel 7; Figura C*).

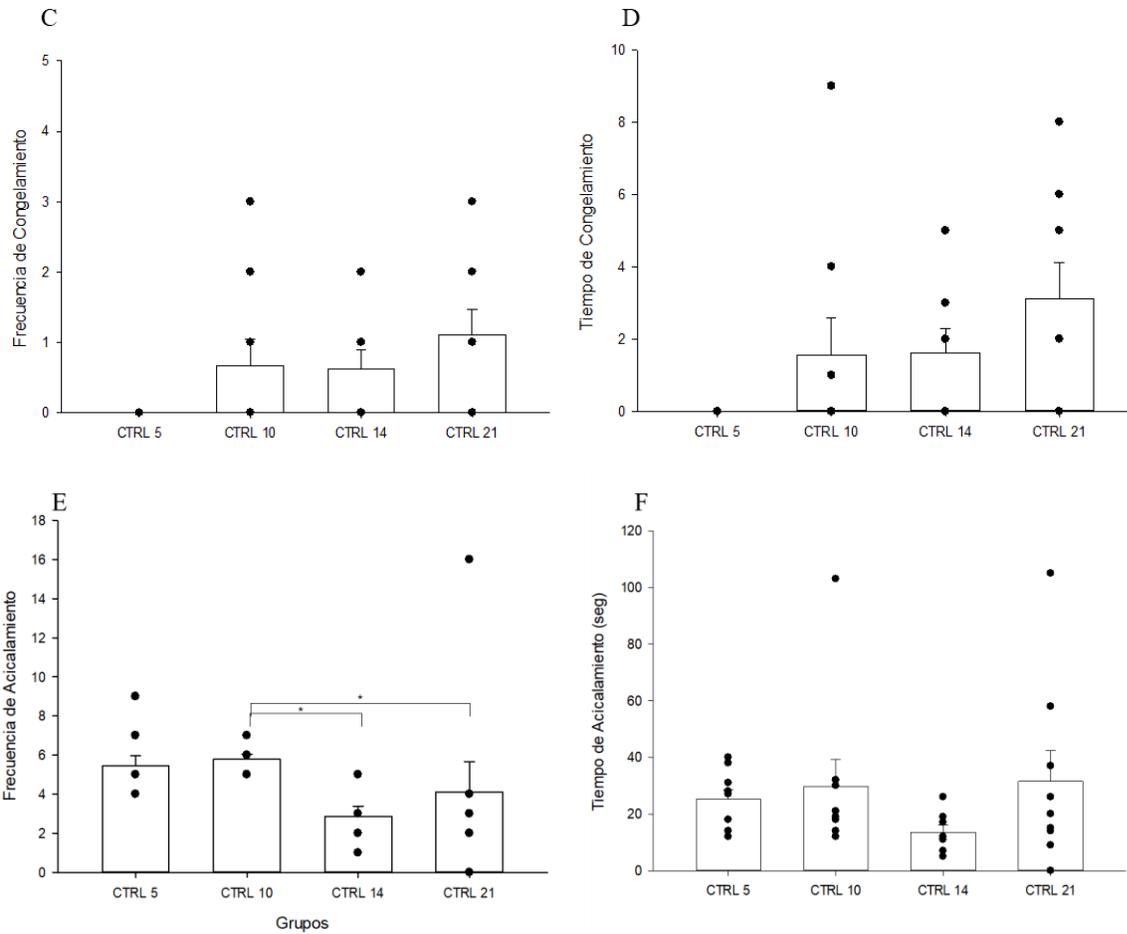


*Panel 7 - Evaluación de motricidad general y de conductas tipo-ansiedad en campo abierto. Total de cruces (Figura A); Tiempo de permanencia en el centro del campo (Figura B); Frecuencia de erguimiento (Figura C). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.*

**Inmovilidad (frecuencia y duración), Congelamiento (frecuencia y duración) y Acicalamiento (frecuencia y duración).**

El ANOVA de una vía (tiempo de exposición) indicó que no existen diferencias significativas entre los grupos en frecuencia de inmovilidad ( $F[3,31]=2.750$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 8; Figura A*), tiempo de inmovilidad ( $F[3,31]=1.587$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 8; Figura B*), frecuencia de congelamiento ( $F[3,31]=2.558$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 8; Figura C*), tiempo de congelamiento ( $F[3,31]=2.604$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 8; Figura D*), frecuencia de acicalamiento ( $F[3,31]=2.171$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 8; Figura E*) y tiempo de acicalamiento ( $F[3,31]=1.054$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 8; Figura F*).



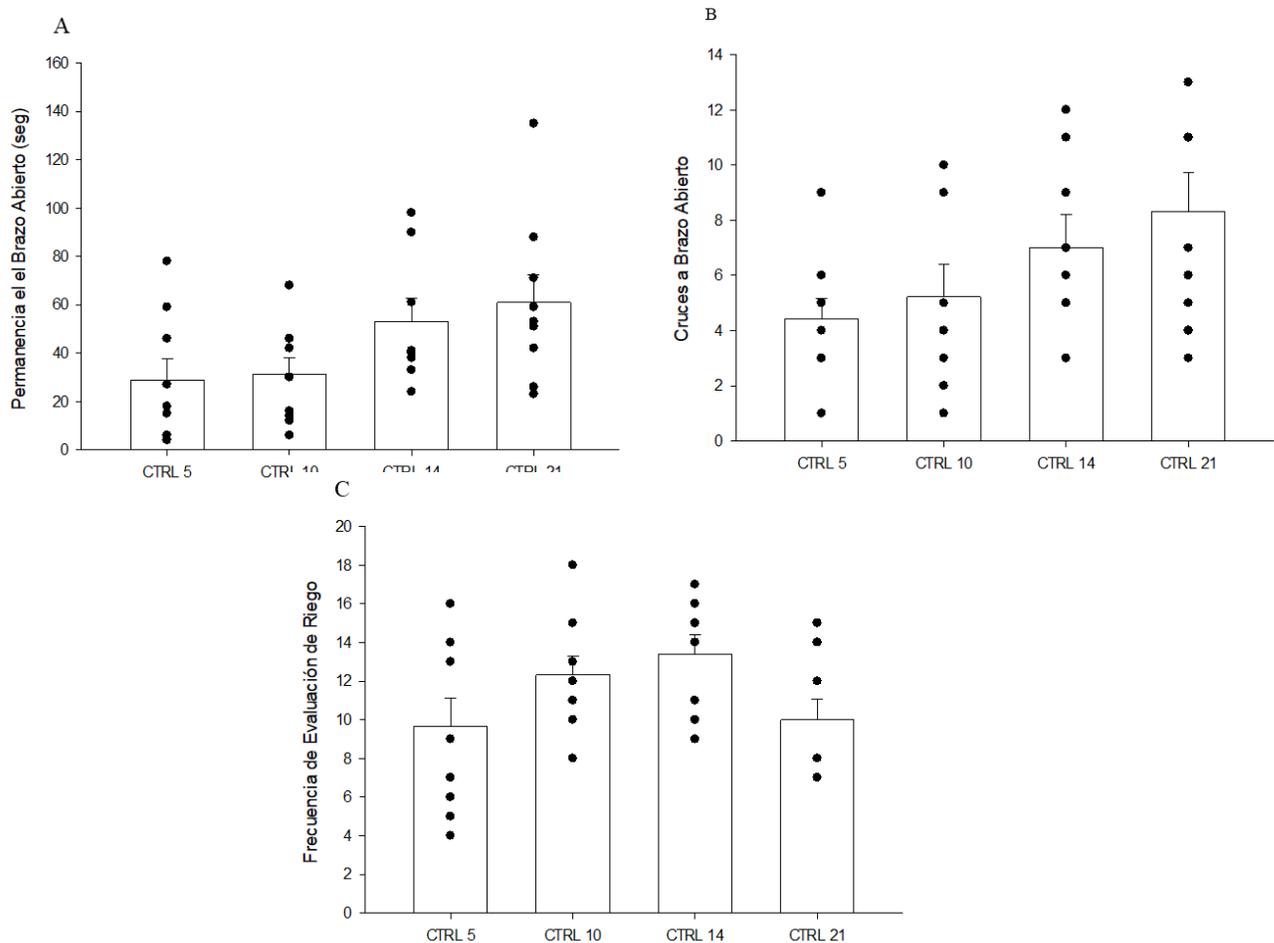


*Panel 8 – Evaluación de conductas tipo-ansiedad por diferentes ventanas de exposición a CMS en campo abierto. Frecuencia de inmovilidad (Figura A); Tiempo de inmovilidad (Figura B); Frecuencia de Congelamiento (Figura C); Tiempo de congelamiento (Figura D); Frecuencia de Acicalamiento (Figura E); Tiempo de Acicalamiento (Figura F). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.*

- **Resultados Laberinto en Cero Elevado**

**Permanencia en brazo Abierto, Cruce a Brazo Abierto y Evaluación de Riesgo**

El ANOVA de una vía (tiempo de exposición) mostró diferencias significativas en permanencia en brazo abierto ( $F[3,31]=2.952, p < 0.05$ ), sin embargo, el análisis post-hoc con la prueba de Tukey mostró que la comparación CTRL 21 vs CTRL 5 no era significativa ( $p > 0.05$ ) (Panel 9; Figura A), por otro lado, el ANOVA de una vía (tiempo de exposición) indicó que no había diferencias significativas en el cruce a brazo abierto ( $F[3,31]=2.380, p > 0.05$ ) (Panel 9; Figura B), ni en la evaluación de riesgo ( $F[3,31]=2.339, p > 0.05$ ) (Panel 9; Figura C).

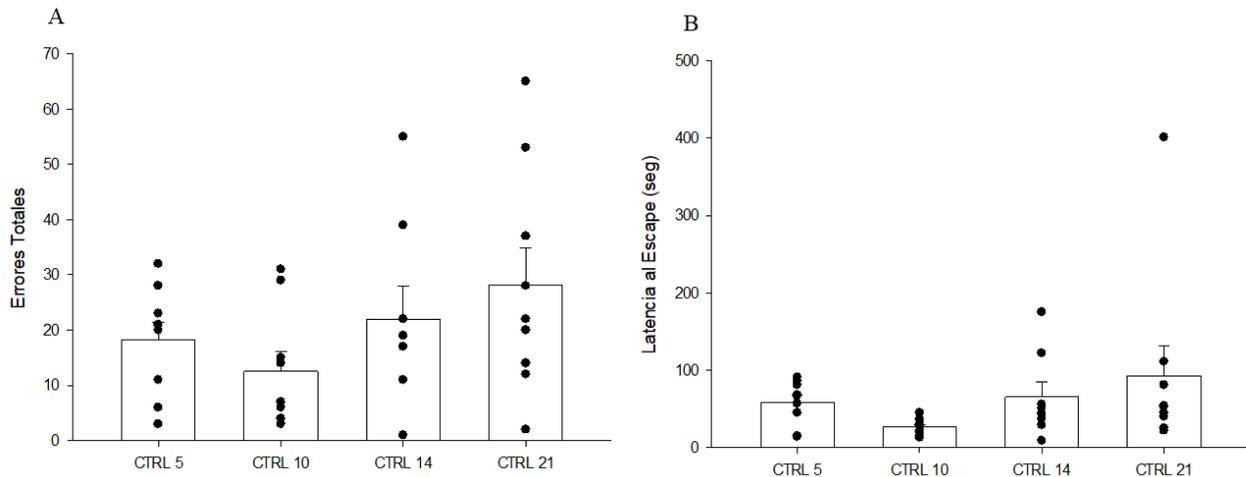


Panel 9 – Evaluación de conductas tipo- ansiedad en laberinto en cero elevado. Permanencia en Brazo Abierto (Figura A), Cruces a Brazo Abierto (Figura B) y Frecuencia de Evaluación de Riesgo (Figura C). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.

- **Resultados Laberinto de Barnés**

## Errores Totales y Latencia al Escape

El ANOVA de una vía (tiempo de exposición) indicó que no había diferencias significativas en el total de errores ( $F[3,31]=1.673$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 10; Figura A*) ni en la latencia al escape ( $F[3,31]=1.451$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 10; Figura B*).

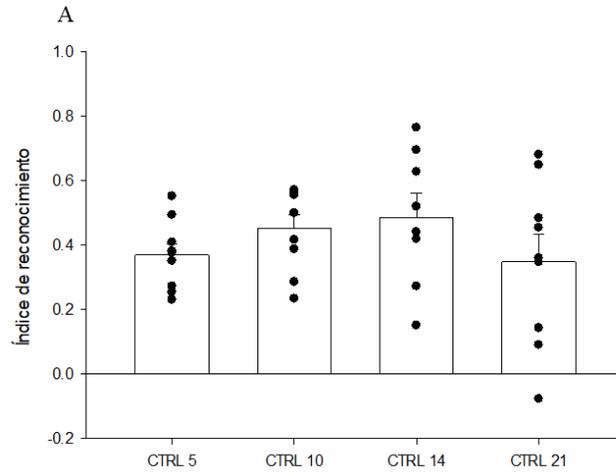


*Panel 10 – Evaluación de memoria espacial en laberinto de barnés. Errores Totales (Figura A), Latencia al Escape (Figura B). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.*

## Resultados Reconocimiento de Objetos Novedosos

### Índice de Discriminación y Frecuencia de interacción con el Objeto Novedoso

El ANOVA de una vía (tiempo de exposición) indicó que no había diferencias significativas en el índice de discriminación ( $F[3,31]=1.108$ ,  $p > 0.05$ ) (*Panel 11; Figura A*).

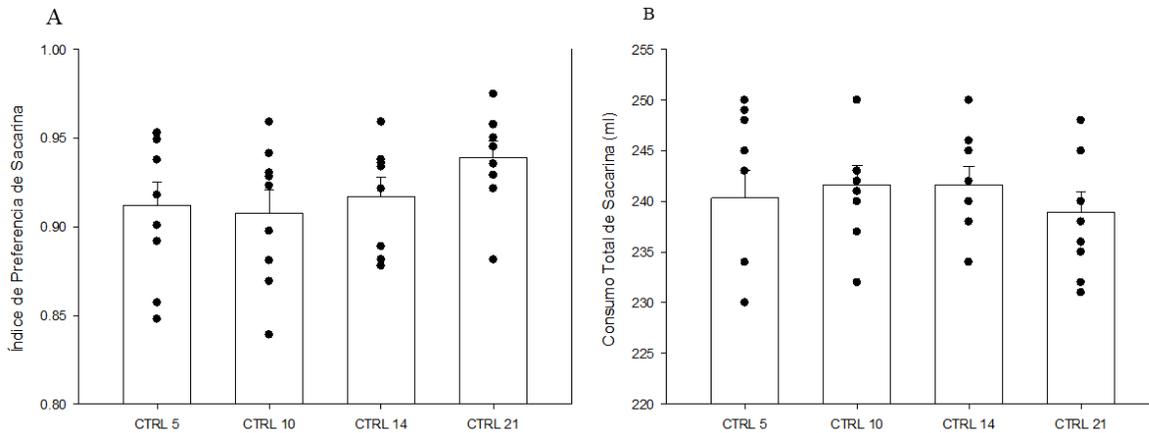


Panel 11 – Evaluación de memoria de reconocimiento en reconocimiento de objetos novedosos. Índice de Discriminación (Figura A). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.

## Resultados Preferencia de Sacarina

### Índice de Preferencia y Consumo Total de Sacarina

El ANOVA de una vía (tiempo de exposición) indicó que no había diferencias significativas en el índice de preferencia ( $F[3,31]=1.464$ ,  $p > 0.05$ ) (Panel 12; Figura A) y el consumo total de sacarina ( $F[3,31]=0.365$ ,  $p > 0.05$ ) (Panel 12; Figura B).



Panel 12 – Evaluación de conductas tipo-depresión en preferencia de sacarina. Índice de Preferencia (Figura 6A) y Consumo Total de Sacarina (Figura 6B). Los puntos negros en cada barra representan a cada sujeto y en conjunto muestran de manera visual la varianza de los datos.

Anexo 2

**CUSB semi-aleatorizado 1:**

<b>PROTOCOLO DE ESTRÉS</b>	
<b>Día</b>	<b>Paradigma</b>
<b>1</b>	Cama mojada 3 h (12:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
<b>2</b>	Restrictor 20 min. (9:00h; 14:00h; 19:00h)
<b>3</b>	Agua fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
<b>4</b>	Restrictor 20 min. (9:00h; 14:00h; 19:00h)
<b>5</b>	Cama mojada 3 h (12:00h); Privación de agua noche 12h (20:00h)
<b>6</b>	Restrictor 20 min. (9:00h; 14:00h; 19:00h)
<b>7</b>	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00h)
<b>8</b>	Restrictor 20 min. (9:00h; 14:00h; 19:00h)
<b>9</b>	Agua fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
<b>10</b>	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00h)

**CUSB semi-aleatorizado 2:**

<b>PROTOCOLO DE ESTRÉS</b>	
<b>Día</b>	<b>Paradigma</b>
<b>1</b>	Agua fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
<b>2</b>	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00h)
<b>3</b>	Restrictor 20 min. (9:00h; 14:00h; 19:00h)
<b>4</b>	Cama mojada 3 h (12:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
<b>5</b>	Restrictor 20 min. (9:00h; 14:00h; 19:00h)
<b>6</b>	Cama inclinada 3h (12:00h); Cama mojada noche 12h (20:00h)
<b>7</b>	Restrictor 20 min. (9:00h; 14:00h; 19:00h)
<b>8</b>	Agua fría 16°C 5 min (13:00h); Luz prendida noche 12h (20:00h)
<b>9</b>	Restrictor 20 min. (9:00h; 14:00h; 19:00h)
<b>10</b>	Cama mojada 3 h (12:00h); Privación de agua noche 12h (20:00h)