



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA
NEUROBIOLOGÍA**

**“Diferencias conductuales y endócrinas en respuesta al estrés:
sexo y tipo de estresor como moduladores”**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
LIC. PAULINA TORRES CARRILLO**

**TUTOR DE TESIS:
DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR:
DR. LENIN DAVID OCHOA DE LA PAZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM.
DR. DAVID NATHANAEL VELÁZQUEZ MARTÍNEZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM.**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

septiembre, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

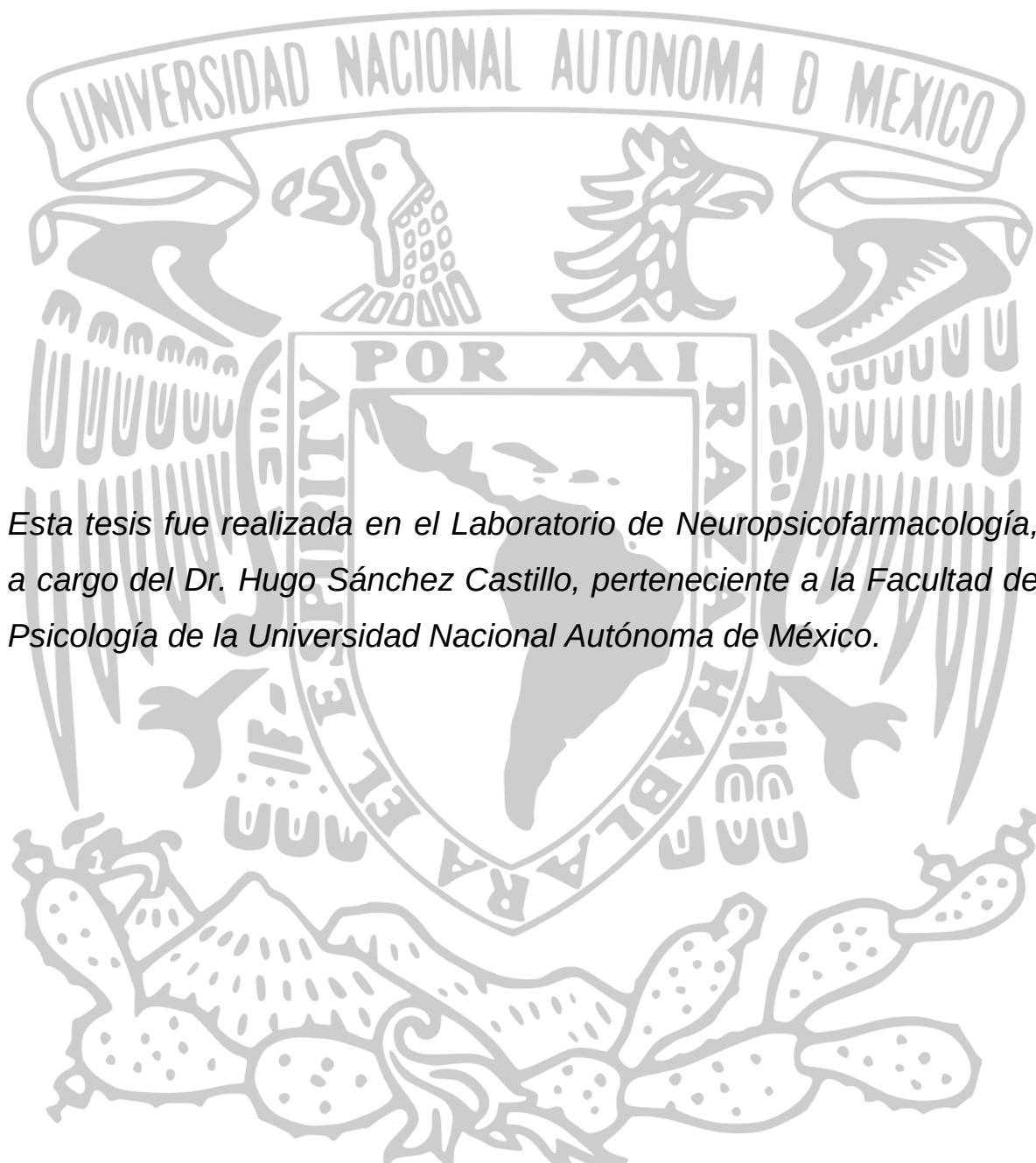
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología, a cargo del Dr. Hugo Sánchez Castillo, perteneciente a la Facultad de Psicología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: **Paulina Torres Carrillo**, cuyo título es: **“Diferencias conductuales y endócrinas en respuesta al estrés: sexo y tipo de estresor como moduladores”** se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Secretario (Tutor)

Dr. Hugo Sánchez Castillo

Vocal

Dra. Gina Lorena Quirarte

Suplente

Dr. Lenin David Ochoa de la Paz

Suplente

Dr. Pavel Rueda Orozco

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa
Dra. Maricela Luna Muñoz

RESUMEN

Estudios previos demostraron diferencias dependientes del sexo en todos los niveles de estudio, lo que podría explicar la mayor prevalencia en mujeres para desarrollar trastornos relacionados con el estrés. Por otro lado, el estrés excesivo y prolongado puede provocar daño neuronal en estructuras cerebrales vulnerables que se refleja con un impacto negativo en las respuestas neuroendocrinas y de comportamiento. Esto sugiere que el sexo y el tipo de estrés influyen en los efectos del estrés. El objetivo de este estudio fue comparar las respuestas de machos y hembras a diferentes tipos de estresores: condición sin estrés, expuestos a una batería de estrés crónico impredecible (CUSB) o a orina de depredador (PSS). Se utilizaron ratas Wistar machos y hembras de cuatro meses de edad. Los animales del grupo CUSB se expusieron a una batería de estrés crónico impredecible (CUSB) durante diez días. Los estresores que componían la batería consistían en 1) restricción de movimiento durante 20 min. (3 veces al día); 2) nado en agua fría durante cinco minutos (16°C); 3) exposición a la luz durante la noche (12 horas); 4) cama mojada durante 12 horas (toda la noche) o 3 horas (durante el día); 5) cama inclinada durante 3 horas a 45°; y 6) privación de agua durante la noche (12 horas). La exposición a cada estresor fue aleatoria según el protocolo CUSB. Los animales del grupo de PSS se expusieron durante 10 minutos en una caja de exposición en la que había un contenedor con una esponja impregnada con orina de depredador. Se evaluaron conductualmente la prueba de campo abierto, laberinto cero, preferencia de sacarina, prueba de nado forzado, laberinto de Barnes y reconocimiento de objeto novedoso. Los resultados de este estudio fueron el aumento del tiempo que pasaron en el centro del campo abierto y en el brazo abierto de laberinto cero en sujetos expuestos al estrés, pero que no se encontraron diferencias entre machos y hembras. Además, en nado forzado aumentó el tiempo de inmovilidad y disminuyó la preferencia de sacarina en machos y hembras estresadas. Por otro lado, las hembras estresadas tuvieron deterioro en la memoria de reconocimiento y en la memoria de referencia. Por último, los niveles de corticosterona en suero aumentaron en machos y hembras estresados, siendo las hembras expuestas a PSS las que tuvieron mayores niveles. Lo anterior sugiere que CUSB y PSS indujeron conductas tipo ansiedad y depresión, deterioro cognitivo y aumento de los niveles de corticosterona en machos y hembras, pero no de la misma manera.

Palabras clave: Estrés Crónico impredecible, Exposición a Orina de Depredador, cognición, conducta tipo ansiedad, conducta tipo depresiva.

SUMMARY

Studies demonstrated sex differences from the molecular to the system level which could explain the higher prevalence in females to develop stress related disorders. On the other hand, excessive and prolonged stress can lead to neuronal damage in vulnerable brain structures that is reflected with a potential negative impact on neuroendocrine and behavior responses. This suggests that sex and stressor type influence the effects of stress. The aim of this study was to compare female and male responses to different stressors vs. no-stress condition: CUSB, PSS, and control group, respectively. Male and female Wistar rats four months old were used. Animals of CUSB group were exposed to a Chronic Unpredictable Stress Battery (CUSB) for ten days. The stressors that made up the battery consisted of 1) put animals in movement restrictors for 20 min. (3 times per day), 2) swimming in cold water for five minutes (16°C), 3) overnight light exposure (12 hours), 4) placing the rats for 12 hours (overnight) or 3 hours (on day) in their home cages with wet bedding, 5) placing the rats for 3 hours in their home cage that was tilted at 45°, and 6) overnight water deprivation (12 hours). The exposure to each stressor was randomized according to the CUSB protocol. Animals of the PSS group were exposed for 10 minutes in an exposure box that contained a bottle with scent tag impregnated with predator urine. Behavior was assessed with Open Field Test, Zero Maze, Saccharin Preference, Forced Swimming Test, Barnes Maze and Novel Object Recognition. The results of this study were the increased of time spent in center of open field and in open arm of Zero Maze in subjects exposed to stress but not found differences between females and males. While, immobility and grooming time spent was bigger in females than males but immobility there was not different between stress type while grooming increased in CUSB males compared with control males. Also, in FST increases the immobility and decrease saccharin preference in males and females stressed. On the other hand, females stressed had impairment on recognition memory and reference memory. Finally, corticosterone serum levels were higher in stressed females and males than females and males control group; PSS-exposed females have highest corticosterone serum levels. The above suggests that CUSB and PSS induced anxiety-like and depressive-like behaviors, and impairment cognition in males and females but not in the same way.

Keywords: Chronic Unpredictable Stress, Predator Scent Stress, female rat, male rat, cognition, depressive-like behavior, anxiety-like behavior.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por la oportunidad de realizar mis estudios de bachillerato, de licenciatura y ahora de posgrado (No. de cuenta: 308277681).

Al **Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)**, UNAM por la oportunidad de formarme como investigadora y permitirme estudiar el Sistema Nervioso.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la confianza y el apoyo brindado para poder permitirme realizar mis estudios de posgrado (Becario No. 612343).

A los donativos de los proyectos **PAPIIT 305715, PAPIIT IN306918, PAPIIME PE300715 y PAPIIME PE306318**, porque sin ellos la realización de este proyecto habría sido una utopía.

A mí tutor principal: Dr. Hugo Sánchez Castillo por muchas razones, principalmente por la oportunidad de dejarme hacer ciencia en su laboratorio y su apoyo durante mi formación académica. Porque fue en su clase donde descubrí lo apasionante que es hacer investigación y contribuir a la construcción y organización del conocimiento.

A los miembros del comité tutor: Dr. Lenin D. Ochoa de la Paz y Dr. David N. Velázquez Martínez por sus aportaciones, comentarios, correcciones, críticas y apoyo durante cada evaluación semestral. También por aceptar ser parte del comité tutor y el tiempo que me dedicaron durante todo el proceso de construcción, desarrollo y conclusión del proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. María Teresa Morales Guzmán, Dra. Gina Lorena Quirarte y Dr. Pavel Rueda Orozco por sus invaluable comentarios, críticas y consejos para mejorar este escrito.

A la Mtra. Diana Berenice Paz Trejo por todos los consejos y experiencias que me has compartido. Contigo he aprendido valiosas lecciones no sólo acerca de lo magnífico de hacer ciencia sino de lo funesto que a veces es la ciencia. Porque igual que los humanos, la ciencia también tiene su lado oscuro.

A los responsables de las unidades de apoyo y servicio académico:

A la Dra. Livia Carrasco por la resolución de dudas administrativas y su papel como responsable del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) en la sede Facultad de Psicología.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico, Guadalupe Amador Uribe y Dra. Nuri Aranda de la Unidad de Enseñanza y Estudios de Posgrado del INB por la excelente labor administrativa que realizan y por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el programa de maestría.

A la Dra. Sofía Rivera Aragón de la Coordinación de Posgrado de la Facultad de Psicología, por su disposición para fungir como unidad de enlace con el INB.

Al M.V.Z Apolonio Haro y Lucía Canseco del Bioterio de la Facultad de Psicología por las facilidades y el apoyo brindado para el mantenimiento y cuidado de los animales utilizados para este proyecto.

Juan José de la Unidad de Videoconferencias de la Facultad de Psicología por su invaluable apoyo para hacer posible tomar las clases por videoconferencia.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A mis papás, porque son los cimientos de mi vida y sin ustedes no sería lo que soy, siempre valoraré el apoyo y ánimo que siempre me han dado para llegar a donde estoy. Paty gracias por siempre ser de las mamás que siempre alientan a sus hijos a cumplir sus metas y objetivos. Gabriel gracias por fomentar la curiosidad por entender cómo y para qué funcionan las cosas.

A Alex, eres y serás por siempre la persona más importante de mi vida:

*"You taught me the courage of stars before you left.
How light carries on endlessly, even after death.
With shortness of breath, you explained the infinite.
How rare and beautiful it is to even exist.
I couldn't help but ask for you to say it all again.
I tried to write it down, but I could never find a pen.
I'd give anything to hear you say it one more time,
that the universe was made just to be seen by my eyes...
With shortness of breath, I'll explain the infinite
How rare and beautiful it truly is that we exist".*
Sleeping at Last (2016) Saturn. En Atlas (Original Score).

A Mike y Ceci, porque son parte fundamental de mi vida a pesar de todo y con cada logro en mi haber, deseo que ustedes también encuentren lo que les apasiona hacer y tengan más logros en su vida.

A Mamá Anita, por todo lo que me enseñó y sigue enseñando acerca de ser una mujer fuerte que se resiste a dejarse vencer por las inclemencias de la vida. A Lulú, por el apoyo incondicional que representas para mí y las palabras que siempre logran hacerme ver las cosas desde una perspectiva más amable. Al tío Pepe y al tío Tito, por su interés en lo que hago y darme palabras de aliento.

A Paco, porque, aunque muchas veces no sea explícito, eres pieza clave en mi vida. Por todos los capítulos escritos y todos los que faltan por escribir de nuestra historia:

*"I will swim and sail on savage seas, with ne'er a fear of drowning
and gladly ride the waves of live if you will marry me.
No scorching sun nor freezing cold will stop me on my journey
if you promise me your heart and love me for eternity.
My dearest one, my darling dear, your mighty words astound me,
but I've no need of mighty deeds when I feel your arms around me.
But I would bring you rings of gold, I'd even sing you poetry
and I would keep you all harm if you would stay beside me.
I have no use for rings of gold, I care not for your poetry,
I only want your hand to hold.
I only want you near me to love and kiss,
to sweetly hold for the dancing and the dreaming
through all life's sorrows and delights,
I'll keep your love inside me.
I will swim and sail on savage seas, with ne'er a fear of drowning
and gladly ride the waves of live if you will marry me".*

John Powell et al. (2014) For the Dancing and the Dreaming. En How to train your dragon 2 (Music from the motion picture). Relativity Music Group, LLC, under exclusive license to Sony Music Entertainment.

A mis amigos. Carmen, porque siempre te llevo en la mente como una mariposa azul y aunque pase el tiempo confío en que nuestra amistad perdurará a través de los años. Daniel, porque entendemos que la amistad es dejar ser al otro y aceptar los cambios, no quedarnos estancados en el recuerdo de lo que fuimos. A Lalo, aunque nos veamos cada año bisiesto logramos hacer historia. Kike, por tu apoyo incondicional y cruel honestidad, te quiero con todo y tus arrebatos e impuntualidad. Jenny, por todos los días que compartimos llevando a cabo este proyecto. Mar Vargas, porque este proyecto empezó contigo y por todas las horas de pláticas, consejos, desahogos y ratos de ocio viendo GOT.

A todos los NETs del pasado y presente por su apoyo cuando lo necesité: Kike, Jenny, Mar Vargas, Mar Vergel, Martín, Bryan, Norma, Febe, Ceci, Yahel, Kenji, Mariana Navarrete y Fabián.

A los Prros Chidos: Mar Vergel, Lupita Bautista y Carlos, por hacer de este viaje el mejor hasta ahora. Porque desde el "ustedes no tendrán los mismos problemas que los de aquí" nos unimos para no ser vencidos por el sistema. Por haber compartido lo bueno, lo malo y lo peor de esta experiencia. Incluyo a David, Héctor y Raúl aunque se hayan olvidado de nosotros en sus respectivas tesis.

PASAPORTE

¿Mujer de ideas? No, nunca he tenido una.
Jamás repetí otras (por pudor o por fallas
nemotécnicas):

¿Mujer de acción? Tampoco.
Basta mirar la talla de mis pies y mis manos.

Mujer, pues, de palabra. No de palabra no.
Pero sí de palabras,
muchas, contradictorias, ay, insignificantes,
sonido puro, vacuo cernido de arabescos,
juego de salón, chisme, espuma, olvido.

Pero si es necesaria una definición
para el papel de identidad, apunte
que soy mujer de buenas intenciones
que he pavimentado
un camino directo y fácil al infierno.

ROSARIO CASTELLANOS.

ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
HOJA DE FIRMAS	
RESUMEN	
SUMMARY	
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	I
DEDICATORIAS	II
ÍNDICE	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. ESTRÉS	2
2.1.1. Definición y tipos de estrés	2
2.1.2. Respuesta neuroendocrina al estrés	3
2.1.3. Modelos animales de estrés	7
2.2. DIFERENCIAS DEPENDIENTES DE SEXO	8
2.2.1. Respuesta conductual después de la exposición a estrés.	9
2.2.2. Respuesta neuroendocrina al estrés.	11
2.3. DIFERENCIAS DEPENDIENTES DEL TIPO DE ESTRESOR	11
2.3.1. Respuesta conductual después de la exposición a estrés.	11
2.3.2. Respuesta neuroendocrina al estrés.	12
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. OBJETIVOS	14
4.1. General	14
4.2. Específicos	14
5. HIPÓTESIS	14
5.1. General	14
5.2. Específicos	14
6. MÉTODO	14
6.1 Sujetos	14
6.2. Consideraciones Éticas	15
6.3. Instrumentos y materiales	15

6.4. Estresores	16
6.5. Batería de Evaluación Conductual	18
6.6. Evaluación de Niveles de Corticosterona	21
6.6.1. Toma de muestras sanguínea	21
6.6.2. ELISA	21
6.7. Análisis Estadístico	21
6.8. Diseño Experimental	22
7. RESULTADOS	23
7.1. Efectos del estrés en conductas tipo ansiosas	23
7.2. Efectos del estrés en conductas tipo depresivas	30
7.3. Efectos del estrés en cognición	34
7.4. Efectos del estrés en niveles de corticosterona	37
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	48
10. REFERENCIAS	50
11. APÉNDICES	59

1. INTRODUCCIÓN

El cerebro interviene en la adaptación a los cambios en el entorno físico y social a través de los sistemas autonómico, neuroendocrino e inmunológico, así como de las respuestas de comportamiento (McEwen, 2009; Yuen, et al., 2012).

La adaptación a los acontecimientos estresantes o cambios ambientales es un proceso activo que implica la producción de mensajeros químicos, tales como neurotransmisores y moduladores, así como muchas hormonas, citocinas y quimiocinas del sistema inmune (McEwen, 2009). Es decir, se trata de un mecanismo de adaptación al entorno que permite promover la sobrevivencia del organismo (Carrasco & van de Kar, 2003) y mantener la homeostasis (McEwen, 2009). Sin embargo, el proceso de adaptación también produce un desgaste energético casi inevitable en el organismo cuando es estimulado de manera crónica. Dicho desgaste se agrava si hay más de un evento estresante y/o si se desregulan los mediadores que normalmente promueven la adaptación, es decir, cuando son activados o estimulados más allá de lo que se necesita o, por el contrario, al no ser desactivados eficazmente cuando ya no son necesarios (McEwen, 2009).

Se han planteado diferencias de los efectos que tienen diferentes estresores, en términos de la duración de la exposición al evento (p. ej. agudo y crónico) (Joëls, & Baram, 2009), del sexo (macho o hembra) (Ortiz, et al., 2015) y del tipo de estresor (Basnar, et al., 2007). El sexo aparece como una de las variables involucradas en conferir vulnerabilidad o resiliencia a los efectos del estrés en un organismo (Faraday, 2002) ya que estudios han demostrado que existen diferencias fisiológicas y conductuales en respuesta a un estresor. Por lo que, aunque se ha obtenido una gran cantidad de información aún no se ha logrado integrar cuál es la participación de distintos sistemas de neurotransmisión, receptores, sistemas fisiológicos en la participación que tiene la respuesta de estrés en la etiología, patofisiología y pronóstico de diversos trastornos relacionados con el estrés.

2. ANTECEDENTES

2.1. ESTRÉS

2.1.1. Definición y tipos de estrés

Hace varias décadas Selye (1976) definía al estrés como la respuesta no específica del cuerpo ante cualquier demanda. En la actualidad esta definición se vuelve obsoleta ya que no abarca la complejidad de la respuesta al estrés sin embargo, los hallazgos de Selye siguen siendo el punto de partida en el estudio del estrés (Murison, 2016). McEwen (2009) define al estrés como una amenaza verdadera o interpretada a la integridad de un individuo que da lugar a respuestas fisiológicas y conductuales. Aclarando que el estrés puede ser también una experiencia subjetiva que puede o no corresponder a las respuestas fisiológicas (McEwen, 2009).

Por otra parte, los estresores pueden ser definidos como las condiciones que pongan o parezcan poner en peligro la supervivencia de un individuo (Carrasco & van de Kar, 2003). En general, los estresores pueden ser agrupados en tres categorías: psicológicos, están basados en una respuesta aprendida a la amenaza de una condición adversa inminente (p. ej. miedo, ansiedad, exposición a un entorno novedoso o incontrolable); físicos, consisten en un estímulo físico y tienen un componente psicológico (p. ej. dolor, shock eléctrico, inmovilización) y; aquellos que pongan en riesgo la homeostasis cardiovascular como pueden ser una hemorragia, la tensión ortostática, el ejercicio o la exposición al calor (Carrasco & van de Kar, 2003).

Todos estos tipos de estrés pueden producir respuestas de comportamiento y provocar respuestas fisiológicas, tales como el aumento de la presión arterial, la frecuencia cardíaca elevada, el aumento de los niveles de cortisol, el deterioro de la función cognitiva y la alteración del metabolismo (McEwen, 2009). Dependiendo de las condiciones, el estrés es asociado con efectos positivos o negativos (Selye, 1976; Vedder, 2007; Fink, 2009). Es relevante reconocer la importancia del estrés como un proceso que permite la sobrevivencia y adaptación en situaciones en

donde se ve amenazada la supervivencia del individuo, su descendencia, su territorio o la especie entera (Sánchez-Castillo, Paz-Trejo, Vázquez, Zarate-González & Migliaro, 2014). El resultado dependerá de factores genéticos y epigenéticos individuales, de la situación y de las experiencias previas (Torres-Carrillo, Vergel-Munguía, Paz-Trejo, Ochoa-de la Paz, Zamora-Arévalo & Sánchez-Castillo, 2018a).

Se distinguen dos tipos de estrés: el eustrés y el distrés. El eustrés (proveniente del Griego *eu* o bueno) se refiere al estrés mínimo y que es, hasta cierto punto, benéfico. Mientras que el distrés (proviene del Latín *dis* o malo) hace referencia a las consecuencias perjudiciales y dañinas por un estrés excesivo (Vedder, 2007; Fink, 2009; Selye, 1976). Dentro de la categoría de distrés, se ha propuesto una clasificación de acuerdo a la duración de la exposición a los estresores considerando las siguientes:

El estrés agudo se ha propuesto como la exposición única a uno o más estresores (Zafar, Paré & Tejani-Butt, 1997). Dentro de esta categoría existe controversia debido a la falta de claridad en los elementos necesarios para su definición, ya que no se han establecido de manera adecuada características como la cantidad de estresores utilizados durante la exposición más allá de la duración del estresor *per se* (Torres-Carrillo, 2016a). El estrés crónico se ha definido como la exposición a uno o más estresores por un periodo igual o mayor a siete días continuos (Joëls & Baram, 2009; Malkesman, Maayan, Weizman & Weller, 2006). La problemática que se hace evidente dentro de esta clasificación es que no es clara la temporalidad lineal en la que se pueda analizar minuciosa y específica para establecer concretamente el momento en que el estrés agudo se convierte en estrés crónico. De igual forma, no se considera la cantidad, cualidad y duración de cada uno de los estresores, así como si la exposición es repetida dentro de un mismo día (Torres-Carrillo, 2016a).

2.1.2. Respuesta neuroendocrina al estrés

Cuando los organismos son expuestos a condiciones hostiles, es decir a uno o más estresores, se desencadena una serie de respuestas organizadas que tienen

como objetivo el aumento de la probabilidad de sobrevivencia de dicho organismo. Estas respuestas se conocen como la respuesta de estrés, que consiste en cambios conductuales, funciones autónomas y la secreción de múltiples hormonas (Carrasco & van de Kar, 2003).

Carrasco y van de Kar (2003) postulan una serie de cambios fisiológicos que están asociados con la respuesta de estrés, donde incluyen: 1) la movilización de energía para mantener el funcionamiento cerebral y muscular; 2) el incremento de la irrigación sanguínea y disponibilidad de glucosa para el cerebro; 3) la mejora en la redistribución del flujo sanguíneo, incrementando la disponibilidad de energía en músculos y cerebro; 4) la focalización de la atención en la amenaza percibida; 5) la modulación de la función inmune; 6) la inhibición de la conducta sexual y; 7) la disminución del apetito.

La respuesta neuroendocrina a los estresores es considerada un mecanismo importante para la supervivencia durante la exposición al estímulo que pone en riesgo la vida (Carrasco & van de Kar, 2003). En la respuesta neuroendocrina al estrés participan varios sistemas: el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y el sistema nervioso autónomo, particularmente el eje simpatoadrenal-medular (SAM) (Mucio-Ramírez, 2007, Timmermans, Xiong, Hoogenraad & Krugers, 2013; Surkin et al., 2018) (Figura 1). Durante la respuesta neuroendocrina al estrés, la estimulación de las células del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) inicia la activación del eje HPA. Estas neuronas liberan a la hormona o factor liberador de corticotropina (CRH o CRF, por sus siglas en inglés) y la arginina vasopresina (AVP), que viajan a través del sistema porta-hipofisiario a la pituitaria. Las células de la pituitaria secretan la hormona adrenocorticotropina (ACTH) que posteriormente se libera al torrente sanguíneo teniendo como diana las glándulas suprarrenales donde se sintetiza y se libera el cortisol (humanos) y la corticosterona (roedores) (Doczy, Seroogy, Harrison & Herman, 2009; Carrasco & Van de Kar, 2003; McEwen, 2009; Duval, González & Rabia, 2010; Surkin et al., 2018). El factor liberador de corticotropina coordina las respuestas endocrinas, autónomas, conductuales e inmunes al estrés y funciona como un

neuromodulador en la amígdala, el núcleo del Rafé, el hipocampo y el *locus coeruleus*, que integran los sistemas y estructuras que participan en la respuesta al estrés (Carrasco & Van de Kar, 2003).

Por otra parte, el Sistema Nervioso Simpático (SNS) regula al sistema cardiovascular, gastrointestinal, respiratorio, renal, endócrino, entre otros, mientras que el sistema nervioso parasimpático contribuye a la inhibición del SNS (Murison, 2016). La respuesta del SNS es mediado por el *locus coeruleus* y las células noradrenérgicas de la médula y el puente. La amígdala central proyecta al tronco cerebral incrementando la liberación de noradrenalina en las terminales de los nervios simpáticos, la activación simpática y la activación de la médula adrenal; lo anterior desencadena un incremento de niveles de adrenalina y noradrenalina. Por lo tanto, se presenta mayor alertamiento y vigilancia, así como, un mejor procesamiento de las claves del entorno (Murison, 2016). El eje SAM libera catecolaminas al torrente sanguíneo (mayormente adrenalina) mientras que el ganglio preganglionar libera acetilcolina y noradrenalina de los ganglios posganglionares del SNS (Murison, 2016).

Asimismo, el estrés promueve la liberación de catecolaminas y glucocorticoides que facilitan la producción de células del sistema inmune (Mucio-Ramírez, 2007).

Además de proporcionar la primera definición de estrés, Hans Selye fue también el primero en reconocer que la homeostasis no podría por sí sola garantizar la estabilidad de los sistemas del organismo bajo estrés (Fink, 2009). Acuñó el término heterostasis (del Griego *heteros* u otros) como el proceso por el cual un nuevo estado de equilibrio se alcanza mediante el tratamiento con agentes que estimulan los mecanismos fisiológicos adaptativos. La heterostasis podría considerarse como el precursor del concepto de alostasis. Otro término importante es la homeostasis que ha dominado el pensamiento fisiológico y médico desde el siglo XIX, siendo considerado como la «estabilidad a través de la constancia» (Fink, 2009). La alostasis se refiere al proceso que mantiene la homeostasis y se define como los valores de ajuste y otros límites de control pueden cambiar dependiendo de las condiciones ambientales en un curso temporal definido, es

decir, se refiere a la «estabilidad dada por ajustes en un rango fisiológico» regulada por del sistema nervioso central y que favorece la respuesta de estrés (Fink, 2009). Este término permite disminuir la ambigüedad inherente a la homeostasis y distingue entre el funcionamiento de los sistemas que son esenciales para la vida (homeostasis) y los parámetros que estos sistemas deben conservar en equilibrio (alostasis) (McEwen, 2009).

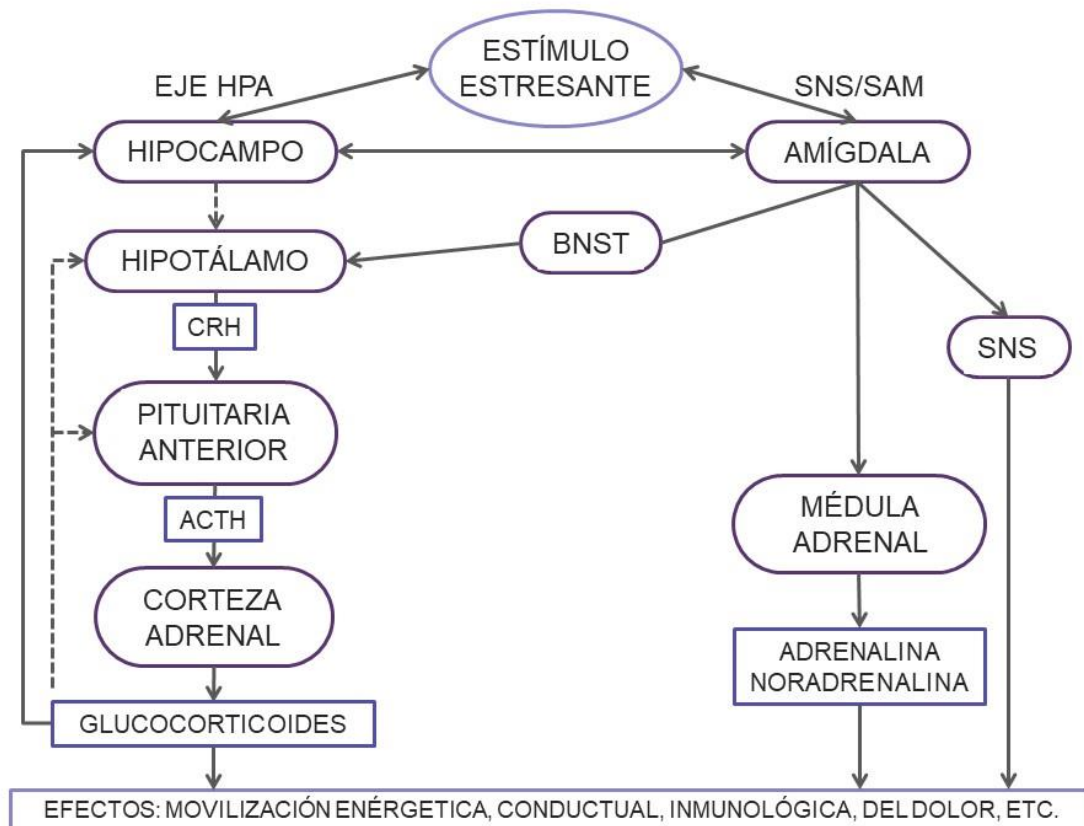


Figura 1. Respuesta de estrés

En la respuesta de estrés participan principalmente dos ejes. Uno de ellos es el eje HPA y el eje SAM. SNS: Sistema Nervioso Simpático; SAM: Eje Simpato-Adrenal-Medular; HPA: Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal; CRH: Hormona Liberadora de Corticotropina; ACTH: Hormona Corticotropa; BNST: Núcleo de la cama de la Estría Terminalis. Las vías inhibitorias están indicadas por las líneas punteadas. Modificado de Murison, 2016.

Existen dos procesos importantes en la respuesta al estrés: el primero se refiere al inicio o activación de la respuesta; el segundo es detener la respuesta cuando ya no se requiere (McEwen, 2009). La desactivación de la respuesta al estrés conduce al retorno a los valores basales de cortisol y de las catecolaminas, lo que

normalmente ocurre cuando el peligro ha pasado. Por su parte, si la respuesta perdura durante semanas, meses o incluso años, la exposición a niveles elevados de hormonas de estrés (estado alostático) puede resultar en una carga y/o sobrecarga alóstatica (McEwen, 2009). Es por ello por lo que se considera que el exceso de estrés, o un mal funcionamiento de la desactivación de la respuesta al estrés, puede causar el desgaste o exacerbar los procesos hacia un estado patológico.

En dichos estados patológicos se incluyen una variedad de trastornos psiquiátricos, endocrinos e inflamatorios y/o la susceptibilidad de presentarlos (Chrousos & Gold, 1992). Algunos ejemplos son el trastorno de estrés postraumático (Daskalakis, Yehuda & Diamond, 2013), la depresión (Bekris, Antoniou, Daskas & Papadopoulou-Daifoti, 2005; Filho, et al., 2015; Li, Yang, Ma & Qu, 2013), y el abuso de sustancias (Mills, 2013), entre otros.

2.1.3. Modelos animales de estrés

Los modelos animales son muy importantes para el estudio y comprensión de la fisiopatología de trastornos para la evaluación de la efectividad de tratamientos novedosos, además de brindar la posibilidad de proponer estrategias de prevención (Ursano et al., 2008; Ursano et al., 2009), de este modo son varios los modelos animales que se utilizan para el estudio del estrés. Siendo el Trastorno de Estrés Postraumático (TEPT) uno de los trastornos en los que se ha puesto gran interés recientemente.

Los modelos animales de TEPT son de gran utilidad al permitir dilucidar las bases neurobiológicas que subyacen dicho trastorno, y además nos permiten determinar la influencia que tienen los factores individuales que conllevan a que los organismos desarrollen vulnerabilidad o resiliencia al trauma (Daskalakis et al., 2013). El uso de modelos animales para el estudio del TEPT tiene ventajas por las siguientes razones: los criterios diagnósticos especifican un factor etiológico (exposición a un evento traumático que amenace la vida) y un modelo de TEPT permite modular y modificar variables como la calidad, la intensidad, el tipo y el grado de exposición al estresor, haciendo que las respuestas fisiológicas y

conductuales concomitantes a un estímulo amenazante puedan ser estudiadas (Cohen, Kozlovsky, Alona, Matar & Joseph, 2012 2012). Asimismo, un modelo animal de TEPT nos permite explorar los aspectos etiológicos previos al trauma, ya que los estudios hasta ahora se han centrado en las evaluaciones retrospectivas de los pacientes después del inicio del TEPT (Cohen et al., 2012). Además, a diferencia de los estudios en sujetos humanos, los estudios con modelos animales permiten, de manera más accesible, la evaluación de cambios moleculares en áreas cerebrales específicas y la experimentación con agentes farmacológicos que pueden tener efectos terapéuticos potenciales (Cohen et al., 2012).

Los modelos que principalmente se han usado son: 1) exposición a depredador; 2) derrota social; 3) choque eléctrico y restricción de movimiento; y, 4) estrés prolongado a estresores como restricción de movimiento y nado forzado (Ursano et al., 2008). Otro paradigma de estrés traumático es el estrés crónico impredecible (CUS, por sus siglas en inglés) que tiene, además, la cualidad de no permitir al sujeto tener control acerca de la predictibilidad del evento aversivo (Ursano et al., 2008). El CUS es considerado como la exposición aleatoria a diferentes estresores por un periodo aproximado de diez días (Cruz, Marin, Leão & Planeta, 2012) teniendo como ventaja la inclusión de varios de los estresores que se emplean en otros modelos de TEPT, además de inducir síntomas tipo depresión y ansiedad, así como, alteraciones cognitivas a largo plazo (Sánchez-Castillo et al., 2015; Torres-Carrillo et al., 2016b; Torres-Carrillo et al., 2018a).

2.2. DIFERENCIAS DEPENDIENTES DE SEXO

El cerebro de hembras y machos muestran variaciones anatómicas que pueden impactar en la respuesta al estrés (Novais, Monteiro, Roque, Correia-Neves & Sousa, 2017). Por ejemplo, las hembras tienden a tener mayor densidad dendrítica en el núcleo *locus coeruleus*, hipocampo y corteza prefrontal medial después de haber sido expuestas a estrés (Bangasser, Eck, Telenson & Salvatore, 2018; Bangasser & Valentino, 2014). Por otro lado, estudios han demostrado que

la respuesta de estrés y los efectos de éste en la habilidad cognitiva son diferentes al evaluar a machos y hembras (Bangasser & Valentino, 2014).

2.2.1. Respuesta conductual después de la exposición a estrés

En algunos estudios se ha encontrado que, en modelos animales, los machos muestran mayor congelamiento (freezing) en tareas de condicionamiento al miedo que las hembras (Mirshekar, Abrari, Goudarzi & Rashidy-Pour, 2013), mientras que las hembras son más vulnerables a presentar conductas tipo ansiedad (Ramos-Ortolaza, Doreste-Mendez, Alvarado-Torres & Torres-Reveron, 2017) y tipo depresivas (Ramos-Ortolaza et al., 2017).

En un estudio donde fue evaluada la memoria espacial en la descendencia adulta expuesta a estrés prenatal, se encontró que las hembras presentaban alteraciones en dicho proceso a diferencia de los machos que mostraban un mejor desempeño en la tarea de laberinto de Morris comparados con sus respectivos grupos controles (Wang et al., 2016).

Cuando se evaluaron conductas tipo ansiedad en machos y hembras expuestas a estrés prenatal, se reportó que los grupos de hembras y machos estresados tuvieron un menor número de entradas y permanencia en los brazos abiertos en la prueba de laberinto elevado en cruz en comparación con el grupo sin estrés (Wang et al., 2015b). Sin embargo, no hubo diferencias al comparar a hembras y machos (Wang et al., 2015b). El mismo grupo realizó otro estudio donde evaluaron la presencia de conductas tipo depresión, reportando que las hembras expuestas a estrés prenatal tuvieron menos tiempo inmóviles en la prueba de nado forzado en comparación con los machos estresados, empero, los grupos de estrés tuvieron mayor inmovilidad que los grupos no estresados (Wang et al., 2015a).

Unas de las explicaciones a estas diferencias conductuales observadas en hembras se han atribuido a los estrógenos. Un estudio en ratas ovariectomizadas (OVX) donde evaluaron el condicionamiento y sensibilización al miedo en los días 1, 14 y 21 después de la exposición única a estrés prolongado (SPS, por sus siglas en inglés) Mirshekar et al. (2013) observaron que las ratas OVX estresadas

pasan mayor porcentaje de congelamiento en la tarea de respuesta condicionada al miedo que permanece hasta tres semanas después comparación con ratas OVX, sham e intactas. Mientras que en la tarea de sensibilización de la respuesta al miedo se encontró que en la semana las ratas OVX estresadas tuvieron mayor porcentaje de congelamiento en comparación con las ratas sham e intactas. Por otra parte, en la semana 2 y 3 el grupo de ratas OVX estresadas tuvo mayor porcentaje de congelamiento en comparación con los otros grupos (Mirshekar et al., 2013). En un segundo experimento se encontró que el porcentaje de congelamiento en ratas OVX expuestas a SPS administradas con una dosis múltiple subcutánea de β -estradiol decrementan el porcentaje de congelamiento en las tareas de condicionamiento (dosis de 45 μ g/Kg) y sensibilización de la respuesta al miedo (en dosis de 45, 90 y 180 μ g/Kg) en la segunda y tercera semana de evaluación. Es decir, el β -estradiol es capaz de revertir los efectos de la exposición a SPS en tareas de condicionamiento y sensibilización al miedo. En otros estudios se observó que roedores que son ovariectomizadas 8 semanas antes de ser expuestas a estrés crónico impredecible tienen mayor tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado y menos tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz en comparación con roedores ovariectomizadas 2 semanas antes de la exposición (Lagunas, Calmarza-Font, Diz-Chaves & García-Segura, 2010).

2.2.2. Respuesta neuroendocrina al estrés

Se ha encontrado que los niveles de ACTH y de glucocorticoides incrementan después de estar expuesto a estrés por restricción de movimiento en sujetos administrados con estrógenos simulando los niveles del periodo proestro del ciclo estral. De igual forma se ha observado en ratas hembras existen mayores niveles de ACTH en la fase proestro en comparación con la fase de estro y diestro (Viau & Meaney, 1991). Por otra parte, en machos la testosterona decrementa los niveles de ACTH y los glucocorticoides después de ser estresados (Viau & Meaney, 1996) que se revierte después de que son gonadotectmizados (Seale et al., 2004).

2.3. DIFERENCIAS DEPENDIENTES DEL TIPO DE ESTRESOR

Existen gran número de modelos animales de estrés en los que se intenta inducir los fenotipos conductuales y biológicos observados en humanos que padecen TEPT, sin embargo, la evidencia científica señala que los efectos que genera cada uno de los modelos son opuestos entre sí, no son consistentes o no se han explorado (Deslauriers, Toth, Der-Avakian & Risbrough, 2017).

2.3.1. Respuesta conductual después de la exposición a estrés

Estudios en modelos de roedores han mostrado que las conductas tipo-ansiedad incrementan después de la exposición aguda a un estresor en comparación a cuando son estresadas de manera crónica (Mahanti et al., 2013). En la tarea de preferencia de sacarosa se ha encontrado que la exposición repetida a un predador incrementa el consumo de sacarosa (Burgado et al., 2014) mientras que en la exposición a derrota social el consumo de sacarosa decrementa (Macedo et al., 2018).

Ratas expuestas a estrés crónico impredecible muestran déficits en la prueba de nado forzado y muestran una disminución significativa de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés) en el hipocampo, también mostraron incremento en esta proteína y disminución del tiempo que pasan inmóviles en la prueba conductual después del tratamiento de clomipramina, un antidepresivo tricíclico (Qiong et al., 2009).

El modelo CUMS induce anhedonia (medido por la disminución de la ingesta de solución de sacarina), disminución de actividad locomotora y de exploración en la prueba de campo abierto (lo que indica retardo psicomotor y pérdida de interés), además de pérdida de peso en comparación con ratas no expuestas a dicho modelo (Chen et al., 2015).

En un estudio donde fue evaluada la memoria espacial en la descendencia adulta expuesta a estrés prenatal se encontró que las hembras presentaban alteraciones en el proceso a diferencia de los machos que mostraban un mejor desempeño en

la tarea de laberinto de Morris comparados con sus respectivos grupos controles (Wang et al., 2016).

2.3.2. Respuesta neuroendocrina al estrés

A grandes rasgos, esta respuesta inicia con la secreción de hormonas liberadoras en el hipotálamo, se caracteriza por la activación del eje HPA y culmina con la elevación de los niveles circulantes de glucocorticoides (Surkin et al., 2018). Esta respuesta tiene variaciones dependiendo del paradigma o protocolo experimental de exposición al estrés. Por ejemplo, se ha encontrado una hipersecreción de ACTH después de la exposición a éter (estresor usado en el modelo de SPS) que persiste durante exposiciones repetidas, en contraste con la habituación de la respuesta de ACTH al ser expuesto a estresores como choques eléctricos o restricción de movimiento (Hauger, Lorang, Irwin & Aguilera, 1990). Mientras que los niveles de corticosterona en plasma van decrementando conforme pasan los días en los sujetos expuestos a estrés por restricción, empero, son mayores en comparación con los observados en la exposición a éter (Hauger et al., 1990).

Lo anterior es evidencia de que los efectos en la respuesta al estrés además de incluir la participación de múltiples sistemas de neurotransmisión y no haber logrado establecer la relación entre ellos, varían en función del tipo de estresor y son diferentes entre machos y hembras.

3. JUSTIFICACIÓN

Se conoce que existen factores que pueden modular la respuesta neuroendocrina y conductual al estrés. Uno de los factores propuestos es el sexo, debido a que la prevalencia en el desarrollo de trastornos relacionados con el estrés, como depresión y estrés postraumático, es mayor en mujeres que en hombres. Por otra parte, a pesar del incremento de la inclusión de hembras en estudios, en muchas ocasiones, los estudios no son realizados en machos y hembras. Adicionalmente, los resultados de estudios han demostrado que existen diferencias dependientes del sexo en los distintos niveles de análisis en estudios de estrés (desde lo molecular y celular hasta los efectos en la conducta) , lo que sugiere que no basta con transpolar los hallazgos en organismos masculinos a organismos femeninos. Otra de las propuestas es el tipo de estresor que se usa. Se ha observado que aunque en algunos aspectos los modelos animales de estrés convergen y son consistentes, también se ha reportado que inducen diferentes fenotipos conductuales y biológicos. Estos hallazgos nos permitirían explicar las diferencias en la gravedad de la sintomatología, el pronóstico, y proponer la consideración de éstas características para la evaluación de tratamientos alternativos para el TEPT. De esta forma, el presente estudio pretende contribuir a dilucidar las bases neurobiológicas y conductuales que sientan las bases para que existan estas diferencias sexuales y diferencias en las características del estresor en la etiología y patofisiología de los trastornos asociados con el estrés.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Determinar la participación del tipo de estresor y del sexo del sujeto en la respuesta al estrés.

4.2. Específicos

- A. Identificar diferencias conductuales y en los niveles de corticosterona entre los distintos tipos de estresores.
- B. Identificar las diferencias conductuales y en los niveles de corticosterona entre sexo después de la exposición a estrés.

5. HIPÓTESIS

El sexo del sujeto y el tipo de estresor influyen en la respuesta al estrés evaluada a través de la ejecución en tareas conductuales y los niveles séricos de corticosterona.

6. MÉTODO

6.1. Sujetos

Ratas macho y hembra de la cepa Wistar de aproximadamente 12 semanas de edad con un peso de 200-340 g. al inicio del experimento. Se mantuvieron alojadas en cajas-habitación comunales (5 ratas del mismo sexo por caja) bajo un ciclo de luz-obscuridad invertido de 12 hrs. (luces prendidas a las 8:00 hrs.), con temperatura constante de 22 ± 2 °C. Alimento restringido a una hora al día y agua *ad libitum* durante todo el experimento, a excepción de las especificaciones de cada una de las pruebas conductuales.

6.2. Consideraciones éticas

Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité local de bioética de la Facultad de Psicología, UNAM. Asimismo, se llevaron a cabo acorde a los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 de la SAGARPA y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por la Academia Nacional de Ciencia, Ingeniería y Medicina de Estados Unidos (U.S. National Academy of Science, Engineering, and Medicine). Además, se siguieron los Principios éticos de psicólogos y códigos de conducta de la Asociación Psicológica Americana (American Psychology Association).

6.3. Instrumentos y Materiales

- Restrictores de movimiento de la marca **MED associates inc®**. Cilindros de policarbonato con tapas en los extremos (20 x 5 x 5 cm.; largo x ancho x alto), tienen aberturas que permiten la respiración del animal.
- Caja de policarbonato como Arena de Exposición a Orina de Depredador (60 x 60 x 45 cm.; largo x ancho x altura).
- Arena impregnada de orina de lince (“Bobcat PEE shots”) de la marca **PredatorPee®** (U.S.A.).
- Arena de campo abierto de policarbonato (100 x 100 x 45 cm.; largo x ancho x altura).
- Laberinto cero (120 x 64 cm., diámetro x distancia del suelo) de la marca **MED associates inc®**.
- Cilindro de nado forzado (32 x 45 cm.; diámetro x altura) con agua a hasta una altura de 32 cm. a una temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Veinte bebederos para roedor con capacidad de 300 ml.
- Sacarina (**Sigma®**) 98% de pureza. S1002. CAS 82385-42-0.
- Laberinto de Barnes. Plataforma circular con 16 agujeros (95 x 70 cm., diámetro x distancia del suelo; agujeros de 4cm de diámetro, con 4 cm de distancia entre ellos).

- Objetos:
 - Dos cubos de policarbonato (6 x 6 x 6 cm., largo x ancho x altura) de color rojo.
 - Un prisma rectangular de madera (1.5 x 2 x 10 cm., largo x ancho x altura) pintado con tinta para madera de color verde.
- Videgrabadora de la marca **PANASONIC**[®] modelo LUMIX DMC-G3.
- Computadora laptop de la marca **TOSHIBA**[®] modelo Satellite C55B.
- Cámara Web de la marca **Microsoft**[®] modelo LifeCam HD-3000.
- Centrífuga de la marca **VELAB**[®] modelo VE-4000.
- Jeringas para insulina de la marca **BD Ultra Fine**[®].
- Microtubos de la marca **CRM Globe**[®].
- Kit ELISA Corticosterona **ARBOR ASSAY**[®].
- Lector de microplacas de la marca **HLAB**[®] modelo HREADER1.
- Agitador orbital de la marca **DLAB**[®] modelo SK-0180-E.

6.4. Estresores

Los sujetos fueron expuestos a una Batería de Estrés Crónico Impredecible (CUSB, por sus siglas en inglés) con duración de diez días consecutivos desarrollada en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología y Estimación Temporal de la Facultad de Psicología, UNAM (Rosemberg-García, Torres-Carrillo, Ruiz-García, Paz-Trejo & Sánchez-Castillo, 2013; Ruiz-García, Torres-Carrillo, Rosemberg-García, Paz-Trejo & Sánchez-Castillo, 2013; Sánchez-Castillo et al., 2015; Torres-Carrillo, 2016a; Torres-Carrillo et al., 2016b; Torres-Carrillo et al., 2017; Vergel-Munguía et al., 2018; Sánchez-Castillo, Rojas-Lita, Ortega-Tinoco, Paz-Trejo & Velázquez-Martínez, 2018; Torres-Carrillo et al., 2018a; Torres-Carrillo et al., 2018b; Valencia-Flores, 2018a; Valencia-Flores, Torres-López,

Galicia-Castillo, Paz-Trejo & Sánchez-Castillo, 2018b). La batería consiste en la presentación aleatoria de distintos estresores con el fin de evitar la predicción del orden de presentación y, por consiguiente, no generar habituación en los sujetos experimentales. Los estresores consisten en la restricción de movimiento durante 20 min. (3 veces al día); nado forzado en agua fría ($16\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 5 min.; cama inclinada (45°) durante 3h o toda la noche (12h); cama mojada durante 3h o toda la noche (12h); luces prendidas toda la noche (12h); y, privación de agua durante la noche (12h). En la Tabla 1 se muestra en orden los días, la secuenciación y el horario de presentación de los estresores.

Tabla 1. Batería de Estrés Crónico Impredecible (CUSB).

Día	Estresores
1	Restricción de movimiento 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h).
2	Cama mojada 3 h (12:00 h); Luces prendidas toda la noche 12 h (20:00 h).
3	Restricción de movimiento 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h).
4	Cama inclinada 45° 3 h (12:00 h); Cama mojada toda la noche 12 h (20:00h).
5	Agua fría 16°C 5 min (13 h); Luces prendidas toda la noche 12 h (20:00 h).
6	Cama mojada 3 h (12:00 h); Privación de agua toda la noche 12 h (20:00 h).
7	Restricción de movimiento 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h).
8	Cama inclinada 45° 3 h (12:00 h); Cama mojada toda la noche 12 h (20:00 h).
9	Agua fría 16°C 5 min (13 h); Luces prendidas toda la noche 12h (20:00 h).
10	Restricción de movimiento 20 min (9:00 h; 14:00 h; 19:00 h).

La CUSB consta de la presentación aleatoria de distintos estresores a lo largo de 10 días. Desarrollada en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología y Estimación Temporal de la Facultad de Psicología, UNAM (Rosemberg-García et al., 2013; Ruiz-García et al., 2013; Sánchez-Castillo et al., 2015; Torres-Carrillo, 2016a; Torres-Carrillo et al., 2016b; Torres-Carrillo et al., 2017; Vergel-Munguía et al., 2018; Sánchez-Castillo et al., 2018; Torres-Carrillo et al., 2018a; Torres-Carrillo et al., 2018b; Valencia-Flores, 2018a; Valencia-Flores et al., 2018b).

El otro tipo de estresor al que fueron expuestos los sujetos fue la Exposición a Orina de Depredador (PSS, por sus siglas en inglés) que consiste en la exposición del roedor en una caja de policarbonato en el cual se colocó un contenedor con una esponja impregnada con 10 ml. de orina de lince (“Bobcat PEE shots” [PredatorPee®, U.S.A.]) durante 10 min. La elección del tiempo está dada por la estandarización previa en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología y Estimación Temporal de la Facultad de Psicología, UNAM (Zarate-González, 2016; Migliaro et

al., 2016; Torres-Carrillo et al., 2017; Migliaro, 2018a; Migliaro, Paz-Trejo, Galicia-Castillo & Sánchez-Castillo, 2018b; Torres-Carrillo et al., 2018).

6.5. Batería de Evaluación Conductual

Esta batería consta de seis pruebas conductuales que fueron contrabalanceadas entre grupos e intra-grupos, para evitar un efecto de la secuencia de pruebas. En el Apéndice 1 se detallan los protocolos a seguir para cada una de las pruebas. De forma general todas las sesiones de cada una de las pruebas (excepto prueba de sacarina) se grabaron para su posterior registro (manual) y análisis de cada conducta evaluada.

En la tarea de campo abierto (Figura 2) se obtiene información acerca de la presencia de conductas tipo ansiedad y motoras. Las mediciones que se evalúan se define congelamiento como la presencia de movimientos vegetativos únicamente (respiración), inmovilidad como la presencia de movimientos de husmeo y vibras sin mover el cuerpo o extremidades. El acicalamiento es la presencia de conductas de autoaseo en los sujetos. Mientras que el erguimiento es posicionarse sobre los cuartos traseros con o sin apoyo.

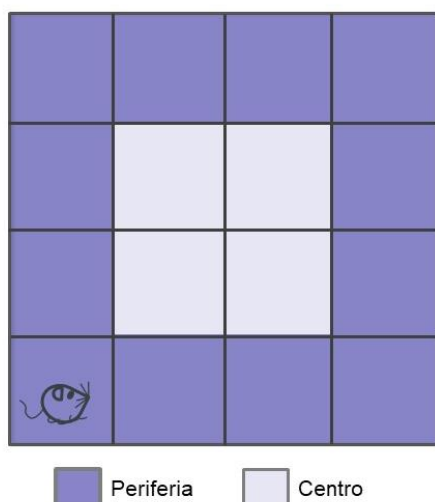


Figura 2. Esquema de la prueba de campo abierto

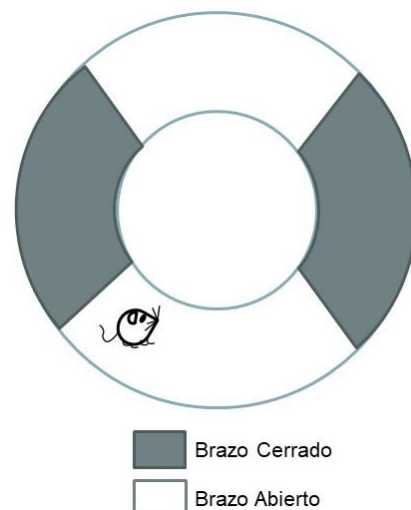


Figura 3. Esquema de la prueba de laberinto cero

La prueba de laberinto cero (Figura 3) evalúa conductas tipo ansiedad mediante el registro del tiempo de permanencia y número de entradas a brazos cerrados o abiertos. Definiendo una entrada como tener las cuatro patas del sujeto en uno de los brazos. Mientras que la evaluación de riesgo como la exploración teniendo la cabeza y hasta dos cuartos delanteros en un brazo abierto desde un brazo cerrado.

En la tarea de preferencia de sacarina (Figura 4) se utiliza para evaluar anhedonia, catalogada como una conducta tipo depresión. Durante la realización de esta prueba se coloca a los sujetos en cajas individuales. La concentración para realizar la solución de sacarina es de 3 mg. por cada 1000 ml. de agua. Es importante aclarar que en cada sesión el contenedor con el líquido se contrabalancea la posición en la que es colocada entre sujetos.

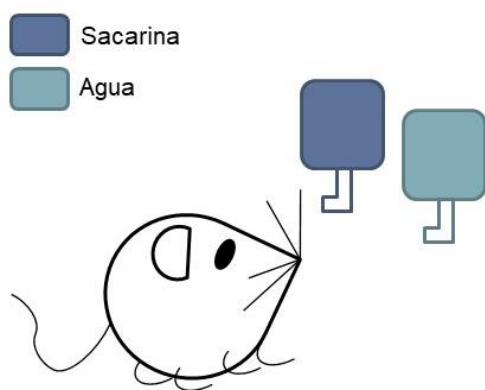


Figura 4. Esquema de la prueba de preferencia de sacarina

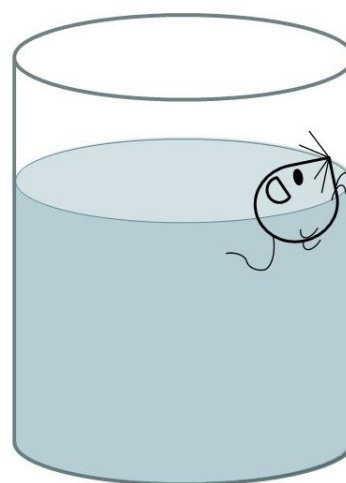


Figura 5. Esquema de la prueba de nado forzado

La tarea de nado forzado (Figura 5) permite evaluar conductas tipo depresión. Se utiliza un cilindro de policarbonato (medidas) lleno de agua a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta los 32 cm. de la altura del cilindro. En la sesión de prueba de dicha tarea se registra el tiempo que permanecen realizando las siguientes conductas: inmovilidad, nado y

escalamiento. La inmovilidad se define como aquellos movimientos mínimos necesarios para mantenerse a flote. La conducta de nado es definida como movimientos de desplazamiento en el agua. Escalamiento se considera como movimientos enérgicos contra las paredes del cilindro.

El laberinto de Barnes (Figura 6) permite evaluar memoria espacial. Se registra la latencia de escape y el número de errores. La latencia se mide a partir de que se coloca al sujeto en el centro de la plataforma del laberinto hasta que entra al agujero de escape. El número de errores pueden ser: errores de omisión, que son cuando el sujeto pasa por el agujero de escape y no entra en él; y, errores por aproximación, que son cuando se acerca a la circunferencia de los agujeros que no son el de escape. La posición del agujero de escape fue contrabalanceada entre e intragrupos.

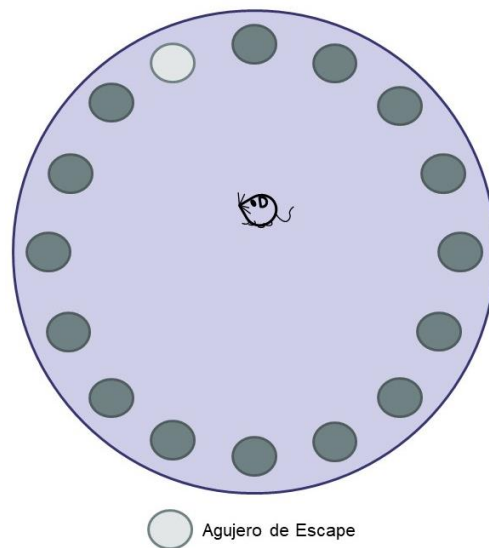


Figura 6. Esquema de la prueba de laberinto de Barnes

Por último, la tarea de reconocimiento de objeto novedoso (Figura 7) se usa para evaluar memoria de reconocimiento. Está conformada por cuatro sesiones. La primera sesión es de habituación en la caja sin objetos para prevenir neofobia. Los objetos se colocaron en esquinas contrarias a 25 cm. de distancia de las paredes de la arena de campo abierto contrabalanceando la posición entre grupos e intra-grupos, se adhirieron a la caja con velcro para evitar que los sujetos las movieran.

Se toma en cuenta el tiempo que permanece explorando cada uno de los objetos (objeto familiar y novedoso) considerando como exploración que la nariz se encuentre a una distancia ≥ 1 cm. del objeto o tocando el mismo.

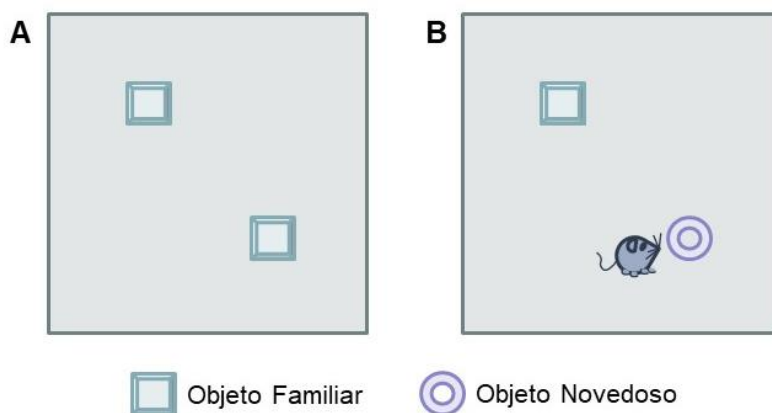


Figura 7. Esquema de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso
Sesión en la que se colocan objetos iguales (A) y la sesión de prueba en la que se coloca un objeto igual (familiar) y uno diferente (novedoso) (B).

6.6. Evaluación de niveles de corticosterona

6.6.1. Toma de muestra sanguínea

Treinta minutos después de concluida la exposición al estresor se inmovilizó a los sujetos experimentales con un paño y velcro para extraer la muestra sanguínea. Se localizó una de las venas laterales de la cola y se limpió la zona con una solución antiséptica para luego proceder a realizar la extracción de la muestra (250 μ l.) con una jeringa. Una vez extraída la muestra se colocó en un tubo sumergido en hielo para centrifugarlo a 1500 rpm. durante 10 minutos. Después se separó el sobrenadante y se transfirió a un microtubo para almacenarlo a -20°C hasta su uso. Después de haber extraído la muestra se dejó reposar al sujeto antes de colocarlo en su caja-habitación.

6.6.2. ELISA

Se utilizó el suero sanguíneo y el ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del kit para corticosterona de ARBOR ASSAY® (ver Apéndice 2).

6.7. Análisis estadístico

Se utilizó el software SigmaPlot versión 11.0 para realizar todos los análisis estadísticos. Se realizó un ANOVA de 2 factores (estresor x sexo) para cada una de las conductas evaluadas en las pruebas de campo abierto, laberinto de Barnes, reconocimiento de objetos, prueba de sacarina y laberinto cero. De la misma forma para los niveles de corticosterona obtenidos. Todas las comparaciones post-hoc se llevaron a cabo con la prueba de Tukey. Los datos son presentados como la media $\pm$ error estándar.

6.8. Diseño experimental

El diseño experimental del presente estudio se detalla en la Tabla 2.

Este diseño consta de un grupo control (no exposición a estrés), grupo exposición a la batería de estrés crónico impredecible (CUSB) y grupo exposición a orina de depredador (PSS). Cada uno de esos grupos estará dividido en machos y hembras para conformar seis grupos en total.

Tabla 2. Diseño experimental del presente estudio.

Sexo	Estresor			
♀	+	CUS	+	EVALUACIÓN CORTICOSTERONA
♂	+	CUS	+	EVALUACIÓN CONDUCTUAL
♀	+	PSS	+	EVALUACIÓN CORTICOSTERONA
♂	+	PSS	+	EVALUACIÓN CONDUCTUAL

Diseño experimental del presente estudio. ♀: hembra; ♂: macho; **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador.

En todos los grupos fueron evaluados los niveles de corticosterona después de la exposición a los estresores (para el grupo control, se permitió pasar los mismos días de la exposición a estrés para los grupos PSS y CUS, sin perturbar a los sujetos antes de tomar las muestras sanguíneas). Posteriormente, mediante la Batería de Evaluación Conductual se evaluaron en tres ámbitos: conductas tipo ansiedad, conductas tipo depresión y cognición.

7. RESULTADOS

7.1. Efectos del estrés en conductas tipo ansiosas

El ANOVA de dos vías de los datos de la prueba de campo abierto mostraron diferencias significativas en el número de cruces (Figura 1) para el factor sexo [$F_{(1,84)}=11.278$, $p=0.001$] y el factor tipos de estresor [$F_{(2,84)}=6.738$, $p=0.002$], pero no en la interacción de ambos factores.

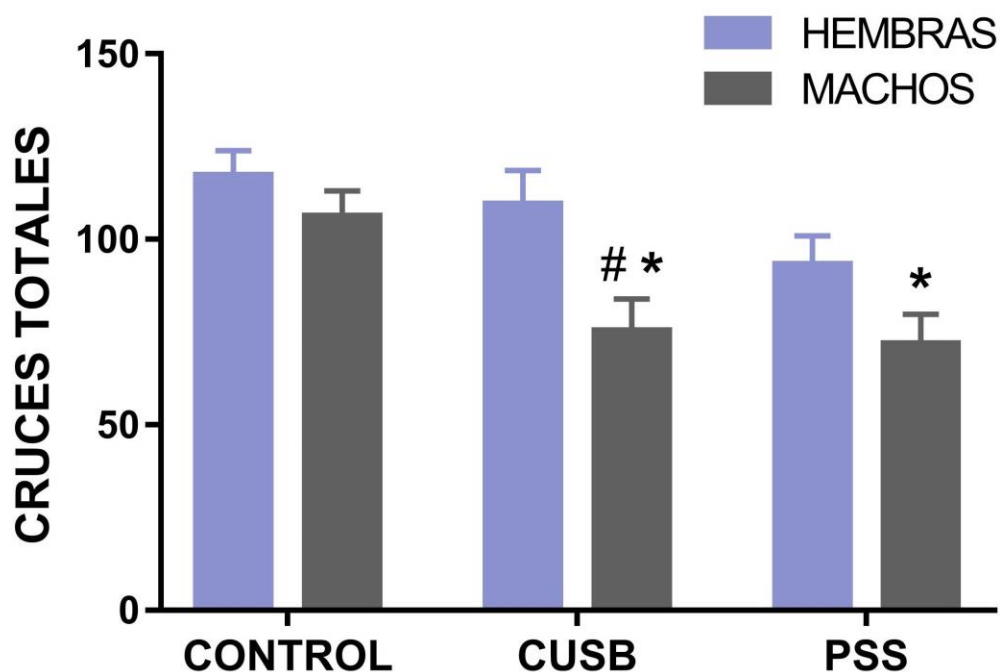


Figura 8. Cruces totales en la arena de campo abierto.

Número de cruces en la prueba de campo abierto. * vs. Control; # vs. Hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

El análisis post hoc reveló diferencias entre los grupos. Los machos expuestos a la CUSB tienen menor número de cruces en comparación con los machos del grupo control y las hembras expuestas a la CUSB (Figura 8). Del mismo modo, los machos expuestos a PSS presentan menor número de cruces en comparación con machos no expuestos a estresores (Figura 8). Por otra parte, se observa que los machos expuestos a CUSB tienen menor número de cruces que las hembras expuestas a CUSB (Figura 8).

En el caso del porcentaje de tiempo que permanecieron en el área central de la arena de campo abierto (Figura 9) el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas en el factor tipos de estresores [$F_{(2,84)} = 8.015$, $p < 0.001$], pero no en el factor sexo ni en la interacción de ambos factores. El análisis post hoc no reveló diferencias entre grupos.

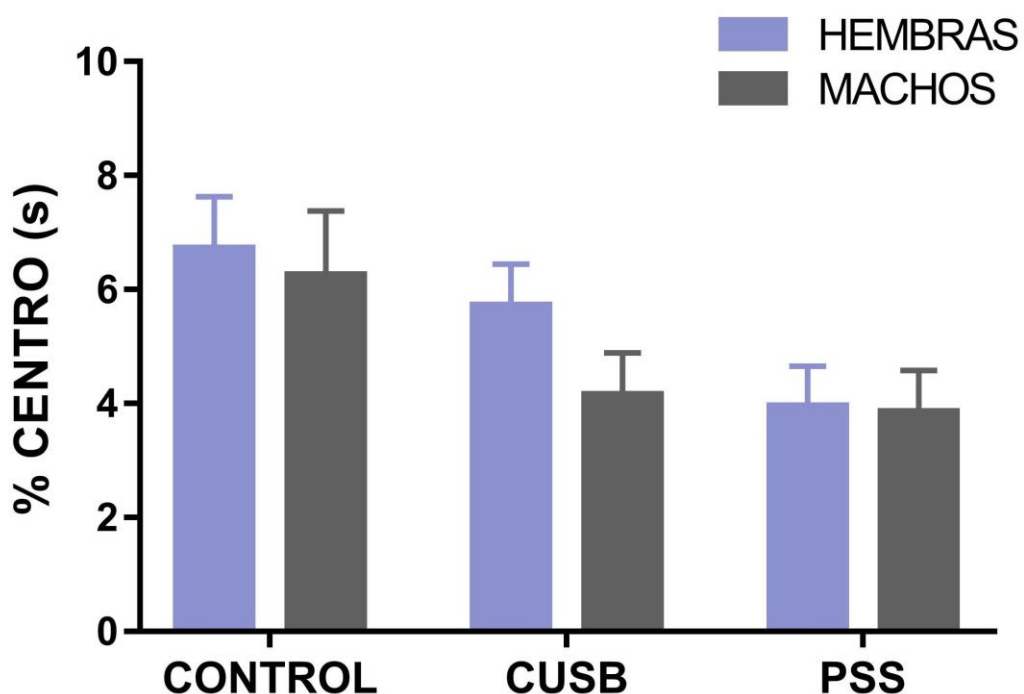


Figura 9. Tiempo de permanencia en el área central de campo abierto. Porcentaje de tiempo que los sujetos pasaron en el área central en la prueba de campo abierto. **CUSB:** Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS:** Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error Estándar.

En la Figura 9 se puede observar que machos y hembras estresados (expuestos a CUSB o a PSS) permanecen menor tiempo en el área central en comparación con machos y hembras no estresados.

En el porcentaje de tiempo que pasan inmóviles en la tarea de Campo Abierto el ANOVA de dos vías arrojó que no existen diferencias en ninguna de las variables ni en la interacción de las mismas [$F_{(2,84)} = 0.846$, $p = 0.433$]. Sin embargo, en la gráfica se puede observar que las hembras expuestas a CUSB disminuye el tiempo de inmovilidad. Mientras que en hembras expuestas a PSS incrementa el

tiempo que permanecen inmóviles. Por otra parte, los machos de los grupos control y PSS tienden a presentar menor inmovilidad que las hembras de los grupos respectivamente (Figura 10).

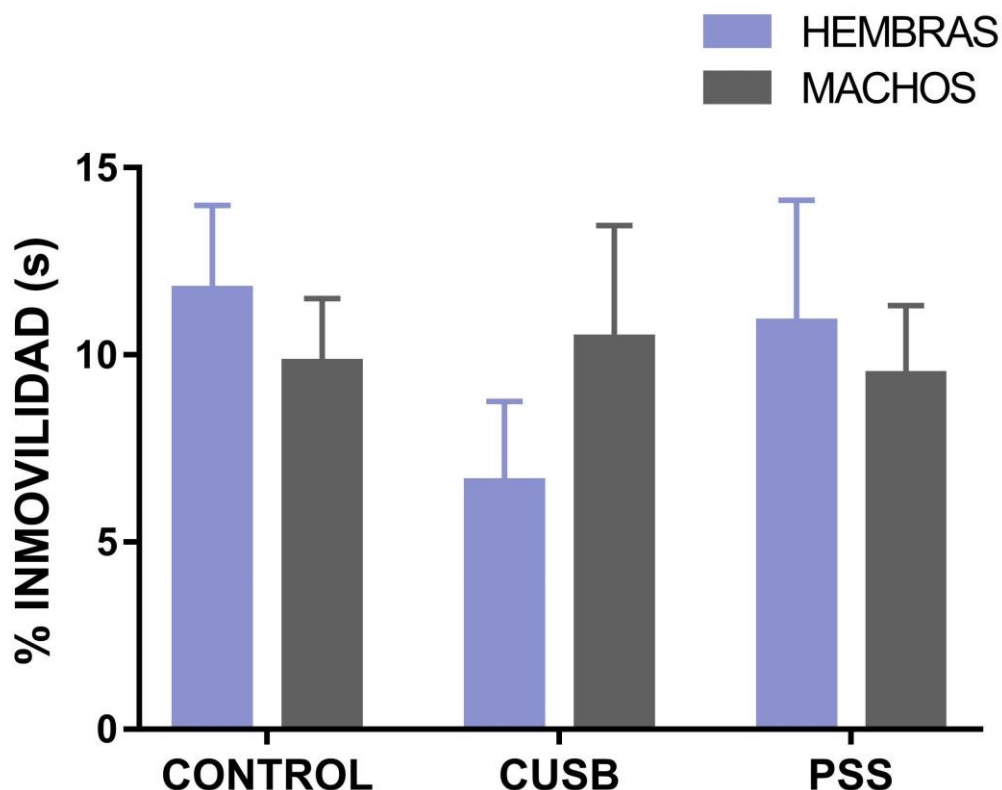


Figura 10. Tiempo de inmovilidad en la prueba de campo abierto.

Porcentaje de tiempo que los sujetos pasaron inmóviles en la prueba de campo abierto. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

En el caso del porcentaje de tiempo que permanecen acicalándose en la tarea de campo abierto en el ANOVA de dos vías se encontraron diferencias significativas en el factor sexo [$F_{(1,84)}=7.739$, $p=0.007$] y en la interacción de ambos factores [$F_{(2,46)}=3.868$, $p=0.025$], pero no para el factor tipos de estresor (Figura 11).

El análisis post hoc reveló que los machos expuestos a CUSB pasan más tiempo acicalándose en comparación con las hembras expuestas a CUSB y los machos no estresados (Figura 11).

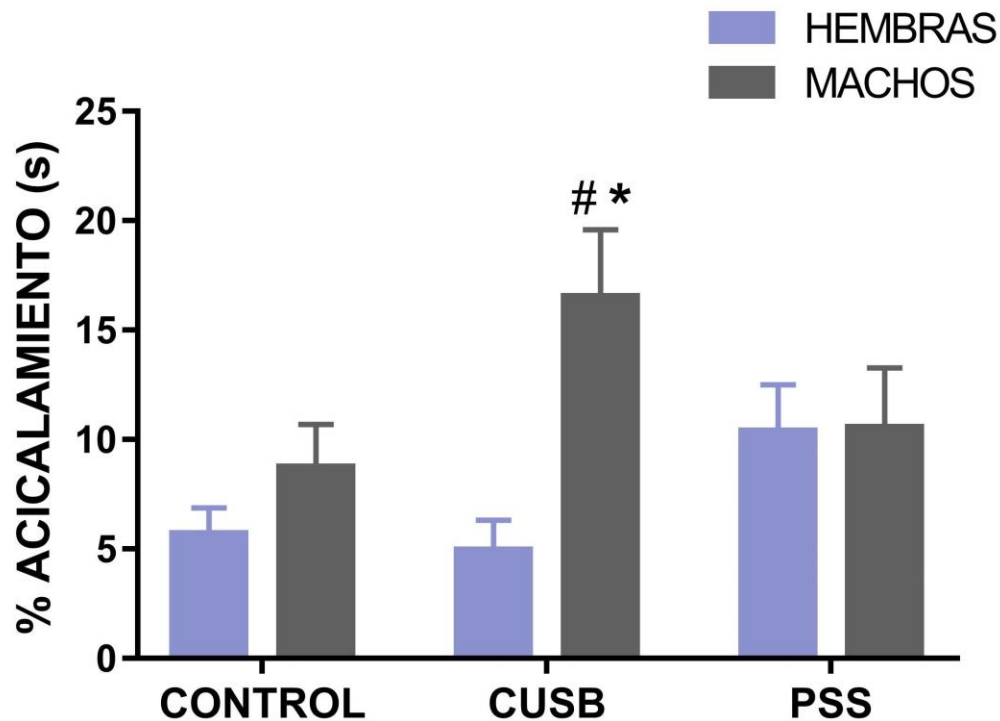


Figura 11. Tiempo de acicalamiento en la tarea de campo abierto.

Porcentaje de tiempo que los sujetos pasaron acicalándose en la prueba de campo abierto.
 * vs. Control; # vs. Hembras **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible;
PSS: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

Respecto al número de bolos fecales en la tarea de campo abierto el ANOVA de dos vías no reveló efectos significativos para ninguno de los factores ni en la interacción de los mismos [$F_{(1,28)}=1.538$, $p= 0.236$]. Sin embargo, en la Figura 12 se puede observar que los machos y hembras expuestos a PSS y los machos expuestos a CUSB tuvieron un mayor número de bolos fecales al compararlos con sus respectivos grupos controles.

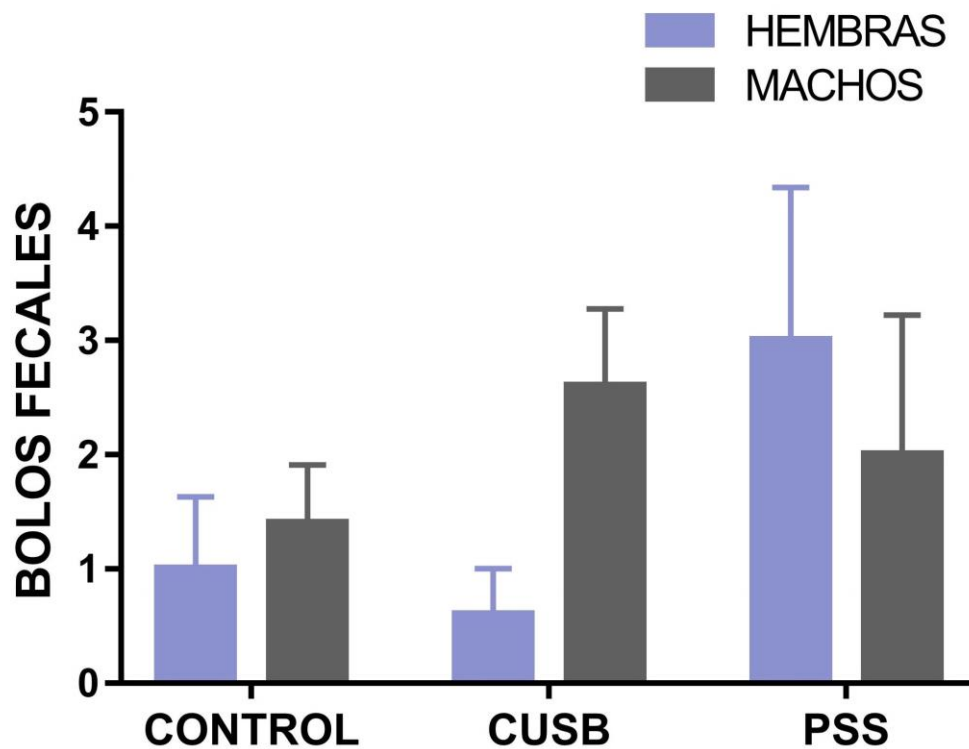


Figura 12. Bolos fecales en la tarea de campo abierto.

Número de bolos fecales en la prueba de campo abierto. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

En la prueba de laberinto cero en el ANOVA de dos vías no se encontraron efectos significativos en la interacción de las variables para el tiempo de permanencia en brazo cerrado [$F_{(2,56)} = 3.872$, $p < 0.05$] (Figura 15A) y en el tiempo de permanencia en brazo abierto [$F_{(2,56)} = 3.872$, $p < 0.05$] (Figura 13). Sin embargo, se puede observar una disminución en el tiempo de permanencia en el brazo abierto en los grupos CUSB y PSS comparados con el grupo control. Así mismo, se puede observar que las hembras expuestas a CUSB pasan menos tiempo en el brazo abierto que los machos expuestos al mismo estresor.

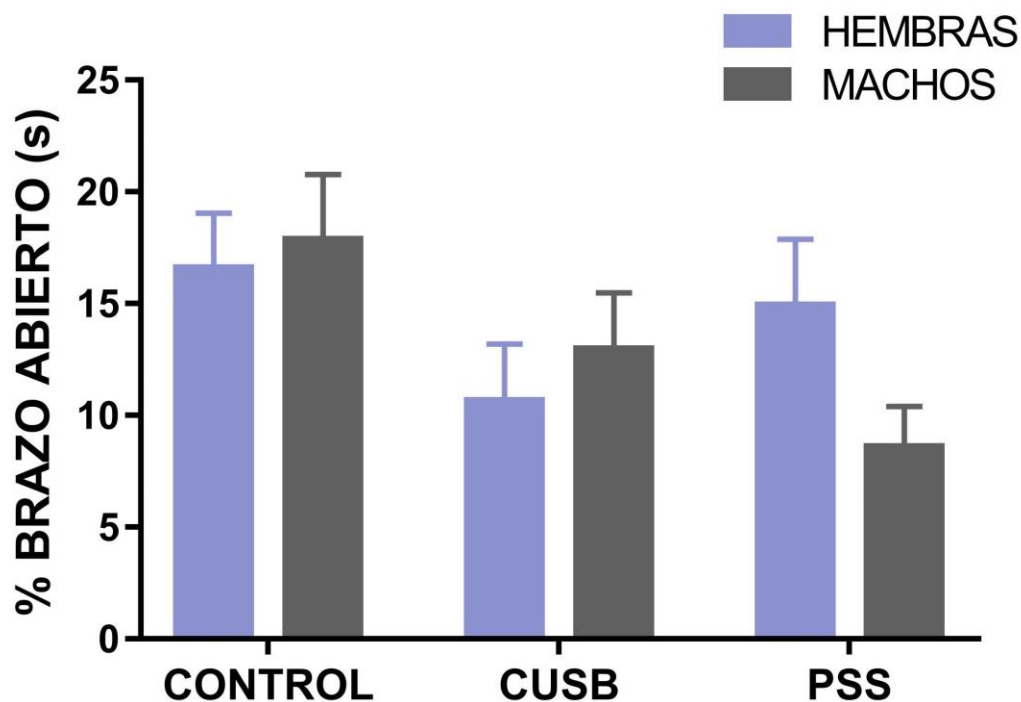


Figura 13. Tiempo de permanencia el brazo abierto del laberinto cero. Porcentaje de tiempo que los sujetos pasaron en el brazo abierto en la prueba de laberinto cero. * vs. Control. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

En el caso del número de entradas al brazo abierto en la prueba de laberinto cero (Figura 14) el ANOVA de dos vías arrojó que no hay efecto significativo de la interacción entre ambas variables [$F_{(2,82)} = 2.927$, $p = 0.060$]. Empero, se puede observar una disminución de las entradas al brazo abierto en los grupos de machos y hembras expuestos a estrés. En el caso del número de entradas al brazo cerrado (Figura 15B) el ANOVA de dos vías demostró que existe efecto significativo de la variable tipo de estresor [$F_{(2,82)} = 3.335$, $p = 0.041$] pero no de la variable sexo o de la interacción de ambas variables. Los machos del grupo PSS tienen menor número de entradas al brazo cerrado en comparación con los machos del grupo control y las hembras expuestas a PSS (Figura 15B).

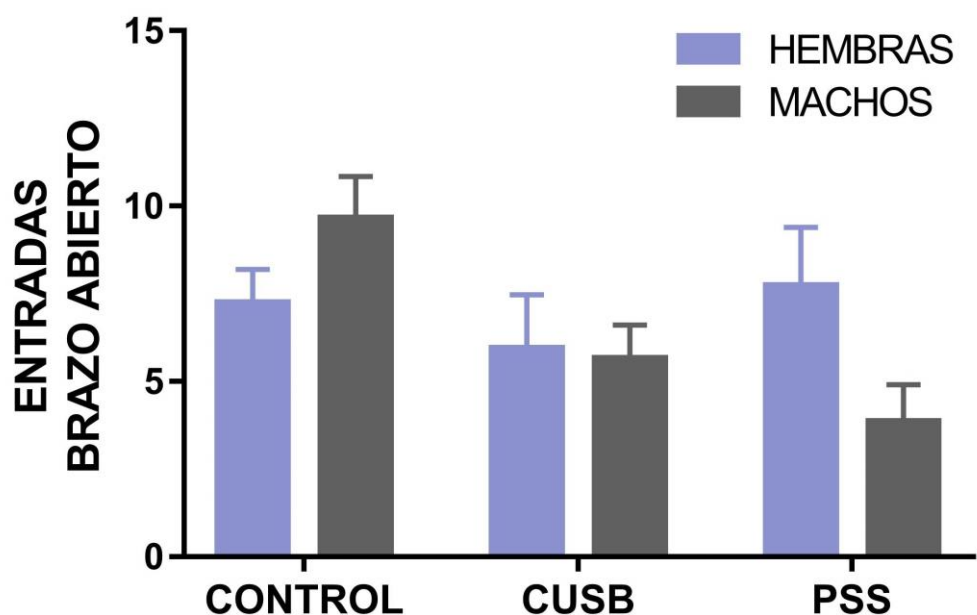


Figura 14. Número de entradas en laberinto cero.

Número de entradas al brazo abierto en la prueba de Laberinto Cero. * vs. Control; # vs. Hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

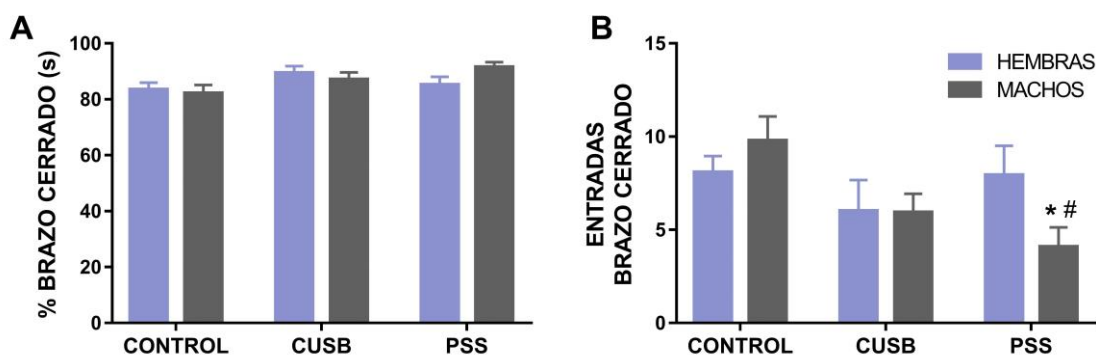


Figura 15. Tiempo de permanencia y número de entradas al brazo cerrado en laberinto cero.

Tiempo de permanencia (A) y número de entradas (B) al brazo cerrado en la prueba de laberinto cero. * vs. Control; # vs. Hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

El ANOVA de dos vías que se realizó en las evaluaciones ambientales (Figura 16) en la prueba de laberinto cero se encontraron efectos significativos en la variable

sexo [$F_{(1,82)}=9.824$, $p=0.002$] pero no en la variable tipo de estresor o en la interacción de ambas. De acuerdo con el análisis post hoc los machos del grupo control y expuestos a PSS hacen más evaluaciones ambientales que las hembras control y expuestas a PSS (Figura 16).

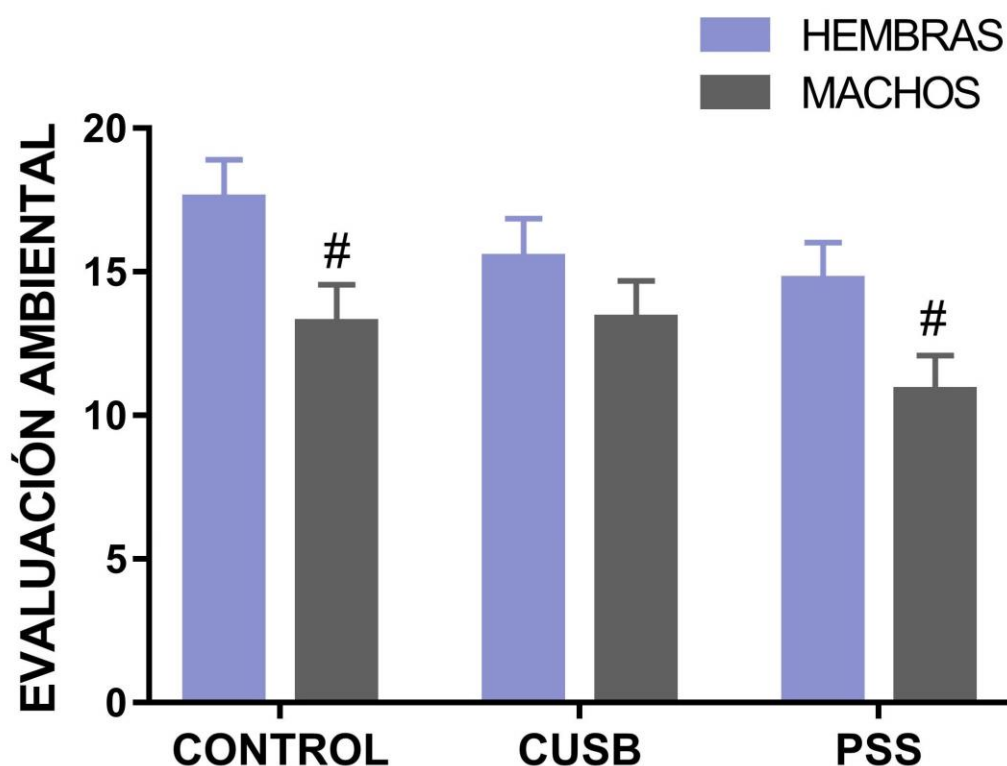


Figura 16. Evaluación ambiental en laberinto cero. Número de entradas al brazo abierto en la prueba de laberinto cero. # vs. Hembras. **CUSB:** Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS:** Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

7.2. Efectos del estrés en conductas tipo depresivas

En la prueba de preferencia de sacarina (Figura 17) en el ANOVA de dos vías realizado no se observó un efecto significativo de la variable sexo o de la interacción entre variables, sin embargo, si se encontraron efectos de la variable tipo de estresor [$F_{(2,85)}=5.002$, $p=0.009$]. Al realizarse el análisis post hoc se observa que los machos del grupo CUSB y las hembras del grupo PSS prefieren menos la solución de sacarina comparados con su respectivo grupo control

(Figura 10). En el caso de las hembras expuestas a CUSB también se observa que prefieren más la solución de sacarina con respecto a los machos expuestos a CUSB (Figura 10).

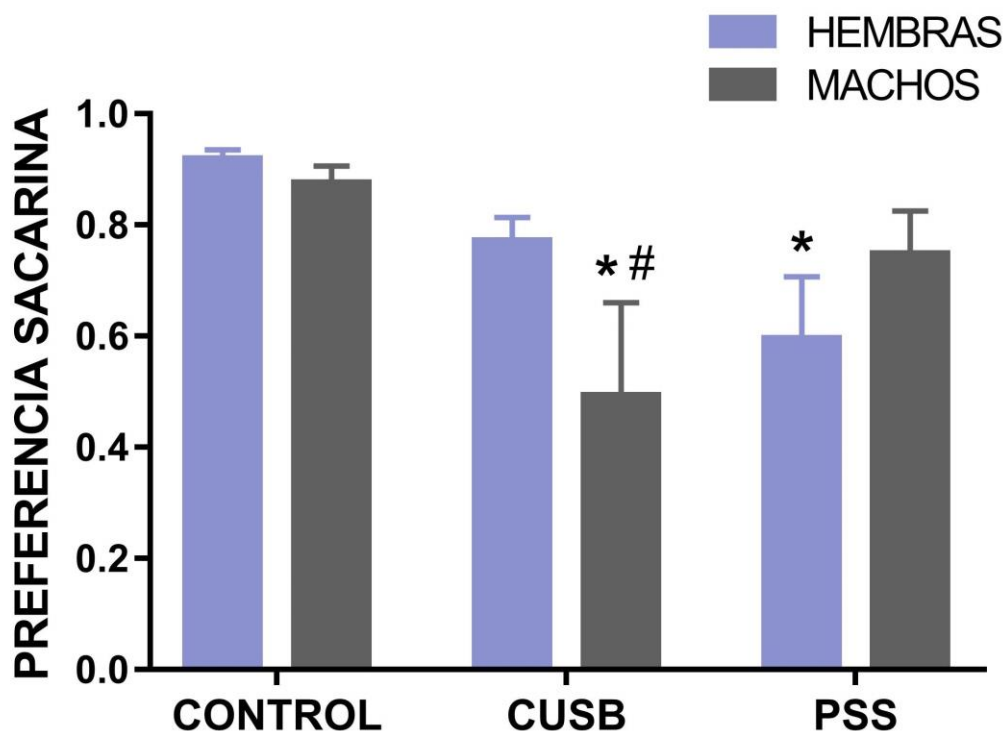


Figura 17. Índice de preferencia de sacarina.

Índice de preferencia de sacarina obtenido en la prueba de preferencia de sacarina. El Índice se obtuvo a partir de la siguiente fórmula: Índice de Preferencia = $\frac{S-A}{S+A}$; donde: **S** es el consumo de sacarina y **A** corresponde al consumo de agua.

* vs. Control; # vs. Hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

Por otra parte, en el consumo de la solución de sacarina y agua (Figura 18) en la prueba de preferencia de sacarina el ANOVA de dos vías realizado permite observar efectos significativos de la variable sexo [$F_{(1,85)}=8.321$, $p=0.005$] y la interacción de ambas variables [$F_{(2,85)}=6.009$, $p=0.004$] pero no en la variable tipo de estresor por sí sola en el consumo de sacarina (Figura 18A). El análisis post hoc mostró que los machos expuestos a CUSB consumen más solución de sacarina que los machos no estresados (Figura 18A). También se observó que los

machos del grupo control y los machos expuestos a PSS consumen más sacarina que las hembras del grupo control y las hembras expuestas a PSS (Figura 18A).

En el ANOVA de dos vías realizado para evaluar el consumo de agua (Figura 18B) se encontró un efecto de la variable tipo de estresor [$F_{(2,85)}=4.255$, $p=0.018$] y no en la variable sexo ni en la interacción de ambas.

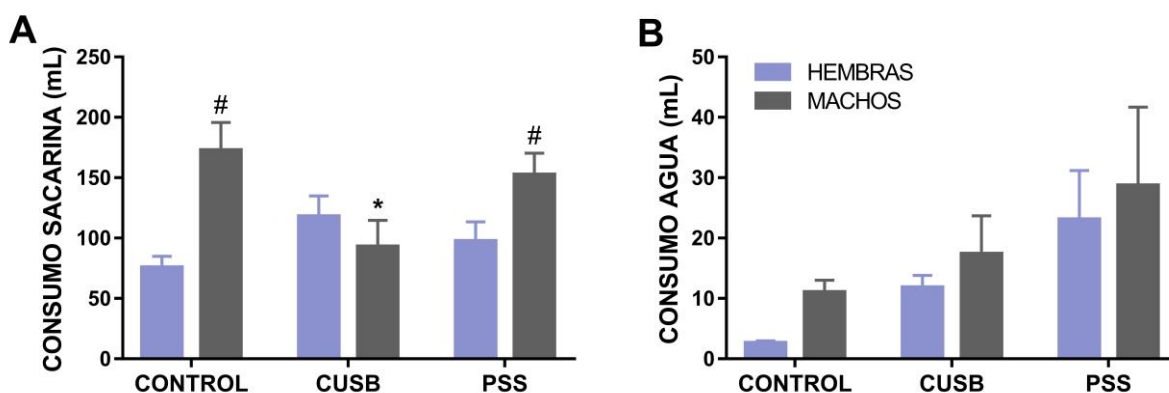


Figura 18. Consumo de líquido en la prueba de preferencia de sacarina.

Consumo de solución de sacarina (A) y el consumo de agua (B) obtenidos en la prueba de preferencia de sacarina. * vs. Control; # vs. Hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

A pesar de que el análisis post hoc de Tukey no reveló diferencias, se puede observar que los machos y hembras del grupo CUSB y PSS tomaron más agua que los grupos no estresados (Figura 18B).

En la tarea de nado forzado el ANOVA de dos vías realizado para evaluar el porcentaje de tiempo de inmovilidad (Figura 19) se encontró un efecto en la interacción entre los factores sexo y tipo de estresor [$F_{(2,83)}=6.949$, $p=0.002$] pero no en los factores por separado. El análisis post hoc indica que los machos del grupo PSS permanecen menos tiempo inmóviles en comparación con los machos del grupo CUSB (Figura 19).

Por otro lado, los machos expuestos a CUSB muestran mayor porcentaje de inmovilidad en comparación con las hembras expuestas a CUSB (Figura 19). En el

caso de los machos expuestos a PSS muestran menor porcentaje de tiempo inmóviles que las hembras expuestas a PSS (Figura 19).

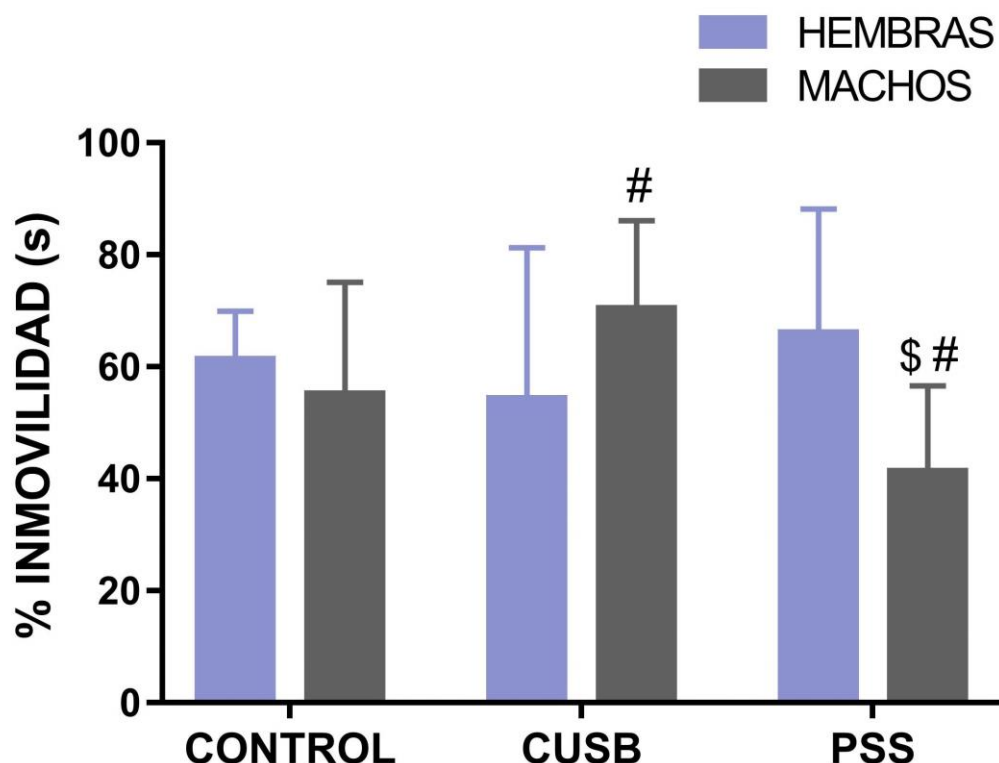


Figura 19. Tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado.

Porcentaje de tiempo que permanecen inmóviles en la prueba de nado forzado. \$ vs. CUS; # vs. Hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

El ANOVA de dos vías no reveló efectos significativos de la interacción de las variables en la evaluación del porcentaje de tiempo de nado [$F_{(2,83)}=2.945$, $p=0.058$] (Figura 20A) ni en el porcentaje de tiempo que pasan en escalamiento [$F_{(2,83)}=2.600$, $p=0.081$] (Figura 20B). Empero, podemos observar una tendencia a que los machos PSS pasan más tiempo nadando mientras que los machos expuestos a CUSB pasan menos tiempo nadando en comparación con los machos del grupo control.

En el caso del tiempo de escalamiento se observa una tendencia a que las hembras del grupo PSS pasan menos tiempo escalando en comparación con las hembras control.

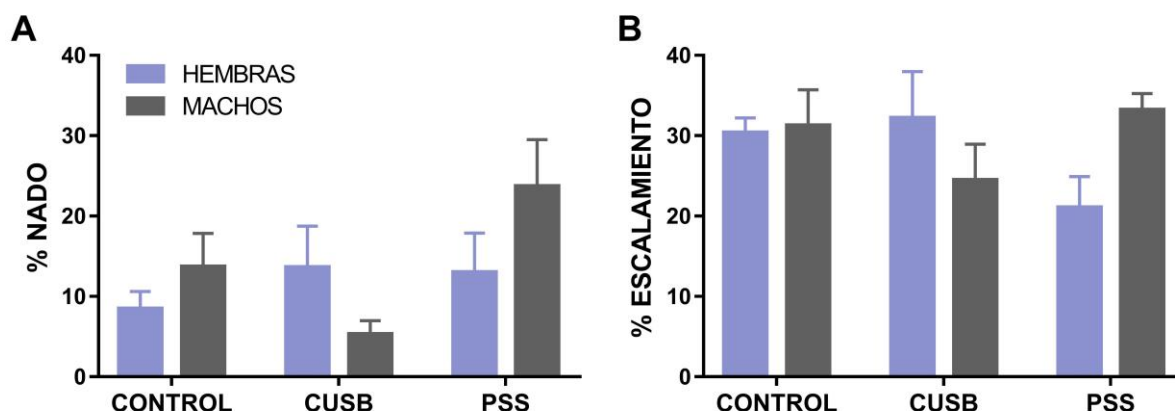


Figura 20. Tiempo de nado y escalamiento en la prueba de nado forzado.

Porcentaje de tiempo que permanecen nadando (A) o escalando (B) en la prueba de nado forzado. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

7.3. Efectos del estrés en cognición

En la prueba de laberinto de Barnes (Figura 21) el ANOVA de dos vías reveló que la latencia de escape no se ve afectada por las variables tipo de estresor o sexo ni la interacción de ambas (Figura 21A).

Mientras que en el número de errores se observaron efectos significativos de la variable sexo [$F_{(1,56)}=13.890$, $p < 0.05$], pero no del tipo de estresor o la interacción de ambas variables. El análisis post hoc indicó que las hembras del grupo CUSB cometen más errores que las hembras del grupo control (Figura 14B). Mientras que los machos expuestos a CUSB presentan menos errores que las hembras expuestas a CUSB (Figura 21B).

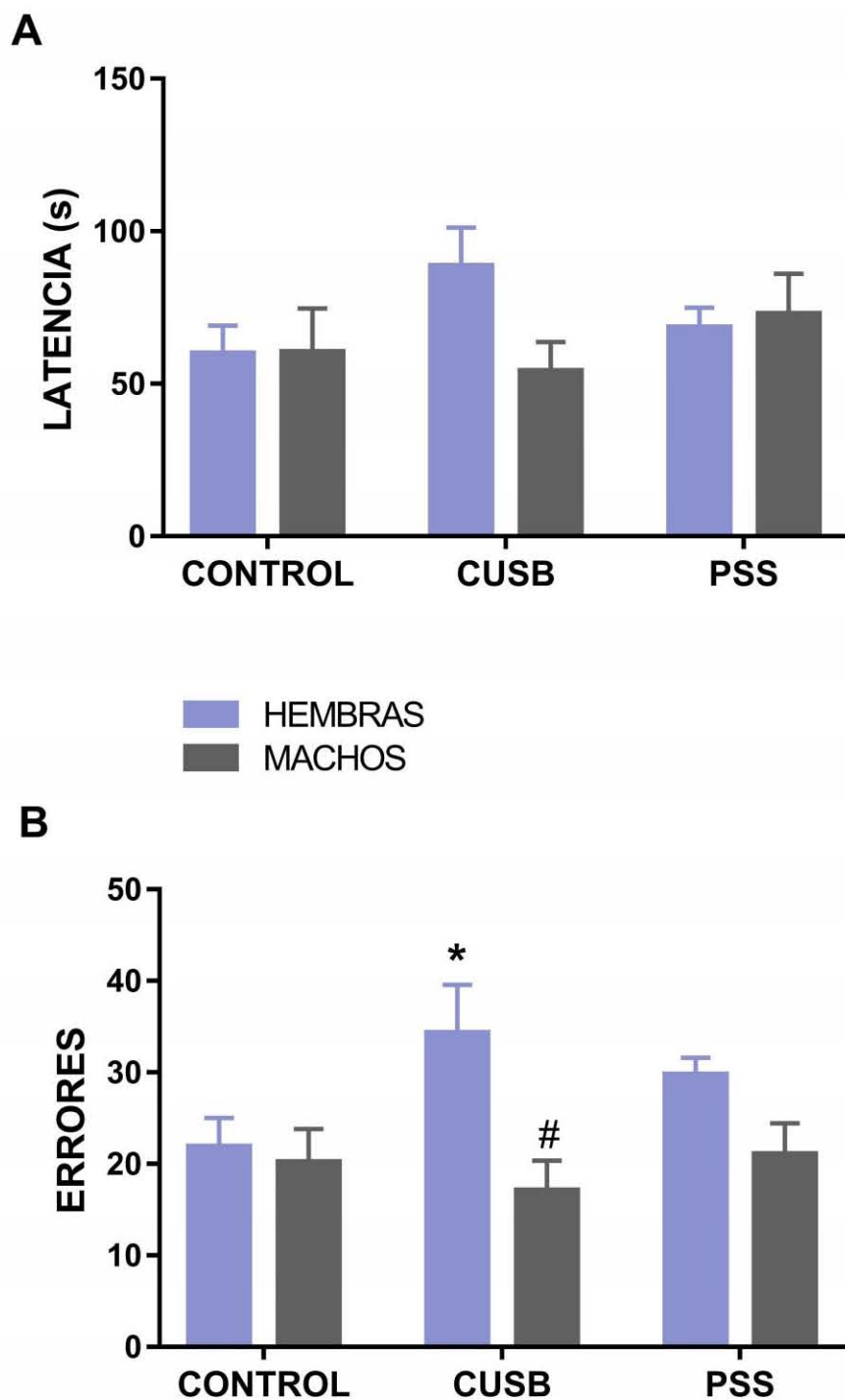


Figura 21. Laberinto de Barnes.

Latencia de escape (A) y la frecuencia de errores (B) obtenidos en la sesión 4 de la prueba de laberinto de Barnes. * vs. Control; # vs. Hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

Por otra parte, la curva de aprendizaje (Figura 22) obtenida a partir de los datos obtenidos en la prueba de laberinto de Barnes y el ANOVA de tres vías que se realizó indica que el número de sesión [$F_{(2,256)}=36.003$, $p < 0.001$] tiene efectos en la latencia de escape. El análisis post hoc reveló que la latencia de escape en machos y hembras disminuye significativamente a lo largo de las sesiones (Figura 22A).

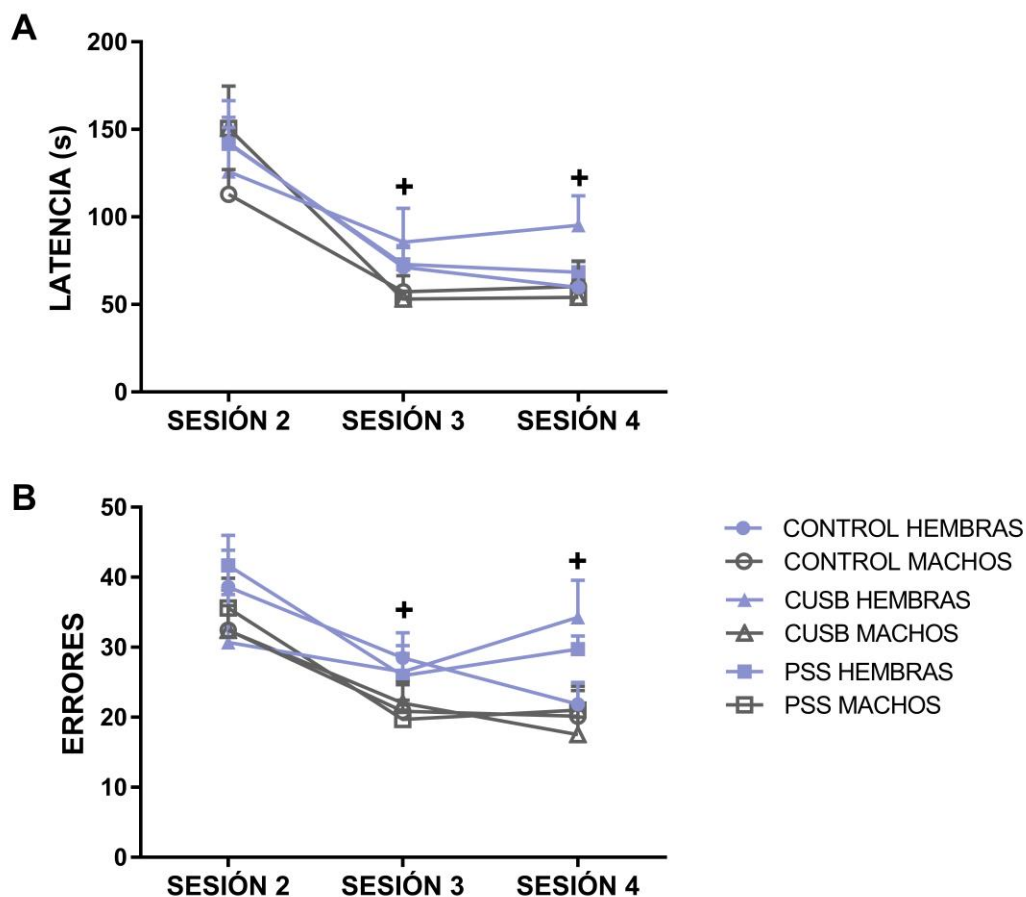


Figura 22. Curva de aprendizaje de la prueba de laberinto de Barnes

Curva de aprendizaje de la latencia de escape (A) y la frecuencia de errores (B) obtenidos durante las sesiones de la prueba de laberinto de Barnes. + vs. Sesión 2. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

En el caso de la curva de aprendizaje el ANOVA de tres vías demostró que la variable sexo [$F_{(1,256)}=11.247$, $p < 0.001$] y número de sesión [$F_{(2,256)}=14.370$, $p < 0.001$] tienen efectos significativos en el número de errores en la prueba de

laberinto de Barnes (Figura 22). El análisis post hoc indica que el número de errores en machos disminuye a lo largo de las sesiones, mientras que, en el caso de las hembras a pesar de que los errores disminuyen a lo largo de las sesiones éstas cometen mayor número de errores que los machos.

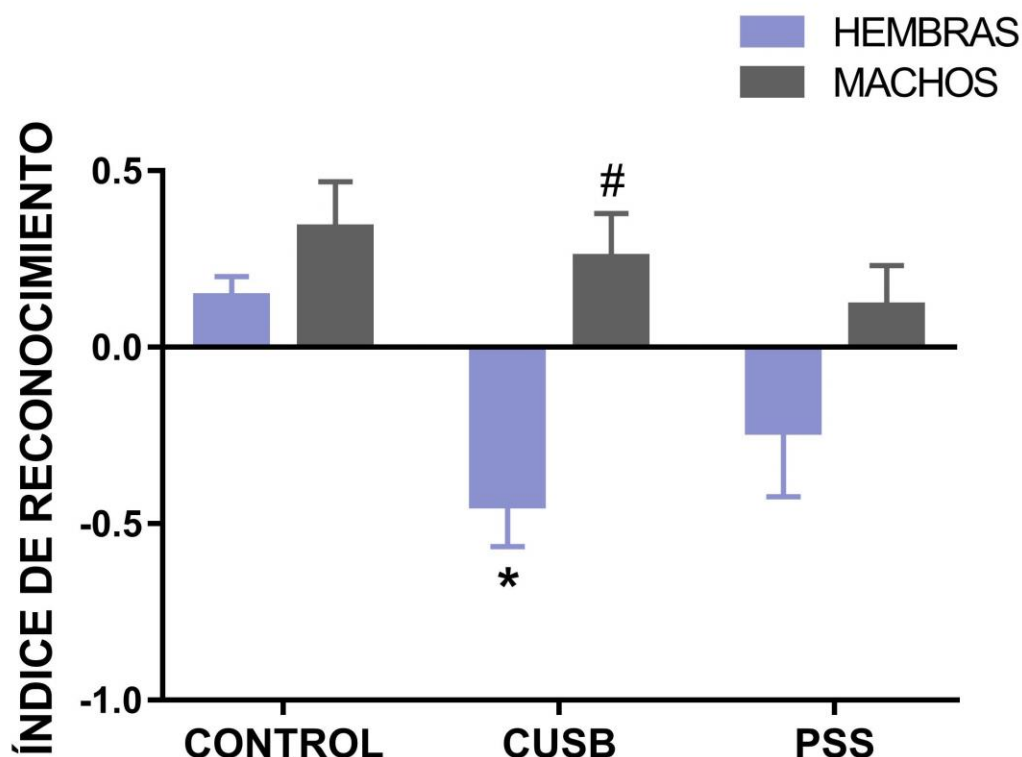


Figura 23. Reconocimiento de objeto novedoso.

Índice de Reconocimiento obtenido en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso. El Índice se obtuvo a partir de la siguiente fórmula: Índice de Reconocimiento = $\frac{ON-OF}{(ON+OF)}$; donde: **ON** es el tiempo de exploración en el objeto novedoso y **OF** corresponde al tiempo de exploración del objeto familiar. * vs. Control; # vs. Hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media ± error estándar.

En la prueba de reconocimiento de objeto novedoso el ANOVA de 2 vías mostraron efectos significativos para la variable tipo de estresor [$F_{(2,83)}=4.254$, $p=0.018$] y la variable sexo [$F_{(1,83)}=15.794$, $p < 0.001$] pero no en la interacción de ambas. Los machos de los grupos CUSB y PSS pasan más tiempo explorando el objeto novedoso que las hembras del grupo CUSB y PSS (Figura 23). Por otra parte, las hembras de los grupos CUSB y PSS pasan más tiempo explorando el objeto familiar en comparación con las hembras del grupo control.

7.4. Efectos del estrés en los niveles de corticosterona

Los niveles de corticosterona en suero sanguíneo el ANOVA de dos vías mostró efectos significativos para la variable tipos de estresor [$F_{(2,25)} = 4.499$, $p = 0.024$], pero no para el factor sexo ni la interacción de ambos factores. El análisis post hoc reveló diferencias entre el grupo control de hembras y las hembras expuestas a PSS, teniendo niveles más altos éstas últimas. Sin embargo, se puede observar una tendencia en el incremento de los niveles de corticosterona de acuerdo al tipo de estresor en las hembras. Teniendo las hembras PSS los niveles más altos de corticosterona en comparación con el grupo control y CUSB (Figura 24). En el caso de los machos también se puede observar un incremento en los niveles de corticosterona en los que fueron expuestos a estrés en comparación con los del grupo control.

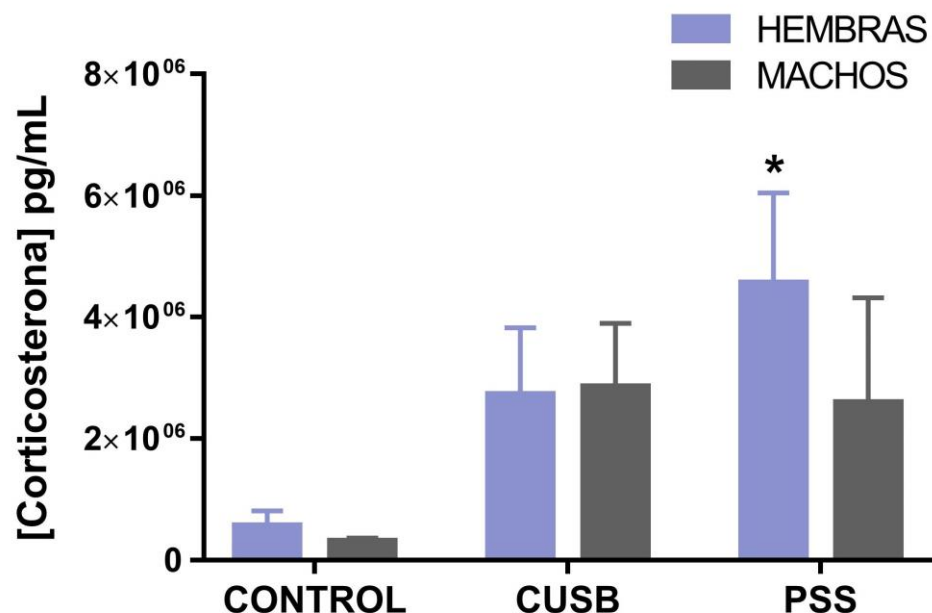


Figura 24. Niveles de corticosterona.

Niveles de corticosterona en suero sanguíneo. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador. Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar.

8. DISCUSIÓN

En las Tablas 3-6 se muestran el resumen de los resultados encontrados en este estudio.

La prueba de campo abierto, una de las más utilizadas en la investigación en neurociencias (Belzung, 1999) para evaluar motricidad y conductas tipo ansiedad (Sestakova, Puszerova, Kluknavsky & Bernatova, 2013). En dicha prueba se evalúa el número de cruces totales que realizan los sujetos a través del aparato como un indicador de conducta motora. Un alto número de cruces se interpreta como un buen estado motor del sujeto (Sestakova et al., 2013) mientras que menor número de cruces se considera como un indicador de ansiedad (Sestakova et al., 2013). En este estudio, los machos estresados presentaron menor número de cruces en la prueba de campo abierto, en comparación con el grupo de machos control. A pesar de que no fue significativa se puede apreciar que las hembras estresadas también disminuyen el número de cruces en comparación con el grupo control de hembras. Por otra parte, las hembras del grupo CUSB tuvieron un mayor número de cruces en comparación con los machos expuestos a dicho estresor.

Uno de los indicadores de conducta tipo ansiedad evaluados en esta prueba es el tiempo que permanecen en el área central del aparato. Entre menor sea el tiempo que pasan en esta área se considera como mayor ansiedad (Belzung, 1999). Esto se basa en que de manera general los roedores tienden a escapar de las superficies abiertas e iluminadas (Sestakova et al., 2013). En este estudio, a pesar de que no se encontraron diferencias entre grupos con el análisis post hoc, en el caso del porcentaje de tiempo que pasan en el área central del campo abierto también se aprecia que éste disminuyó en los machos y hembras del grupo PSS y en los machos expuestos a CUSB. A pesar de que las hembras CUSB también presentaron un decremento en el porcentaje de tiempo que pasan en el centro, éstas no disminuyeron tanto como los otros grupos estresados.

En esta prueba también se evalúan algunas conductas como el tiempo que permanecen inmóviles. Esta medida se ha relacionado con la respuesta de miedo

(Sestakova et al., 2013; Blanchard, Defensor & Blanchard, 2010). Sin embargo, cabe recalcar que a pesar de que la inmovilidad (estado de vigilancia y tensión muscular) ha sido diferenciada de la respuesta de congelamiento (ausencia de movimientos, excepto los movimientos vegetativos) (Blanchard et al., 2010; Brandão, Zanoveli, Ruiz-Martinez, Oliveira & Landeira-Fernandez, 2008), éstas se han utilizado de forma indistinta en muchos casos. Considerando eso, la interpretación de dicha conducta ha sido entre mayor sea el tiempo que los sujetos permanecen inmóviles mayor es la respuesta de miedo.

En este estudio al no haber diferencias significativas entre el tiempo de inmovilidad y el congelamiento, se decidió no distinguir entre éstas. La explicación a esta ausencia de diferencias entre dichas conductas podría ser debido a que el congelamiento se despliega frecuentemente frente a la amenaza *per se*, y durante la prueba de campo abierto los estresores no estaban presentes. Empero, según los hallazgos de este estudio, parece que el porcentaje de tiempo que los sujetos pasaron inmóviles no se vio afectado por ninguna de las variables.

En esta prueba se evalúa el tiempo de acicalamiento que, en condiciones normales, se considera como un ritual espontáneo del cuidado y aseo del cuerpo, apareciendo como una conducta de transición entre otras (Whishaw, Bergdall & Kolb, 1999). En condiciones de estrés, el aumento del acicalamiento se ha considerado como un indicador de ansiedad y por tanto una conducta no defensiva frente a las amenazas (Kalueff & Tuohimaa, 2004). En este estudio se encontró que la conducta de acicalamiento incrementó de forma significativa en los machos expuestos a CUSB en comparación con los machos del grupo control y las hembras expuestas al mismo estresor.

Por último, en esta prueba también se evalúa el número de bolos fecales. La interpretación del aumento de los bolos fecales se considera como un indicador de ansiedad y/o miedo (Sestakova et al., 2013). Según los resultados de este estudio, a pesar de no haber diferencias significativas, se puede observar que los machos y hembras del grupo expuesto a PSS y los machos expuestos a CUSB tuvieron mayor número de bolos fecales durante esta prueba.

Tabla 3. Resumen de los efectos en las conductas tipo ansiedad encontrados en el presente estudio.

Prueba	Medida (indicador)	Estresor		
		Control	CUSB	PSS
Campo Abierto	Cruces totales (locomoción / ansiedad)	♀ = ♂	♀ > ♂↓	♀ > ♂↓
	Tiempo centro (ansiedad)	♀ = ♂	♀↓ > ♂↓	♀↓ = ♂↓
	Inmovilidad (ansiedad / miedo)	♀ > ♂	♀ < ♂	♀ > ♂
	Acicalamiento (ansiedad)	♀ < ♂	♀ < ♂↑	♀↑ = ♂↑
	Bolos fecales (ansiedad)	♀ < ♂	♀ < ♂↑	♀↑ > ♂↑
Laberinto Cero	Tiempo brazo abierto (ansiedad)	♀ = ♂	♀↓ < ♂↓	♀↓ > ♂↓
	Tiempo b cerrado (no ansiedad)	♀ = ♂	♀ = ♂	♀ = ♂
	Entradas b. abierto (ansiedad)	♀ < ♂	♀↓ = ♂↓	♀ > ♂↓
	Entradas b. cerrado (no ansiedad)	♀ < ♂	♀↓ = ♂↓	♀ > ♂↓
	Evaluación Ambiental (ansiedad)	♀ > ♂	♀ > ♂	♀ > ♂↓

Resultados de los efectos del estrés y las diferencias entre sexos en las conductas tipo ansiedad evaluadas en el presente estudio. ♀: hembra; ♂: macho; ↓: decrementa respecto al control; ↑: incrementa respecto al control; >: hembras son mayores que los machos; <: hembras son menores que los machos; =: no hay diferencias entre machos y hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador; **BAB**: Batería de pruebas conductuales. Los símbolos en morado son los resultados estadísticamente significativos.

En la prueba de laberinto cero el tiempo de permanencia y número de entradas en el brazo abierto es considerado como un indicador de ansiedad (Sestakova et al., 2013). La disminución del tiempo y número de entradas que los sujetos hacen en el brazo abierto es considerada como una conducta tipo ansiedad. En este estudio

al evaluar el tiempo que pasaban en el brazo abierto no se encontraron diferencias significativas. Asimismo, tampoco se encontraron diferencias significativas en el tiempo que permanecieron en el brazo cerrado. Sin embargo, se observó que los machos y hembras que fueron expuestos a estrés pasaron menos tiempo en los brazos abiertos en comparación con los brazos cerrados. Esta diferencia parece no ser dependiente del tipo de estresor al que fueron expuestos. Por otro lado, tampoco se observaron diferencias entre machos y hembras en el tiempo que pasaron en el brazo abierto o cerrado del laberinto. Según los resultados encontrados parece ser que las conductas tipo ansiedad no parecen estar influenciadas por el sexo, pero sí por ser expuesto a estrés en esta prueba.

Por otra parte, se observaron diferencias en el número de entradas que los machos expuestos a PSS tuvieron en el brazo cerrado. Dichos machos tuvieron un menor número de entradas en comparación con los machos no expuestos a estrés y las hembras expuestas al mismo estresor. Esto parece ser contrario a lo reportado en otros estudios, que posiblemente se deba a que los machos expuestos a PSS permanecieron más tiempo inmóviles en el brazo cerrado.

En el caso del número de evaluaciones ambientales, también conocido como evaluación de riesgo (Sestakova et al., 2013; Blanchard, Griebel & Blanchard, 2001), que se evalúan en esta prueba existen dos interpretaciones. Por una parte, se considera como una conducta defensiva frente a un estímulo amenazante y; por otra parte, se considera una conducta exploratoria no defensiva cuando el estímulo amenazante no se encuentra presente (Blanchard et al., 2001). Sin embargo, otros autores lo consideran como un indicador de ansiedad (Sestakova et al., 2013).

Tomando en cuenta lo anterior, en este estudio se encontró que de forma general los machos realizan esta conducta menos veces en comparación con las hembras cuando no han sido expuestos a estrés. Esto es consistente con los hallazgos de Blanchard et al. (2001) donde reportan que las ratas no presentan esta conducta defensiva como primera opción frente a una amenaza y esto continúa incluso después de que la amenaza no está presente.

También se encontró que dicha conducta disminuye cuando han sido expuestos a estrés en el caso de los machos. Lo que coincide con lo reportado previamente (Blanchard et al., 2001). Empero, en el caso de las hembras no sucede lo mismo, ellas despliegan esta conducta más que los machos, e incluso aumenta con la exposición a algún estresor.

En la prueba de preferencia de sacarina se considera como un indicador de anhedonia (Serchov, van Calker & Biber, 2016). Esta prueba se basa en que de forma general los roedores prefieren los sabores dulces. El uso de la sacarina presupone una ventaja, ya que cualquier preferencia por la solución de sacarina es debido al sabor y no por el contenido calórico que puede ofrecer la solución (Nachman, 1959; Serchov et al., 2016). Se obtiene un índice a partir del consumo de solución de sacarina y agua. Valores negativos o positivos cercanos a cero indican anhedonia. Lo observado en los resultados fue la disminución del índice de preferencia de sacarina en hembras y machos expuestos a estrés.

Respecto a las diferencias entre el tipo de estresor, en los machos expuestos a CUSB se observó una disminución significativa de la preferencia de sacarina en comparación con el grupo de machos control. Lo anterior denota que el estresor CUSB induce anhedonia en machos, pero no en hembras expuestas a dicho estresor. Por el contrario, las hembras expuestas a PSS tuvieron menor preferencia de sacarina que las hembras no expuestas a estrés. Es decir, el estresor PSS induce anhedonia en hembras, pero no en machos expuestos al mismo estresor.

En la evaluación del consumo de sacarina se encontraron diferencias entre sexo. Las hembras de forma general consumen menos solución de sacarina que los machos, incluso si éstas han sido estresadas.

Los resultados del consumo de agua permiten inferir que la reducción en el consumo de sacarina en los grupos de machos y hembras estresados no se debió a que los sujetos dejaron de consumir líquido, sino que de hecho prefirieron consumir más agua en lugar de la solución de sacarina.

Tabla 4. Resumen de los efectos en las conductas tipo depresión encontrados en el presente estudio.

Prueba	Medida (indicador)	Estresor		
		Control	CUSB	PSS
Preferencia de Sacarina	Índice preferencia de Sacarina (anhedonia)	♀ = ♂	♀↓ > ♂↓	♀↓ < ♂↓
	Consumo Sacarina (anhedonia)	♀ < ♂	♀↑ > ♂↓	♀↑ < ♂↓
	Consumo Agua	♀ < ♂	♀↑ < ♂↑	♀↑ < ♂↑
Nado Forzado	Inmovilidad (depresión)	♀ = ♂	♀ < ♂↑	♀ > ♂
	Nado	♀ < ♂	♀↑ > ♂↓	♀ < ♂↑
	Escalamiento	♀ = ♂	♀ > ♂↓	♀↓ < ♂

Resultados de los efectos del estrés y las diferencias entre sexos en las conductas tipo depresión evaluadas en el presente estudio. ♀: hembra; ♂: macho; ↓: decremanta respecto al control; ↑: incrementa respecto al control; >: hembras son mayores que los machos; <: hembras son menores que los machos; =: no hay diferencias entre machos y hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador; **BAB**: Batería de pruebas conductuales. Los símbolos en morado son los resultados estadísticamente significativos.

La prueba de nado forzado es una tarea de desesperanza aprendida que ha sido relacionada con la depresión, particularmente se considera el tiempo que pasan inmóviles los sujetos como una medida de desesperanza aprendida y consecuentemente una conducta tipo depresiva (Yankelevitch-Yahav, Franko, Huly & Doron, 2015; West, 1990). Tiempo después se agregaron las conductas activas de escalamiento y nado (Detke & Lucki, 1996; Bogdanova, Kanekar, D'Anci & Renshaw, 2013).

El tiempo de inmovilidad incrementó en los machos expuestos a CUSB, pero no en las hembras expuestas al mismo estresor. Por otra parte, los machos expuestos a PSS tienen menos tiempo de inmovilidad que las hembras expuestas a este estresor. Además, los machos expuestos a PSS mostraron una menor

inmovilidad en comparación con los machos expuestos a CUSB. Esto en conjunto con lo observado en el tiempo que los machos PSS pasan escalando parece indicar que la exposición a PSS en los machos genera conductas activas en esta prueba. Mientras que en las hembras la exposición a CUSB es la que genera que tengan conductas activas en esta prueba.

Recientemente se ha discutido que el hecho de presentar mayor tiempo de inmovilidad durante los últimos minutos de la prueba de nado forzado posiblemente sea más una estrategia adaptativa para afrontar la situación estresante (Cotella et al., 2019).

La prueba de laberinto de Barnes evalúa la memoria de referencia (Barnes, 1979). Se basa en que los roedores escapan de forma natural de los espacios abiertos e iluminados. En esta prueba se mide la latencia de escape y el número de errores (intentos de entrada a los agujeros que no son el de escape).

En este estudio no hubo diferencias significativas en la latencia de escape. A pesar de ello, las hembras expuestas a CUSB tuvieron latencias más largas en comparación con las hembras control y expuestas a PSS.

En el caso del número de errores se encontró que la exposición a CUSB incrementa el número de errores que cometen las hembras para encontrar el agujero de escape. Lo anterior indica que en el caso de las hembras la memoria de referencia se ve afectada cuando son expuestas a un estresor, particularmente a CUSB. Mientras que en el caso de los machos expuestos a CUSB la memoria de referencia mejora, al disminuir la latencia de escape y el número de errores que cometen. En el caso del estresor PSS parece no tener efectos en la memoria de referencia evaluada en esta prueba.

A partir de los resultados obtenidos en la curva de aprendizaje considerando los indicadores obtenidos en cada sesión de la prueba de laberinto de Barnes, se puede inferir que el estrés no afecta el aprendizaje de esta tarea, ya que el número de errores y latencia de escape disminuyeron a lo largo de las sesiones.

Tabla 5. Resumen de los efectos en la memoria encontrados en el presente estudio.

Prueba	Medida (indicador)	Estresor		
		Control	CUSB	PSS
Laberinto de Barnes	Latencia (memoria espacial)	♀ = ♂	♀↑ > ♂	♀ = ♂
	Errores (memoria espacial)	♀ = ♂	♀↑ > ♂	♀↑ > ♂
Reconocimiento de Objetos	Índice de Reconocimiento (memoria de reconocimiento)	♀ < ♂	♀↓ < ♂↓	♀↓ < ♂↓

Resultados de los efectos del estrés y las diferencias entre sexos en la memoria evaluada en el presente estudio ♀: hembra; ♂: macho; ↓: decrementa respecto al control; ↑: incrementa respecto al control; >: hembras son mayores que los machos; <: hembras son menores que los machos; =: no hay diferencias entre machos y hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador; **BAB**: Batería de pruebas conductuales. Los símbolos en morado son los resultados estadísticamente significativos.

La prueba de reconocimiento de objeto novedoso se basa en que los roedores tienen predilección por explorar lo novedoso y se ha utilizado para evaluar la memoria declarativa en roedores, particularmente la memoria episódica (Tuscher, Fortress, Kim & Frick, 2015). Sin embargo, otros autores consideran que lo que se evalúa es la memoria de reconocimiento (Morici, Bekinschtein & Weisstaub, 2015). El reconocimiento se define como la habilidad para identificar cualquier evento pasado, y por eso mismo la memoria de reconocimiento resulta particularmente importante para recordar eventos pasados que puedan guiar conductas prospectivas (Morici et al., 2015). En ese sentido la memoria de reconocimiento y la memoria semántica se consideran parte de un mismo continuo (Morici et al., 2015).

A pesar de las discrepancias, esta prueba es considerada para evaluar la memoria no espacial dependiente de hipocampo y las cortezas: entorrinal, perirrinal y parahipocampal (Tuscher et al., 2015). Lo anterior se hace mediante un índice de reconocimiento donde los valores positivos indican que el sujeto pasó más tiempo explorando el objeto novedoso en comparación con el objeto familiar interpretando

esto como que el proceso de memoria declarativa se encuentra funcionando adecuadamente (Ennaceur & Delacour, 1998). En cambio, si el valor de dicho índice es negativo o cercano a cero significa que el sujeto pasó más tiempo explorando el objeto considerado como familiar en comparación con el tiempo de exploración del objeto novedoso. Lo anterior es asociado con afectaciones en la memoria declarativa del roedor (Ennaceur & Delacour, 1998).

Tomando en cuenta lo anterior, los resultados de este estudio nos permiten inferir que el estrés afecta la memoria declarativa. Sin embargo, lo hace de forma diferencial en machos y hembras. Las hembras en condiciones sin estrés pasaron menos tiempo explorando el objeto novedoso que los machos. Por otra parte, aunque el tiempo de exploración del objeto novedoso disminuyó en machos expuestos a CUSB este efecto fue significativo en las hembras expuestas a CUSB. Esto mismo ocurrió en los machos expuestos a PSS, donde la exploración del objeto familiar fue mayor que los machos control. En el caso de las hembras expuestas a PSS, éstas tuvieron una pobre ejecución en esta tarea obteniendo un índice de reconocimiento negativo.

Los niveles de corticosterona se utilizan como un indicador de la actividad del eje HPA, por lo que a menudo se realizan mediciones de los niveles de corticosterona para evaluar el efecto de los estresores en la respuesta neuroendocrina al estrés de los organismos. De forma general, se observa un aumento en los niveles de corticosterona en sujetos expuestos a estrés que muestra su pico más alto a los 30 minutos después de iniciado el estresor y regresa a niveles basales aproximadamente a los 60 minutos de concluido el estresor (Spencer, Chun, Hartsock & Woodruff, 2018).

En condiciones de estrés agudo se ha considerado que el incremento de los niveles de corticosterona ayuda a redireccionar los recursos energéticos de las actividades no esenciales a aquellos mecanismos fisiológicos que son importantes para la supervivencia del organismo (p.ej. incremento del tono vascular) (Spencer-Segal & Akil, 2019). Sin embargo, esto depende de la intensidad y de la duración del estímulo estresante (Spencer & Deak, 2017). Mientras que en condiciones de

estrés crónico el incremento de los niveles de corticosterona de forma sostenida lleva a alteraciones a nivel estructural y funcional en regiones cerebrales (p.ej. hipocampo) llevando al organismo a tener afectaciones cognitivas, del estado del ánimo y metabólicas (Spencer-Segal & Akil, 2019). Empero, uno de los fenómenos que se presenta en la exposición crónica a un estímulo estresante es la habituación, es decir, la disminución de la actividad del eje HPA ante la exposición repetida a un mismo estresor (Spencer & Deak, 2017). Para evitar este fenómeno se ha optado por la exposición crónica impredecible, es decir, a distintos tipos de estresores con una secuencia aleatoria para inducir hiperactividad en el eje HPA (Spencer & Deak, 2017).

Con respecto a las diferencias de sexo en los niveles séricos de corticosterona, diferentes estudios han reportado que las hembras presentan mayores niveles de corticosterona que los machos al ser expuestos al mismo estresor (Spencer & Deak, 2017) aunque estas diferencias varían en función del tipo de estresor (Spencer & Deak, 2017).

Tabla 6. Resumen de los efectos en los niveles de corticosterona encontrados en el presente estudio.

Prueba	Medida (indicador)	Estresor		
		Control	CUSB	PSS
Nivel de corticosterona	Concentración de corticosterona en suero	♀ > ♂	♀↑ = ♂↑	♀↑ > ♂↑

Resultados de los efectos del estrés y las diferencias entre sexos en los niveles de corticosterona en suero evaluado en el presente estudio ♀: hembra; ♂: macho; ↓: decrementa respecto al control; ↑: incrementa respecto al control; >: hembras son mayores que los machos; <: hembras son menores que los machos; =: no hay diferencias entre machos y hembras. **CUSB**: Exposición a la Batería de Estrés Crónico Impredecible; **PSS**: Exposición a Orina de Depredador; **BAB**: Batería de pruebas conductuales. Los símbolos en morado son los resultados estadísticamente significativos.

De acuerdo con los resultados, las hembras tienen niveles más altos de corticosterona en suero que los machos en condiciones de estrés. Además, los machos y hembras estresados también incrementaron con respecto a los sujetos no estresados.

9. CONCLUSIONES

El presente estudio evaluó los efectos de dos tipos de estresores en las conductas tipo ansiedad, tipo depresión, la memoria de referencia y la memoria de reconocimiento, desde de un punto de vista comparativo entre machos y hembras.

Los resultados sugieren que los efectos del estrés en machos y hembras no son los mismos. Las hembras fueron particularmente más sensibles a los efectos del estrés crónico impredecible, mientras que los machos fueron más vulnerables a la exposición a orina de depredador.

Así mismo, los resultados sugieren que los efectos también son diferenciales al comparar entre tipos de estresores. Los sujetos expuestos a orina de depredador presentaron efectos negativos en la prueba de memoria de reconocimiento y conductas tipo ansiosas, que las conductas tipo depresivas. Por el contrario, la exposición a estrés crónico parece tener efectos negativos en las conductas tipo depresivas.

Estos resultados, en conjunto, nos permiten tener mayor claridad en las características a tomar en cuenta al emplear modelos animales de estrés para tener una mejor aproximación y comprensión en el estudio de los trastornos relacionados con el estrés.

Del mismo modo, estos resultados contribuyen a evidenciar la necesidad de continuar haciendo estudios en hembras y no sólo en machos. Ya que mucha de la teoría se basa únicamente en estudios con machos y esto se extrapola a las hembras sin tomar en cuenta que lo que ocurre en un organismo masculino no necesariamente ocurre de la misma forma, intensidad y siguiendo los mismos mecanismos en un organismo femenino.

10. REFERENCIAS

- Bangasser, D.A., Eck, S.R., Telenson, A.M. & Salvatore, M. (2018) Sex differences in stress regulation of arousal and cognition. *Physiology & Behavior* 187: 42-50.
- Bangasser, D.A. & Valentino, R.J. (2014) Sex differences in stress-related psychiatric disorders: Neurobiological perspectives. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35: 303-319.
- Barnes, C.A. (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 93(1): 74-104.
- Basnar, M., Valentine, G.V., Li, X.Y., Gourley, S.L., Taylor, J.R. & Duman, R.S. (2007) Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. *Biological Psychiatry* 62: 496-504.
- Bekris, S., Antoniou, K., Daskas, S. & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2005) Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behavioural Brain Research* 161: 45-59.
- Belzung, C. (1999). Chapter 4.11 Measuring rodent exploratory behavior. *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences*, 738–749.
- Blanchard, D. C., Defensor, E. B., & Blanchard, R. J. (2010). Fear, Anxiety, and Defensive Behaviors in Animals. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*, 532–537.
- Blanchard, D.C., Griebel, G. & Blanchard, R.J. (2001) Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 25: 205-218.
- Brandão, M.L., Zanoveli, J.M., Ruiz-Martinez, R.C., Oliveira, L.C. & Landeira-Fernandez, J. (2008) Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behavioural Brain Research* 188:1-13.
- Bogdanova, O., Kanekar, S., D'Anci, K.E. & Renshaw, P.F. (2013) Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiology & Behavior* 118: 227-239.
- Burgado, J., Harrell, C.S., Eacret, D., Reddy, R., Barnum, C.J., Tansey, M.G., Miller, A.H., Wang, H. & Neigh, G.N. (2014) Two weeks of predatory stress induces anxiety-like behavior with co-morbid depressive-like behavior in adult male mice. *Behavioural Brain Research* 275: 120-125.

- Carrasco, G.A. & Van de Kar, L.D. (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology* 463: 235-272.
- Chen, G., Yang, D., Yang, Y., Li, J., Cheng, K., Tang, G., Zhang, R., Zhou, J., Li, W., Liu, Z., Fan, S. & Xie, P. (2015) Amino acid metabolic dysfunction revealed in the prefrontal cortex of rat model of depression. *Behavioural Brain Research* 278: 286-292.
- Chrousos, G.P. & Gold, P.W. (1992) The Concepts of Stress and Stress System Disorders: Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. *The Journal of the American Medical Association* 267(9): 1244-1252.
- Cohen, H., Kozlovzky, N., Alona, C., Matar, M.A. & Joseph, Z. (2012) Animal model for PTSD: from clinical concept to translational research. *Neuropharmacology* 62: 715-724.
- Cotella, E.M., Scarponi, A.G., Lemen, P., Chen, C., Fernández, G., Hansen, C., Herman, J.P. & Paglini, M.A. (2019) Long-term impact of chronic variable stress in adolescence versus adulthood. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 88: 303-310.
- Cruz, F.C., Marin, M.T., Leão, R.M. & Planeta, C.S. (2012) Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. *International Journal of Developmental Neuroscience* 30: 19-23.
- Daskalakis, N.P., Yehuda, R. & Diamond, D. (2013) Animal models in translational studies of PTSD. *Psychoneuroendocrinology* 38(9): 1895–1911.
- Deslauriers, J., Toth, M., Der-Avakian, A. & Risbrough, V.B. (2017) Current status of Animal Models of Posttraumatic Stress Disorder: behavioral and biological phenotypes, and future challenges in improving translation. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.11.09>
- Detke, M.J. & Lucki, I. (1996) Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behavior Brain Research* 73: 43-46.
- Doczy, E.J., Seroogy, K., Harrison, C.R. & Herman, J.P. (2009) Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis, Glucocorticoids, and Neurologic Disease. *Immunol Allergy Clin N Am* 29: 265-284.
- Duval, F., González, F. & Rabia, H. (2010) Neurobiología del estrés. *Revista chilena de neuro-psiquiatría* 48(4): 307-318.

- Ennaceur, A. & Delacour, J. (1998) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research* 31(1): 47-59.
- Faraday, M.M. (2002) Rat sex and strain differences in responses to stress. *Physiology & Behavior* 75: 507-522.
- Filho, C.B., Jesse, C.R., Donato, F., Giacomeli, R., del Fabbro, L., da Silva Antunes, M., de Gomes, M.G., Goes, A.T.R., Boeira, S.P, Prigol, M. & Souza, L.C. (2015) Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and Na⁺, K⁺-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: antidepressant effect of chrysin. *Neuroscience* 289: 367-380.
- Fink, G. (2009) Stress: Definition and History. En Fink, G. (Ed.) *Stress Science: Neuroendocrinology* (pp.3-9) San Diego, California: Elsevier.
- Hauger, R.L., Lorang, M., Irwin, M. & Aguilera, G. (1990) CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. *Brain Research* 532: 34-40.
- Joëls, M. & Baram, T.Z. (2009) The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience* 10(6): 304-314.
- Kalueff, A.V. & Tuohimaa, P. (2004) Grooming analysis algorithm for neurobehavioral stress research. *Brain Research Protocols* 13: 151-158.
- Lagunas, N., Calmarza-Font, I., Diz-Chaves, Y. & García-Segura, L.M. (2010) Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. *Hormones and Behavior* 58: 786-791.
- Macedo, G.C., Morita, G.M., Domingues, L.P, Favoretto, C.A., Suchecki, D., Hartmann Quadros, I.M. (2018) Consequences of continuous social defeat stress on anxiety- and depressivelike behaviors and ethanol reward in mice. *Hormones and Behavior* 97: 154-161.
- Mahanti, S., Majhi, A., Chongdar, S., Kundu, K., Dutta, K., Basu, A. & Bishayi, B. (2013) Increased resistance of immobilized-stressed mice to infection: Correlation with behavioral alterations. *Brain, Behavior, and Immunity* 28: 115-127.
- Malkesman, O., Maayan, R., Weizman, A. & Weller, A. (2006) Aggressive behavior and HPA axis hormones after social isolation in adult rats of two different genetic animal models for depression. *Behavioural Brain Research* 175: 408-414.

- 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.
- Migliaro, M. (2018) Evaluación de efectos de la anandamida sobre las alteraciones conductuales inducidas por estrés. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Mx.
- Migliaro, M., Paz-Trejo, D.B., Galicia-Castillo, O. & Sánchez-Castillo, H. (2018) Endocannabinoids prevent alterations by predator scent stress in rats. Program No. 775.22/AAA15.2018 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2018. Online.
- Migliaro, M., Sandoval-Flores, N., Benítez-Serratos, F., Valencia-Flores, K.B., Orizaba-Huerta, C., Sánchez-Macías, M., García-Valencia, M., Velázquez-Martínez, D.N., Galicia, O., Paz-Trejo, D.B., Zarate-González, P. & Sánchez-Castillo, H. (2016) Effects of different exposure times to predator scent in rats. Program No. 169.05/BBB2.2016 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2016. Online.
- Mills, K. (2013) Treatment of comorbid substance dependence and posttraumatic stress disorder. *JAMA*, 310: 482-3.
- Mirshekar, M., Abrari, K., Goudarzy, I. & Rashidy-Pour, A. (2013) Systemic administration of β -estradiol alleviate both conditioned and sensitized fear responses in an ovariectomized rat model of post-traumatic stress disorder. *Neurobiology of Learning and Memory* 102: 12-19.
- Morici, J.F., Bekinschtein, P. & Weisstaub, N.V. (2015) Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behavioural Brain Research* 292(1): 241-251.
- Mucio-Ramírez, J.S. (2007) La neuroquímica del estrés y el papel de los péptidos opiodes. *Revista de Educación Bioquímica* 26(4): 121-128.
- Murison, R. (2016) The neurobiology of stress. En al'Absi, M. & Arve, M.F. (Eds.), *Neuroscience of Pain, Stress, and Emotion: Psychological and Clinical Implications* (pp.29-49). San Diego, California: Academic Press.
- Nachman, M. (1959) The inheritance of saccharin preference. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 52(4): 451-457.
- Novais, A., Monteiro, S., Roque, S., Correia-Neves, M. & Sousa, N. (2017) How age, sex and genotype shape the stress response. *Neurobiology of stress* 6: 44-56.

- Ortiz, J.B., Taylor, S.B., Hoffman, A.N., Campbell, A.N, Lucas, L.R. & Conrad, C.D. (2015) Sex-specific impairment and recovery of spatial learning following the end of chronic unpredictable restraint stress: Potential relevance of limbic GAD. *Behavioural Brain Research* 282: 176-184.
- Qiong, L., Bing, L., Hai-Yan, Z., Yan-Qing, W., Jin, Y. & Gen-Cheng, W. (2009) Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression. *European Neuropsychopharmacology* 19: 796–805.
- Ramikie, T.S. & Ressler, K.J. (2017) Mechanisms of sex differences in fear and Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.11.016>
- Ramos-Ortolaza, D.L., Doreste-Mendez. R.J., Alvarado-Torres, J.K. & Torres-Reveron, A. (2017) Ovarian hormones modify anxiety behavior and glucocorticoid receptors after chronic social isolation stress. *Behavioural Brain Research* 328: 115-122.
- Rojas-Lita, B. (2018) Efectos de la administración del polipéptido activador del adenilato ciclasa de la pituitaria anterior (PACAP) sobre conductas relacionadas con el estrés (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Mx.
- 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/Jjj34.2013 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2013. Online.
- 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/LLL60.2013 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2013. Online.
- Sánchez-Castillo, H., Paz-Trejo, D.B., Vazquez, R.M.; Zarate-González, P. & 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., Rojas-Lita, B., Ortega-Tinoco, S., Paz-Trejo, D.B. & Velázquez-Martínez, D.N. (2018) Effects of PACAP on central amygdala on stress-related behaviors in male and female rats. Program No. 775.23/AAA16.2018 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2018. Online.

- 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/X41.2015 Neuroscience Meeting Planner. Chicago, IL: Society for Neuroscience, 2015. Online.
- Seale, J.V., Wood, S.A, Atkinson, H.C., Bate, E., Lightman, S.L., Ingram, C.D., Jessop, D.S. & Harbuz, M.S. (2004) Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *Journal of Neuroendocrinology* 16(6): 516-524.
- Selye, H. (1976) *Stress in health and disease*. Butterworth: Woburn.
- Sestakova, N., Peszarova, A., Kluknavsky, M. & Bernatova, I. (2013) Determination of motor activity and anxiety-related behavior in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology* 6(3): 126-135.
- Serchov, T., van Calker, D. & Biber, K. (2016). Sucrose Preference Test to Measure Anhedonic Behaviour in Mice. *Bio-protocol* 6(19): e1958.
- Spencer, R.L., Chun, L.E., Hartsock, M.J. & Woodruff, E.R. (2018) Glucocorticoid hormones are both a major circadian signal and major stress signal: How this shared signal contributes to a dynamic relationship between the circadian and stress systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* 49: 52-71.
- Spencer-Segal, J.L. & Akil, H. (2019) Glucocorticoids and resilience. *Hormones and Behavior* 111: 131-134.
- Surkin, P.N., Gallino, S.L, Luce, V., Correa, F., Fernández-Solari, J. & De Laurentiis. (2018) Pharmacological augmentation of endocannabinoid signaling reduces the neuroendocrine response to stress. *Psychoneuroendocrinology* 87: 131-140.
- Timmermans, W., Xiong, H., Hoogenraad, C.C. & Krugers, H.J. (2013) Stress and excitatory synapses: From health to disease. *Neuroscience* 248: 626-636.
- Torres-Carrillo, P. (2016a) Efectos del estrés crónico a largo plazo: hacia un modelo animal de Estrés Postraumático (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Mx.
- Torres-Carrillo, P., Mendoza-Rosales, C., Paz-Trejo, D.B., Galicia-Castillo, O., Velázquez-Martinez, D.N. & Sánchez-Castillo, H. (2016b) Long-term effects of unpredictable chronic stress. Program No. 169.05/BBB3.2016

- Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2016. Online.
- Torres-Carrillo, P., Vargas-Gómez, M., Miranda-Guzmán, J.T. Gómez-Avalos, H.T., Verdin-Ruvalcaba, L., Paz-Trejo, D.B., Ochoa-de la Paz, L.D. & Sánchez-Castillo, H. (2017) Different sources of stress: Sex and model type differences. Program No. 165.02/RR15.2017 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2017. Online.
- Torres-Carrillo, P., Vergel-Munguía, M.D., Paz-Trejo, D.B., Ochoa-de la Paz, L.D., Zamora-Arévalo, O. & Sánchez-Castillo, H. (2018a) Diferencias intra-especie en respuesta al estrés: Hacia enfoques traslacionales. *Acta de Investigación Psicológica* 8(1): 61-71.
- Torres-Carrillo, P., Vargas-Gómez, M., Miranda-Guzmán, J.T., Vergel-Munguía, M.D., Ramírez-Sánchez, J.E., Paz-Trejo, D.B., Ochoa-de la Paz, L.D. & Sánchez-Castillo, H. (2018b) Influence of sex and type stressors in behavioral and neuroendocrine response to stress. Program No. 775.24/AAA17.2018 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2018. Online.
- Tuscher, J.T., Fortress, A.M., Kim, J. & Frick, K.M. (2015) Regulation of object recognition and object placement by ovarian sex steroid hormones. *Behavioural Brain Research* 285: 140-157.
- Ursano, R.J., Li, H. Zhang, L., Hough, C.J., Fullerton, C.S., Benedek, D.M., Grieger, T.A. & Holloway, H.C. (2008) Models of PTSD and traumatic stress: the importance of research “from bedside to bench to bedside”. En de Kloet, E.R., Oitzl, M.S. & Vermetten, E. (Eds.) *Stress hormones and posttraumatic stress disorder: basic studies and clinical perspectives*. (pp. 2013-215) Progress in Brain Research 147: El sevier.
- Ursano, R.J., Zhang, L., Li, H., Johnson, L., Carlton, J., Fullerton, C.S. & Benedek, D.M. (2009) PTSD and traumatic stress: from gene to community and bench to bedside. *Brain Research* 1293: 2-12.
- Valencia-Flores, K.B., Torres-López, U., Galicia-Castillo, O., Paz-Trejo, D.B. & Sánchez-Castillo, H. (2018a) Behavioral effects of stress in different exposure times. Program No. 775.25/AAA18.2018 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2018. Online.
- Valencia-Flores, K.B. (2018b) Evaluación de los efectos inducidos por diferente tiempo de exposición al estrés. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Mx.

- Vedder, H. (2007). Physiology of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenocortical Axis. *NeuroImmune Biology* 7: 17–31.
- Vergel-Munguía, M.D., Torres-López, U., Ramírez-Sánchez, J.E., Torres-Carrillo, P., Galicia-Castillo, O., Paz-Trejo, D.B. & Sánchez-Castillo., H. (2018) Effects of exposure to alcohol and stress in the behavioral response of adolescent rats. Program No. 775.21/AAA14.2018 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2018. Online.
- Viau, V. & Meaney, M.J. (1991) Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to estress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 129(5): 2503-2511.
- Viau, V. & Meaney, M.J. (1996) The inhibitory effect of testosterone on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress is by the medial preoptic area. *Journal of Neuroscience* 16(5): 1866-1876.
- Wang, Y., Ma, Y., Hu, J., Cheng, W., Jiang, H., Zhang, X. Li, M., Ren, J. & Li, X. (2015a) Prenatal chronic mild stress induces depression-like behavior and sex-specific changes in regional glutamate receptor expression pattern in adult rats. *Neuroscience* 301: 363-374.
- Wang, Y., Ma, Y., Cheng, W., Jiang, H., Zhang, X. Li, M., Ren, J., Zhang, X. & Li, X. (2015b) Sexual differences in long-term effects of prenatal chronic mild stress on anxiety-like behavior and stress-induced regional glutamate receptor expression in rat offspring. *International Journal Developmental Neuroscience* 41: 80-91.
- Wang, Y., Ma, Y., Hu, J., Zhang, X., Cheng, W., Jiang, H., Li, M., Ren, J., Zhang, X., Liu, M., Sun, A., Wang, Q. & Li, X. (2016) Sex-specific effects of prenatally chronic mild stress on adult spatial learning capacity and regional glutamate receptor expression profiles. *Experimental Neurology* 281: 66-80.
- West, A. P. (1990). Neurobehavioral studies of forced swimming: The role of learning and memory in the forced swim test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 14(6): 863-877.
- Whishaw, I.Q., Bergdal, V. & Kolb, B. (1999). Analysis of behavior in Laboratory Rodents. In Windhorst, U., Johansson, H. (eds), *Modern techniques in neuroscience research*, pp. 1244-1275, Heidelberg: Springer.
- Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A. & Doron, R. (2015) The Forced Swim Test as a model of Depressive-like Behavior. *Journal of Visualized Experiments* 97: 52587. DOI:10.3791/52587.

- Yuen, E.Y., Wei, J., Liu, W., Zhong, P., Li, X. & Yan, Z. (2012) Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron* 73: 962-977.
- Zafar, H.M., Paré, W.P. & Tejani-Butt, S.M. (1997) Effect of acute or repeated stress on Behavior and brain norepinephrine system in Wistar-Kyoto (WKY) rats. *Brain Research Bulletin* 44(3): 289-295.
- Zarate-González, P. (2016) *Generación de fenotipos postraumático (PTSD-LIKE) en ratas a través de la administración de PACAP-38 en el núcleo basolateral de la amígdala* (Tesis doctoral). Universidad de las Américas, A.C.

11. APÉNDICES

Apéndice 1. Protocolos de la Batería de Evaluación Conductual.

Prueba	Día	Sesión	Descripción	Mediciones
Campo Abierto	1	Única	La sesión tiene una duración de cinco minutos. Se coloca al sujeto en el centro de la arena de campo abierto donde están trazados 16 cuadrantes de dimensiones iguales.	Frecuencia de las siguientes conductas: ▪ Número de cruces totales. ▪ Acicalamiento. ▪ Inmovilidad. ▪ Congelamiento. ▪ Defecaciones. Duración de las siguientes conductas: ▪ Permanencia en centro. ▪ Permanencia en periferia. ▪ Inmovilidad. ▪ Congelamiento.
Laberinto Cero	1	Única	La sesión dura cinco minutos. Se coloca al sujeto experimental en el centro de una de los brazos cerrados del laberinto.	Frecuencia y duración de las siguientes conductas: ▪ Entrada/permanencia en brazo abierto. ▪ Entrada/permanencia en brazo cerrado. ▪ Evaluación de riesgo.
Preferencia de Sacarina	1	Línea Base Agua	Al sujeto experimental se le da acceso a un contenedor con 250 ml. de agua por 24 horas, iniciando a las 18:30 p.m.	Consumo de agua.
	2	Línea Base Sacarina	El sujeto experimental tiene acceso a un contenedor con 250 ml. de solución de sacarina por 24 horas, iniciando a las 18:30 p.m.	Consumo de sacarina.
	3	Habitación Prueba de dos botellas	Se da acceso al sujeto experimental a dos contenedores con 100 ml. de agua durante 1 hora, iniciando a las 19:00 p.m.	Consumo de agua.

Apéndice 1. Protocolos de la Batería de Evaluación Conductual (continuación).

Prueba	Día	Sesión	Descripción	Mediciones
Preferencia de Sacarina (continuación)	4	Privación líquidos	Se restringe al sujeto experimental el acceso a líquidos durante 24 horas, iniciando a las 20:00 p.m.	
	5	Prueba	Se le da acceso a un contenedor con 250 ml. de agua y otro contenedor con 250 ml. de solución de sacarina durante 24 horas, iniciando a las 20:00 p.m. Se realizan mediciones a las 12 horas y 24 horas después de colocados los contenedores.	Consumo de agua y sacarina. A partir de estos datos se obtiene un Índice de Preferencia utilizando la siguiente fórmula: Índice de Preferencia = $S-A/(S+A)$ donde: S es el consumo de sacarina y A corresponde al consumo de agua.
Nado Forzado	1	Habitación	La sesión tiene una duración de 15 minutos. Se coloca al sujeto en el centro del cilindro de nado forzado.	
	2	Prueba	La sesión dura 5 minutos. Se coloca al sujeto en el centro del cilindro de nado forzado.	Frecuencia y duración de las siguientes conductas: ▪ Nado. ▪ Escalamiento. ▪ Inmovilidad.
Laberinto de Barnes	1	Habitación	La duración de esta sesión es de tres minutos. Se prende la luz (estímulo aversivo) e inmediatamente después se coloca al sujeto al centro del laberinto. Se guía al sujeto hacia el agujero de escape, una vez que entra el sujeto se apaga la luz. Se deja al sujeto experimental en el agujero por dos minutos.	
	2 y 3	Entrenamiento	Estas sesiones constan de cuatro ensayos con un intervalo de tiempo de 15 minutos entre cada ensayo. Se prende la luz y se coloca al sujeto experimental simultáneamente. Una vez que el sujeto llega al agujero de escape se apaga la luz y se le permite estar ahí por 30 segundos antes de retirarlo del laberinto.	

Apéndice 1. Protocolos de la Batería de Evaluación Conductual (continuación).

Prueba	Día	Sesión	Descripción	Mediciones
Laberinto de Barnes (continuación)	4	Prueba	Esta sesión consta de cuatro ensayos con un intervalo de tiempo de 15 minutos entre cada ensayo. Se prende la luz y se coloca al sujeto experimental simultáneamente. Una vez que el sujeto llega al agujero de escape se apaga la luz y se retira al sujeto del laberinto.	Se mide: ▪ Latencia de escape. Frecuencia de: ▪ Errores.
Reconocimiento de Objetos	1	Habitación	Se coloca al sujeto en la arena de campo abierto.	
	2 y 3	Entrenamiento	Estas sesiones tienen una duración de cinco minutos. Se coloca al sujeto al centro de la arena de campo abierto donde están fijados dos objetos iguales en esquinas opuestas.	
	4	Prueba	Esta sesión dura cinco minutos. Se coloca al sujeto experimental en el centro de la arena de campo abierto donde están fijados dos objetos en esquinas opuestas. Uno de los objetos es el mismo de las sesiones de entrenamiento (objeto familiar), mientras que, el otro objeto es uno distinto (objeto novedoso).	Se mide la frecuencia y duración de las siguientes conductas: ▪ Exploración del objeto familiar. ▪ Exploración del objeto novedoso. A partir de esos registros se obtiene el Índice de Discriminación usando la siguiente fórmula: Índice de Discriminación = (ON-OF)/(ON+OF) donde: ON corresponde al tiempo que exploran el objeto novedoso y OF se refiere al tiempo que pasan explorando el objeto familiar.

Detalles de los protocolos de cada una de las pruebas conductuales que componen la Batería de Evaluación Conductual utilizada en el presente estudio. Estos protocolos han sido estandarizados para el Laboratorio de Neuropsicofarmacología y Estimación Temporal, Facultad de Psicología, UNAM. La duración total de la Batería de Evaluación Conductual es de 17 días.

Apéndice 2. Protocolo del kit ELISA para corticosterona ARBOR ASSAY®.

A continuación, se detallan los pasos a seguir para la realización de la medición de los niveles de corticosterona en suero mediante el kit de ELISA.

Preparación de la muestra:

1. En un microtubo de 1.5 mL agregar 5 µL del agente de disociación a temperatura ambiente y 5 µL de la muestra de suero obtenida. Agitar suavemente e incubar por al menos 5 minutos a temperatura ambiente. Agregar 490 µL del Buffer de ensayo diluido.

Preparación de la curva estándar:

1. Etiquetar los microtubos del número 1 al 8.
2. Agregar 450 µL de buffer de ensayo en el microtubo 1 y 250 µL de buffer de ensayo en los microtubos 2 al 8.
3. Cuidadosamente agregar 50 µL de la solución stock de corticosterona en el microtubo 1 y agita bien.
4. Tomar 250 µL de la solución de corticosterona del microtubo 1, agrégala al microtubo 2 y agita bien.
5. Tomar 250 µL de la solución de corticosterona del microtubo 2, agrégala al microtubo 3 y agita bien.
6. Repetir la serie de diluciones del microtubo 4 al microtubo 8.

Protocolo del ensayo:

1. Usa la hoja de identificación de los pozos de la placa. Determina el número de pozos que usarás y las que no vayas a usar, guárdalas en la el empaque con el desecante. Guarda en la bolsa ziploc a 4°C.
2. Con la pipeta agrega 50 µL de muestra o estándares en los pocillos correspondientes de la placa.
3. Agrega 75 µL de buffer de ensayo en los pocillos correspondientes a NBS.
4. Agrega 50 µL de buffer de ensayo en los pocillos correspondientes a B0 o 0 pg/mL.
5. Agrega 25 µL del conjugado de corticosterona **DetectX®** en cada pocillo utilizado.
6. Agrega 25 µL del anticuerpo para corticosterona **DetectX®** en cada pocillo utilizado, excepto en los correspondientes a NBS.
7. Golpea los extremos de la placa gentilmente para mezclar adecuadamente los reactivos. Cubre la placa con la mica y agita a temperatura ambiente por 1 hora.
8. Aspira el plato y haz 4 lavados con 300 µL del buffer de lavado. Golpea la placa en toallas absorbentes.
9. Agrega 100 µL del sustrato TMB en cada uno de los pocillos utilizados.
10. Incuba a temperatura ambiente por 30 min sin agitar.
11. Agrega 50 µL de la solución Stop en cada pocillo utilizado.
12. Lee la absorbancia generada por cada pocillo en un lector de placas de 450 nm.
13. Usa las lecturas para calcular las concentraciones de corticosterona de cada muestra usando una función 4PLC.

Cálculo de los resultados:

Se normalizaron los valores de las absorbancias de acuerdo con las indicaciones del kit para realizar la curva estándar:

1. Se promediaron los duplicados de las absorbancias obtenidas, tanto de la curva como de las muestras (Mean OD).
2. Se le restó el valor de la absorbancia obtenida para NSB (Net OD).
3. Al valor obtenido del paso número 2 se dividió entre el valor Net OD de B0 (%B/B0).
4. Se graficaron los valores de las absorbancias normalizadas y la concentración logarítmica correspondientes a la curva estándar (ver Figura A2).

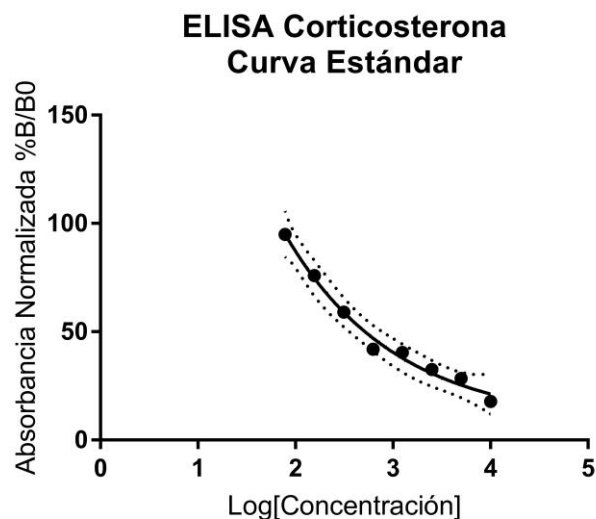


Figura A2. Curva estándar obtenida en el ELISA para corticosterona para el presente estudio.

5. Se realizó una regresión no lineal para obtener los valores de la función 4PL. La siguiente función fue obtenida en la versión 7.0 del software GraphPad Prism:

$$y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{(LogEC50 - x)(HillSlope)}}$$

Donde:

Top corresponde al punto máximo de la curva.

Bottom corresponde al punto mínimo de la curva.

HillSlope corresponde a la pendiente de la curva.

EC50 corresponde a la concentración que alcanza el punto medio entre top y bottom.

X corresponde a la concentración de corticosterona.

Y corresponde a la absorbancia obtenida.

En el análisis realizado en GraphPad Prism se obtuvieron los siguientes valores:

Valores	
Top	38494
Bottom	7.787
LOG50	-4.965
HillSlope	-0.3854
R²	0.987

6. Utilizando los valores de la función 4PLC se calcularon las concentraciones de corticosterona para cada una de las muestras utilizando el despeje de *x* de la función 4PLC:

$$x = LogEC50 - \left(\frac{1}{HillSlope} \right) \left(Log \left[\frac{Top - Bottom}{y - Bottom} \right] \right)$$

7. Finalmente, los valores obtenidos a partir del despeje de *x* de la función 4PLC se multiplicaron por el factor de disolución para obtener las concentraciones netas de corticosterona en cada una de las muestras.