



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS

***EL ESTRÉS CRÓNICO REGULA LA EXPRESION DE LOS
RECEPTORES AMPA Y NMDA EN EL HIPOCAMPO DORSAL Y
VENTRAL DE RATAS HEMBRAS: PARTICIPACIÓN DE LOS
GLUCOCORTICOIDES***

Memoria para optar al título de Bioquímico

Felipe Antonio Olave Olave

Dra. Jenny Lucy Fiedler Temer
Directora de Tesis

Dra. Jenny Lucy Fiedler Temer
Profesor Patrocinante

Lugar de realización
Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Chile
Santiago-CHILE
Mayo 2019

*“La vida no es la que uno vivió,
sino la que uno recuerda
y cómo la recuerda para contarla.”*

(Gabriel García Márquez, Vivir para contarla)

AGRADECIMENTOS

Esta memoria de título se realizó gracias al financiamiento del proyecto de enlace 0118-01 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Chile.

El desarrollo de esta memoria fue un camino complejo y a la vez enriquecedor, lleno de desafíos y experiencias. Como toda experiencia de vida, en este camino no estuve solo, grandes personas estuvieron acompañándome y estoy agradecido de la presencia de cada uno.

En primer lugar, agradecer a mi familia, el núcleo desde donde empecé a crear mis principios y mi personalidad. Quiero agradecer a mi abuela Elena y a la Yaya, mi tía abuela, quienes a lo largo de todos estos años han depositado en mí su fe, entregándome alegría y apoyo, siendo la columna vertebral de un grupo familiar numeroso. A mis tíos y tías que han sido como padres, gracias por la preocupación y el apoyo en este proceso. A mis padrinos Angelica y Rafael, que durante este tiempo han estado presentes en todo aspecto. A mis primos Nicolas, Valeria y Aracelli, compañeros de niñez y de maldades, han sido un pilar fundamental, un lugar de descanso y complicidad, los quiero como hermanos. A todos mis primos menores, que con su inocencia han llenado este camino de alegrías. A Ricardo, gracias por formar y sentirte parte de esta familia sin ninguna otra motivación que el amor sincero hacia mi madre, lo has hecho bien. Noelia, hermana, la luz de mi vida, sé que puedo ser insoportable la mayoría del tiempo, pero nunca debes dudar que desde que llegaste a este mundo mi único interés es que seas feliz, y como he repetido millones de veces, yo no quiero ser un ejemplo para ti, lo que quiero es que hagas lo que te llene en la vida, siempre voy a estar para apoyarte. Gracias por su apoyo y especialmente por tanta paciencia y constancia, ni yo mismo me hubiera soportado así durante todos estos años, cada día estoy más sorprendido de su aguante.

También quiero agradecer a la gente del laboratorio. A la profe Jenny, mi mentora, guía y muchas veces compañera en el mesón de trabajo, muchas gracias por dejarme ser parte de este grupo espectacular, el ambiente en el laboratorio es familiar y acogedor, y mucho de esto es gracias a usted. A Anita María, gracias por darme ánimo y motivación cuando lo he necesitado, además de la gran ayuda con el summary. A mis compañeros, que han sido

fundamentales en el desarrollo de esta memoria. A Felipe, gracias por acogerme desde el primer día y ayudarme a aprender las técnicas básicas del lab. A Wladimir, compañero tanto del lab como de la práctica, gracias por la ayuda durante este tiempo y por entender mi humor especial. A Luciano y JP, que se nos unieron en el camino, han sido un gran aporte a nuestro equipo. A mis pupilos de Unidad de Investigación, Sarita y Fabián, fue un desafío aprender a enseñar, espero haber sido un aporte a su formación, gracias por su ayuda en el desarrollo de esta memoria.

Grandes agradecimientos a la gente del bioterio, en especial a Freddy, por su disposición, su trabajo y su buena onda.

Agradezco a mis amigos de la universidad, el piño, que a pesar de que el primer año no estuve muy presente, me acogieron como si siempre hubiera estado. Hemos pasado por momentos importantes, de alegría y de tristeza. A cada uno de ustedes los tengo siempre presentes. Como no recordar esas tardes infinitas de estudio los primeros años, y como no recordar también las tardes de compartir y conocernos en microclima, ustedes sin duda hicieron este camino mucho más fácil. Mención especial para personas hermosas que me entregó la universidad. A Italo, gracias por tu amistad incondicional, a pesar de que la academia nos separó siempre has estado presente. A la Clau, nuestra amistad se inició de la nada, pero le agradezco a la vida por ponerte en mi camino, gracias por acompañarme en todas y soportar mis formas inusuales de cariño. A la Pauli, que me ayudo a superar un momento crítico en la vida, siempre recuerdo los buenos malos viejos tiempos. A Pol, el primer amigo que tuve en la U, gracias por estar siempre que es necesario. A la Anita, gracias por estar siempre presente a pesar de que soy una persona un poco complicada, gracias por escucharme y entenderme todos estos años. A la Dani, mi amiguita y vecinita del quinto piso, tu sí que sabes por todas las que pasé durante este período, gracias por tu interés y tu apoyo, y gracias por dejarme entrar en tu vida. Al Nacho, gracias por la confianza que has depositado en mí, gracias por el apañe en los ramos y en los proyectos, eres un gran amigo. Si se me quedó alguien en el tintero, esperaré su reproche. Gracias a todos.

A mis amigos, mis hermanos. Francisco y Marcelo, es difícil no emocionarse al pensar en ustedes. La vida nos hizo conocernos en la infancia, nos juntó en la adolescencia y ni la

adulthood ni nuestros distintos caminos nos separaron. Ustedes son parte de mí, me dejaron entrar en sus familias y ustedes son parte de la mía. A pesar de que son los únicos que podrían reprocharme algo, siempre estuvieron apoyándome, de lejos, de cerca, siempre presentes. Gracias por entender y ayudarme en este proceso, y les prometo que siempre estaré aquí para lo que sea, los quiero mucho.

Por último, el agradecimiento más importante es para mi madre Sandra, espero ser digno de tener una madre como tú, que durante más de 25 años has sabido ser ejemplar, una mujer que contra todo problema siempre ha sabido sacar adelante a su familia, debes estar tranquila, porque has logrado formar hijos con principios claros y firmes, responsables y constantes en nuestros ámbitos, todo esto es por y para ti, tu orgullo ha sido siempre mi meta y espero estar a la altura.

García Márquez dice que la vida es la que uno recuerda y puede contar, la vida es un relato en busca de narrador. Estaré siempre agradecido de los grandes personajes que formaron parte de esta etapa de mi vida.

ÍNDICE GENERAL	Páginas
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La respuesta estrés y los glucocorticoides	3
1.2 La respuesta estrés es diferente dependiendo del sexo	6
1.3 El estrés crónico produce alteraciones en la neuroplasticidad hipocampal	9
1.4 El estrés modifica la expresión de receptores de glutamato	10
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos específicos	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 Animales y procedimiento de estrés crónico	13
4.2 Obtención de tejidos	15
4.3 Obtención de extractos de proteínas de hipocampo dorsal y ventral mediante centrifugación diferencial para Western blot	15
4.4 SDS-PAGE y Western blot	16
4.5 RT-qPCR	19
4.6 Análisis estadístico	21
5. RESULTADOS	22
5.1 Efectos del estrés crónico en la ganancia de peso corporal, evacuación fecal durante el procedimiento y peso de las glándulas adrenales	22
5.2 El estrés crónico afecta el consumo de alimento	23
5.3 Determinación de los transcritos <i>C-fos</i> y <i>Arc</i> como marcadores de actividad sináptica en el hipocampo dorsal y ventral	24

5.4 El estrés crónico afecta diferencialmente los niveles de mRNA de las subunidades del receptor AMPA y NMDA en los polos hipocampales	25
5.5 El CRS produce alteraciones diferenciales en los niveles de las subunidades del receptor AMPA en hipocampo dorsal y ventral.	26
5.6 El estrés modifica diferencialmente los niveles de las subunidades del receptor NMDA en hipocampo dorsal y ventral	29
5.7 Los efectos del estrés crónico en los niveles de las subunidades de AMPA no son mediados por CORT	34
5.8 Parte de los efectos del estrés crónico en los niveles de las subunidades de NMDA son mediados por CORT	36
5.9 La disminución sináptica de NR2A/NR2B inducida por el CRS en el hipocampo ventral es mediada por CORT	38
6. DISCUSIÓN	40
6.1 El estrés crónico reduce la ganancia de peso corporal y el consumo de alimento	40
6.2 El CRS altera diferencialmente los niveles de transcrito de los genes de expresión temprana <i>Arc</i> y <i>C-fos</i> y la actividad neuronal en hipocampo dorsal y ventral	41
6.3 El estrés crónico afecta diferencialmente la expresión y la distribución de las subunidades del receptor AMPA en hipocampo dorsal y ventral	43
6.4 El estrés crónico y la administración de CORT modifican la expresión y distribución de las subunidades del receptor NMDA en hipocampo dorsal y ventral	44
6.5 Modelo propuesto	46
7. CONCLUSIONES	49
8. LIMITACIONES Y PROYECCIONES	50
9. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

Figura 1: Prevalencia del desorden depresivo en Chile	2
Figura 2: Regulación hormonal del eje HHA	5
Figura 3: Diseño experimental y metodología	14
Figura 4: Obtención de extractos hipocampales mediante centrifugación diferencial y posterior separación por tamizaje de fracciones sinápticas enriquecidas	17
Figura 5: El CRS modifica los parámetros fisiológicos	23
Figura 6: Consumo diario de alimento	24
Figura 7: Niveles de mRNA de los genes de expresión temprana <i>Arc</i> y <i>C-fos</i>	25
Figura 8: Los niveles de transcrito de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA están diferencialmente alterados en el hipocampo dorsal y ventral de ratas hembras crónicamente estresadas	26
Figura 9: Efecto del estrés crónico en los niveles de las subunidades del receptor AMPA en extracto total de hipocampo dorsal y ventral de ratas hembras	27
Figura 10: El CRS afecta diferencialmente los niveles de las subunidades del receptor AMPA en fracción sinaptoneurosomal de hipocampo dorsal y ventral de ratas hembras	28
Figura 11: Efecto diferencial del CRS en los niveles de las subunidades del receptor NMDA en hipocampo dorsal y ventral de ratas hembras	30
Figura 12: El estrés crónico disminuye la razón NR2A/NR2B sin alterar los niveles de PSD-95 en extracto total de hipocampo dorsal	31
Figura 13: El CRS disminuye la razón NR2A/NR2B y los niveles de PSD-95 a nivel sináptico en el hipocampo ventral	32
Figura 14: Los efectos del estrés en GluA1 y GluA2 no son mediados por CORT	35
Figura 15: La administración de CORT emula parte de los efectos del estrés en las subunidades de NMDA	37
Figura 16: La administración de CORT emula el efecto del estrés en la razón sináptica NR2A/NR2B en el hipocampo ventral	38
Figura 17: Modelo propuesto	48

ÍNDICE DE TABLAS

Páginas

Tabla 1: Dilución del anticuerpo primario y condiciones de bloqueo utilizadas para el Western blot	19
Tabla 2: Secuencia de los partidores utilizados para el PCR cuantitativo	21
Tabla 3: Resumen de resultados del objetivo específico 1	33
Tabla 4: Resumen de resultados del objetivo específico 2	39

ABREVIATURAS

ACTH	: Hormona adrenocorticotropa
AMPA	: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AP-1	: Proteína activadora 1
ARC	: Regulada por actividad, asociada a citoesqueleto
BSA	: Albúmina de suero de bovino
CA1	: Cuerno de amón 1
CA3	: Cuerno de amón 3
CaMKII	: Calmodulina quinasa 2
cAMP	: Adenosin monofosfato cíclico
cDNA	: Ácido desoxirribonucleico codificante
CICUA	: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales
CORT	: Corticosterona
CPP	: Ácido 3-(2-Carboxipiperazin-4-il)propil-1-fosfónico
CRH	: Hormona liberadora de corticotropina
CRS	: Estrés crónico por restricción de movimiento
CUMS	: Estrés crónico leve e impredecible
DDM	: Desorden depresivo mayor
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
DTT	: Ditioneitol
EE. UU.	: Estados Unidos
GCs	: Glucocorticoides
GFAP	: Proteína ácida fibrillar glial
GluA1	: Subunidad 1 del receptor AMPA
GluA2	: Subunidad 2 del receptor AMPA
GR	: Receptor de glucocorticoides
HEPES	: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

HHA	: Hipotálamo – hipófisis - adrenales
LTD	: Depresión a largo plazo
LTP	: Potenciación a largo plazo
MINSAL	: Ministerio de Salud
MR	: Receptor de mineralocorticoides
NIMH	: Instituto Nacional de Salud Mental de EE. UU.
NMDA	: Ácido N-metil-D-aspártico
NR1	: Subunidad 1 del receptor NMDA
NR2A	: Subunidad 2A del receptor NMDA
NR2B	: Subunidad 2B del receptor NMDA
OMS	: Organización mundial de la salud
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	: Amortiguador fosfato salino
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PSD-95	: Proteína 95 de la densidad postsináptica
PVDF	: Polifluoruro de vinilideno
qPCR	: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNA	: Ácido ribonucleico
RT	: Transcripción inversa
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
Ser831	: Serina 831
Ser845	: Serina 845
TBS	: Amortiguador tris salino

RESUMEN

El desorden depresivo mayor es una patología invalidante cuya prevalencia asciende casi al doble en mujeres en comparación a los hombres. Sin embargo, los modelos animales utilizados para evaluar cuáles son los factores que pueden influenciar en la aparición de la patología se han realizado fundamentalmente en roedores machos. Respecto a la etiología de esta patología, se ha asociado a cambios en la conectividad entre estructuras cerebrales cortico-límbicas, efecto que puede ser producido entre otros factores por el estrés crónico. El hipocampo es una estructura del sistema límbico cuya función es integrar señales para regular procesos cognitivos y emocionales, funciones que son alteradas por el estrés crónico. El hipocampo es una red trisináptica compuesta en su mayoría por neuronas excitadoras, se postula que el desorden depresivo podría ser el resultado de los efectos del estrés crónico en la composición de los receptores AMPA y NMDA de glutamato en las neuronas hipocampales. Un hecho importante es que el hipocampo es una estructura heterogénea en su eje dorso-ventral; el hipocampo dorsal regula la función cognitiva, mientras que el hipocampo ventral se relaciona con el comportamiento emocional y motivacional.

El estrés crónico afecta la función hipocampal de forma diferencial según el sexo del individuo. En los machos produce efectos negativos en desafíos de aprendizaje y memoria, mientras en las hembras produce comportamientos de tipo ansioso y depresivo. Se ha demostrado, en ambos sexos, que estos efectos son mediados por los glucocorticoides. Adicionalmente, en ratas machos el estrés crónico induce un aumento en los niveles de transcrito de los genes de expresión temprana *C-fos* y *Arc* en ambos polos hipocampales, además de una disminución en la razón NR2A/NR2B del receptor NMDA en hipocampo dorsal, lo que podría estar relacionado a los efectos a nivel cognitivo observado producto del estrés. Esto lleva a formular la hipótesis de que, *“En ratas hembra, a diferencia de los machos, el estrés crónico reduce la razón de las subunidades NR2A/NR2B del receptor NMDA a nivel sináptico en el hipocampo ventral, efecto que es emulado por la administración de corticosterona, lo que podría relacionarse con los comportamientos de tipo depresivo”*.

En esta memoria de título demostramos mediante RT-qPCR y western blot que en ratas hembra el estrés crónico por restricción de movimiento produce cambios en los niveles de transcrito de los genes de expresión temprana *C-fos* y *Arc*, además de variaciones en la expresión de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA en hipocampo dorsal y ventral. En extracto total de hipocampo dorsal el estrés crónico produjo un aumento en la subunidad NR1 y una disminución en NR2A/NR2B. En extracto total de hipocampo ventral se produjo un aumento en la subunidad GluA1. Interesantemente, a nivel sináptico el estrés crónico no produjo efectos en el hipocampo dorsal; en cambio, en el hipocampo ventral se produjo una disminución tanto en GluA1 y GluA2 del receptor AMPA y una disminución en NR2A/NR2B del receptor NMDA. Esta desregulación sináptica en el hipocampo ventral fue acompañada por una disminución en el indicador sináptico PSD-95. Además, la disminución sináptica en NR2A/NR2B en el hipocampo ventral fue emulada por la administración crónica de corticosterona. Como proyección será importante determinar los efectos de nuestro modelo de estrés en ensayos electrofisiológicos para contrastarlos con los cambios observados en los receptores. Estos resultados, además de confirmar la hipótesis propuesta, sugieren que el estrés crónico en ratas hembra modifica la función del polo ventral del hipocampo, lo que podría explicar los comportamientos de tipo ansioso y depresivo en el comportamiento, siendo esto extrapolable al dimorfismo sexual asociado al fenotipo del desorden depresivo. Además, estos resultados recalcan la importancia de que los estudios biomédicos se realicen en ambos sexos y consideren además, la heterogeneidad estructural y funcional del hipocampo.

SUMMARY

Major depressive disorder is a disabling disease whose prevalence is almost twice as high in women compared to men, however, most of the animal models used to evaluate which factors can influence the onset of this pathology have been performed in male rodents. Its etiology has been associated with changes in the connectivity between cerebral cortico-limbic structures, an effect that can be produced by chronic stress, among other factors. The hippocampus is a structure of the limbic system whose function is to integrate signals to regulate cognitive and emotional processes and these functions are altered by chronic stress. The hippocampus is a trisynaptic network composed mostly of excitatory neurons. Evidence indicates that depressive disorder could be the result of the effects that chronic stress exerts upon the composition of the AMPA and NMDA glutamate receptors in hippocampal neurons. An important fact is that the hippocampus is a heterogeneous structure on its dorso-ventral axis; the dorsal hippocampus regulates cognitive function, while the ventral hippocampus is related to emotional and motivational behavior.

Chronic stress differentially affects hippocampal function according to sex. In males, it produces negative effects in learning and memory challenges, while in females, it produces anxious and depressive behavior. It has been shown that these effects in both sexes are mediated by glucocorticoids. Additionally, in male rats, chronic stress induces an increase in the transcript levels of the immediate early genes *C-fos* and *Arc* in both hippocampal poles, as well as a decrease in the NR2A/NR2B ratio of the NMDA receptor in the dorsal hippocampus, which could be related to the cognitive effects. This leads to the formulation of the hypothesis that in female rats, unlike the males, chronic stress induce a decrease in the NR2A / NR2B ratio of the NMDA receptor at synaptic level in the ventral hippocampus, effect that is emulated by chronic corticosterone administration, which could be related to depressive-type behaviors.

In this dissertation, we demonstrated by RT-qPCR and western blot that in female rats, chronic restraint stress produces changes in the transcript levels of the immediate early genes *C-fos* and *Arc*, along with alterations in the expression of AMPA and NMDA receptor

subunits in dorsal and ventral hippocampus. In total dorsal hippocampal extract, chronic stress produces an increase in the NR1 subunit and a decrease in the NR2A/NR2B ratio. In total ventral hippocampal extract, there was an increase in the GluA1 subunit. Interestingly, at the synaptic level, chronic stress did not produce effects in the dorsal hippocampus; however, in the ventral hippocampus, there was a decrease in both GluA1 and GluA2 AMPA receptor subunits and a decrease in the NMDA receptor NR2A/NR2B ratio. This synaptic dysregulation in the ventral hippocampus was accompanied by a decrease in the PSD-95 synaptic indicator. In addition, the synaptic decrease in NR2A/NR2B in the ventral hippocampus was emulated by the chronic administration of corticosterone. As a projection of this study, it will be important to determine the effects of our stress model in electrophysiological tests to contrast them with the changes observed in the receptors. These results, in addition to confirming the proposed hypothesis, suggest that chronic stress in female rats modifies the function of the ventral pole of the hippocampus, which could explain the effects of anxious and depressive type in behavior, being this extrapolated to the sexual dimorphism of the depressive disorder.

In addition, these results emphasize the importance of performing biomedical studies in both sexes, in addition to considering hippocampal heterogeneity.

1. INTRODUCCIÓN

Según la organización mundial de la salud (OMS), la depresión es un trastorno mental frecuente, caracterizado por la presencia de tristeza, pérdida de interés o placer (anhedonia), sentimientos de culpa, baja autoestima, trastornos del sueño y del apetito, sensación de cansancio y falta de concentración (OMS, 2018). Sin embargo, existen distintas clasificaciones de la depresión, cada una de ellas caracterizada por la presencia de algunos de los síntomas antes mencionados. Por ejemplo, en el trastorno ansioso-depresivo existe de forma moderada ansiedad y tristeza, por otro lado, en el trastorno bipolar se manifiestan episodios depresivos, que se alternan con otros episodios eufóricos (fase maníaca)(Das-Munshi y cols, 2008). La depresión atípica se caracteriza por la ansiedad, junto con un aumento del apetito e hipersomnias (Parker y cols, 2002). La clasificación más severa es el desorden depresivo mayor (DDM), el tipo de depresión que concentra la mayor cantidad de síntomas (Belmaker y Agam, 2008).

El DDM es una enfermedad caracterizada por un estado de ánimo invasivo persistente, anhedonia y baja autoestima, se considera una enfermedad invalidante, afectando a los hábitos de sueño, alimentación y salud en general. Esto además impacta negativamente el entorno familiar, social y laboral (Belmaker y Agam, 2008).

La prevalencia de DMM es casi el doble en mujeres que en hombres adultos. Según datos del Instituto Nacional de Salud Mental (NIMH) de Estados Unidos, el año 2016 la prevalencia de episodios de depresión mayor en ese país fue de 6,7% en los adultos, del que el 8,5% fueron mujeres 4,8% fueron hombres (NIMH, 2017). Este patrón de datos se repite a nivel mundial, con las mujeres doblando en prevalencia a los hombres. Según la encuesta nacional de salud realizada por el ministerio de salud entre los años 2016 y 2017, en Chile la prevalencia de depresión es de 6,2. Del total de hombres encuestados, el 2,1% tiene depresión. En el caso de las mujeres, el 10,1% de las encuestadas sufre de depresión (MINSAL, 2018) (Figura 1).

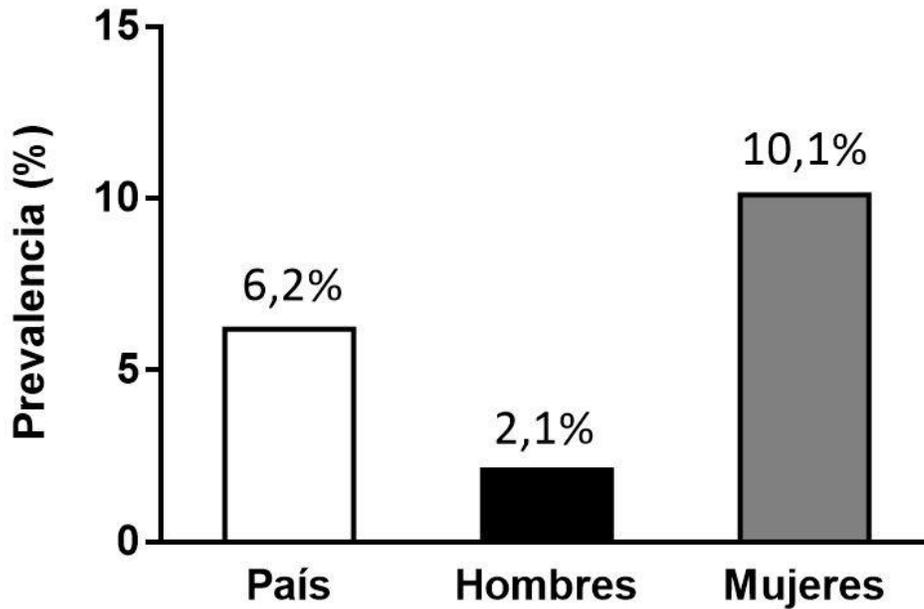


Figura 1| Prevalencia del desorden depresivo en Chile según la encuesta nacional de salud realizada en un periodo de 12 meses entre los años 2016 y 2017 por el Ministerio de Salud.

Estos datos hacen presente un gran problema, la mayoría de los estudios preclínicos se llevan a cabo en roedores machos, con el fin de evitar los efectos de las rápidas variaciones hormonales a lo largo del ciclo estral. Esto conlleva a que la mayoría de los tratamientos antidepresivos no sean específicos según el sexo, lo que pone en duda su verdadera eficacia. Además, en los últimos años la comunidad científica ha acordado extender la investigación biomédica a ambos sexos producto de las importantes variaciones en la manifestación de diversas enfermedades, entre las que las derivadas del estrés crónico son un claro ejemplo, como se describirá más adelante.

La etiología del trastorno depresivo es desconocida, sin embargo, actualmente se reconoce que la depresión puede ser heredable, no se ha detectado un gen responsable; sin embargo, se han descrito varios locus que podrían predisponer a la patología, y se han encontrado cambios diferenciales a nivel transcripcional en un sinnúmero de genes en función del sexo (Labonte y cols, 2017; Seney y cols, 2018). Mas aún, la exposición a eventos estresantes predispone al desarrollo de desórdenes depresivos. Por ejemplo, hechos estresantes como la muerte de un ser cercano, maltrato laboral o escolar, el

estrés social, la vida en las grandes ciudades, problemas de pareja o la soledad pueden inducir un trastorno depresivo (Kendler y cols, 2000). Mediante estudios de imagenología en sujetos con DDM se han determinado alteraciones en la conectividad entre estructuras corticales y subcorticales del cerebro pertenecientes al sistema límbico, como el tálamo, la amígdala y el hipocampo. Por ejemplo, se ha evidenciado una estrecha relación entre la disminución del metabolismo en la corteza prefrontal, en contraste con un aumento en el metabolismo de regiones límbicas como el cíngulo subgenual, lo que apoya la teoría de una alteración en circuitos corticolímbicos (Mayberg y cols, 1999). Mas aún, diversas evidencias sugieren cambios a nivel morfológico y molecular en las estructuras cerebrales ligadas a la regulación del estado anímico y emocional (Krishnan y Nestler, 2008). Se ha determinado que los cambios morfológicos en estructuras límbicas y corticales del cerebro están fuertemente asociados con el desarrollo de desórdenes depresivos. Por ejemplo, un gran número de evidencias respalda que la disminución del volumen del hipocampo se asocia al desarrollo de la depresión y otros desórdenes derivados del estrés crónico (MacQueen y Frodl, 2011). El hipocampo es una estructura del sistema límbico relacionada con la adquisición de memoria y respuestas emocionales. Además, el hipocampo es sensible a las hormonas asociadas al estrés como los glucocorticoides, efecto que es mediado por la presencia de receptores de alta y baja afinidad a dichas hormonas, participando además en la retroalimentación negativa del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) en respuesta al estrés (MacQueen y Frodl, 2011).

1.1 La respuesta estrés y los glucocorticoides

Existen diversos agentes que promueven una respuesta de estrés, por lo tanto, son definidos como estresores (Baum y cols, 1990). Estos son sentidos a nivel cerebral, desencadenando una respuesta neuroendocrina, cuyos mediadores dependen de la naturaleza del agente (Baum y cols 1990). Durante la respuesta estrés se desarrollan varios eventos con el fin de mantener la homeostasis del individuo. Desde el punto de vista temporal, durante los primeros segundos se observa una respuesta temprana, que consiste en la activación del sistema nervioso simpático, lo que resulta en la liberación

de noradrenalina desde las terminales sinápticas en forma sistémica, asociado también a una respuesta hormonal mediada por la adrenalina desde la médula adrenal (Senba y cols, 1993). De forma relativamente tardía (minutos) se produce una respuesta hormonal, en la que es importante la liberación de neuropéptidos como la hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde los núcleos paraventriculares del hipotálamo, la que activa el eje HHA (Hall y cols, 2015). Es así como la CRH al difundir hacia la hipófisis actúa sobre sus receptores gatillando la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), lo que finalmente desencadena la síntesis y liberación episódica de las hormonas esteroidales denominadas glucocorticoides (GCs, cortisol en humanos, corticosterona o CORT en roedores) desde la corteza suprarrenal (Hall y cols 2015) (Figura 2). La secreción de GCs es un evento clave para mantener la homeostasis, especialmente en la respuesta de adaptación al estrés (Hall y cols 2015). Además, los niveles circulantes de GCs exhiben ritmos de secreción circadianos, con niveles bajos durante período de reposo, y niveles mayores durante períodos activos (Hall y cols 2015). Estos ritmos de secreción hormonal son claves para la regulación de procesos metabólicos y del comportamiento. La disrupción del ritmo de secreción circadiana de los GCs por la exposición a estresores crónicos puede alterar los procesos homeostáticos desencadenando condiciones patológicas (Hall y cols 2015).

Por su naturaleza química esteroidea, los GCs difunden a través de las membranas biológicas y en el citosol se unen a los receptores de glucocorticoides (GR) y a los receptores de mineralocorticoides (MR), con baja y alta afinidad, respectivamente. En ausencia de GCs, los receptores se encuentran predominantemente en el citosol formando complejos con chaperonas, las que le confieren una alta afinidad por su ligando (Dittmar y cols, 1997). Tras la unión del ligando los receptores sufren cambios conformacionales que les permiten disociarse de las chaperonas y exponer secuencias de localización nuclear. Una vez en el núcleo interaccionan con coactivadores y co-represores, pudiendo así activar o reprimir diversos genes. Esta respuesta genómica se reconoce como respuesta canónica de los GCs (Ramamoorthy y Cidlowski, 2016). Actualmente, se conoce que GR y MR pueden estar anclados a la membrana plasmática

y producir efectos rápidos no genómicos (Groeneweg y cols, 2011). Por ejemplo, se ha evidenciado que la administración crónica de CORT es capaz de inducir la liberación de glutamato mediante GR de membrana en el hipocampo de ratas macho (Wang y Wang, 2009). Debido a que el MR tiene una baja ocupancia, pero una alta afinidad por los GCs, es capaz de regular los ritmos circadianos basales, comandando la actividad HHA durante el día (Ramamoorthy y Cidlowski, 2016). En contraste, el GR al poseer una alta ocupancia, pero baja afinidad por los GCs, contribuye a la retroalimentación negativa del eje HHA a nivel de hipotálamo e hipófisis, inhibiendo la secreción de CRH y ACTH. De esta forma el GR es el que frena la respuesta estrés del eje HHA, permitiendo la adaptación del comportamiento y la recuperación del estrés (Hall y cols 2015).

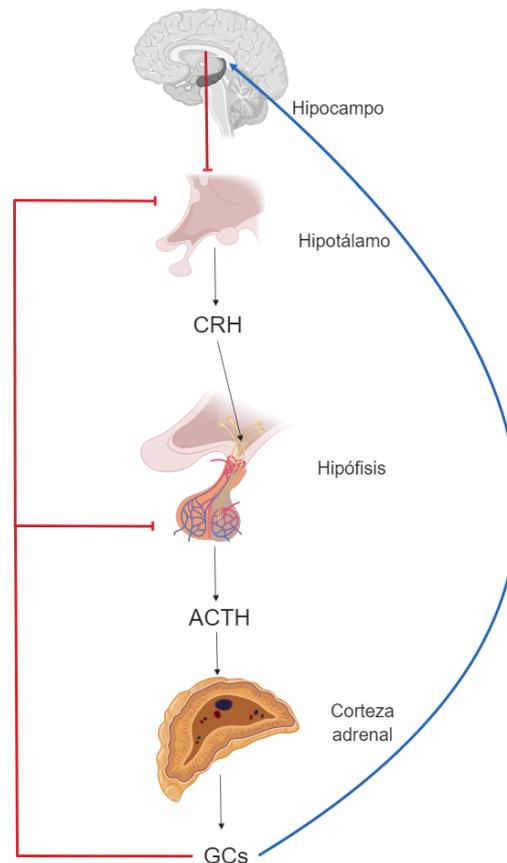


Figura 2| Regulación hormonal del eje HHA. Durante la respuesta estrés se produce un aumento en liberación de GCs desde la corteza adrenal gracias a la liberación de CRH y ACTH desde el hipotálamo y la hipófisis, respectivamente. Los GCs producen retroalimentación negativa a nivel de hipotálamo e hipófisis, además actúan en el hipocampo, que comanda la retroalimentación negativa inhibiendo la respuesta del hipotálamo. Las líneas rojas indican inhibición y la flecha azul indica estimulación.

El principal actor en la inhibición de la actividad del eje HHA en respuesta al estrés es el hipocampo, acción que se lleva a cabo a través de redes sinápticas inhibitorias hacia el hipotálamo (McEwen, 1999; McEwen y cols, 1986) (figura 2). El hipocampo exhibe una red trisináptica excitadora cuyo principal neurotransmisor es el glutamato, forma parte del sistema límbico y su función está relacionada con el almacenamiento de memoria episódica, memoria espacial, aprendizaje y además participa en la regulación de estados emocionales (Moser y Moser, 1998).

Existen diversos paradigmas de estrés crónico que permiten estudiar sus efectos en el comportamiento de roedores. Por ejemplo, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el estrés crónico por restricción de movimiento (CRS) en ratas macho produce alteraciones en el comportamiento, como imposibilidad de enfrentar el estímulo estresor (desesperanza aprendida), ansiedad y comportamiento del tipo anhedónico, siendo este último, el síntoma principal que caracteriza al desorden depresivo (Bravo y cols, 2009; Castaneda y cols, 2015; Garcia-Rojo y cols, 2017). Interesantemente, la administración crónica de corticosterona, una de las principales hormonas secretada en la respuesta estrés en roedores, puede reproducir parte de estos comportamientos de tipo depresivo (Ulloa y cols, 2010).

1.2 La respuesta estrés es diferente dependiendo del sexo

Durante los últimos años la investigación ha tendido a comparar los cambios neuroquímicos y de comportamiento entre machos y hembras, con la finalidad de poder comprender tanto la etiología como la prevalencia con respecto al sexo de ciertas patologías asociadas al estrés crónico, como es el caso del DDM. De hecho, la respuesta estrés se manifiesta de forma distinta en machos y hembras. Es así por ejemplo, que el consumo de alimento disminuye en hembras en función del número de sesiones de restricción de movimiento, mientras que en machos, la reducción en la ingesta de alimento observada en las primeras sesiones de estrés vuelve a niveles normales luego del quinto día de exposición al agente estresor (Pare y cols, 1999). Por otra parte, en el modelo de estrés crónico leve e impredecible (CUMS), que combina la exposición

aleatoria de diferentes estresores (luz durante la noche, presencia de nuevos objetos, periodos de privación de agua o alimentos, cambios de jaula, entre otros) produce un mayor grado de anhedonia en hembras que en machos (Chmielarz y cols, 2015).

El estrés y los GCs afectan la función hipocampal diferencialmente según el sexo. El hipocampo es una estructura cerebral heterogénea en su eje dorso-ventral. Por estudios de lesión en roedores, se ha determinado que la región dorsal del hipocampo (posterior en humanos) está relacionada con funciones mayoritariamente cognitivas como el aprendizaje, la adquisición de memoria episódica en humanos y memoria espacial en roedores (Fanselow y Dong, 2010; Rahman y cols, 2003). Por otro lado, la región ventral del hipocampo (anterior en humanos) está conectada a estructuras subcorticales (núcleo accumbens y amígdala), lo que determina su implicancia con comportamientos de tipo emocional y motivacional (Fanselow y Dong, 2010). Mas aún, la porción del hipocampo ventral proyecta hacia el hipotálamo produciendo una reducción en la actividad del eje HHA en respuesta al estrés (Jacobson y Sapolsky, 1991).

Antecedentes indican que la función hipocampal se modifica tanto en pacientes deprimidos como en modelos de estrés en animales (Sanacora y cols, 2012). Ratas expuestas a CRS por 21 días exhiben un aumento persistente en la liberación de glutamato, principal neurotransmisor excitatorio, en la región CA3 del hipocampo luego de un único desafío estresor, en comparación con ratas control (Popoli y cols, 2011). Interesantemente, el incremento en la liberación de glutamato puede ser imitado por la administración aguda de CORT a ratas adrenalectomizadas (Moghaddam y cols, 1994). Además, se ha demostrado que el estrés modifica la función hipocampal diferencialmente en machos y hembras. Por ejemplo, en ratas macho, el estrés por restricción de movimiento tanto agudo como crónico producen alteraciones en aprendizaje y adquisición de memoria espacial, mientras las ratas hembras muestran un mejor desempeño espacial frente a varios desafíos (Bowman y cols, 2001). El tratamiento crónico con CORT durante 3 meses en machos, produce una disminución en el desempeño en diferentes desafíos de memoria espacial (McLay y cols, 1998). En hembras, la exposición repetida a CORT por 21 días produce comportamiento de tipo

depresivo, acompañado por algunos signos de tipo ansioso (Kalynchuk y cols, 2004), sugiriendo una relación entre los GCs y el comportamiento.

A su vez, hombres y mujeres responden diferencialmente al estrés; donde las mujeres experimentan ansiedad y tristeza, mientras los hombres exhiben comportamientos más motivados (Chaplin y cols, 2008). Estos antecedentes sumados a las observaciones en roedores sugieren que el estrés crónico reduce la función cognitiva en machos, lo que apunta a que el estrés crónico produce un mayor efecto en el hipocampo dorsal, mientras en hembras desencadena comportamientos emocionales relacionados a la depresión y la ansiedad, conductas que se relacionan directamente con modificaciones en la función del hipocampo ventral.

Como se mencionó anteriormente, se ha evidenciado que el hipocampo inhibe la actividad HHA, especialmente durante la respuesta al estrés (Jacobson y Sapolsky, 1991). La expresión de GR en el hipocampo también es diferente en machos y hembras. Es así como los machos poseen mayores niveles de GR en el área CA1 del hipocampo en comparación a las hembras (Kitraki y cols, 2004). Sin embargo, la exposición a CRS de 21 días reduce los niveles de GR en CA1 y giro dentado en ratas macho, mientras que en ratas hembra produce un aumento en CA1 (Kitraki y cols 2004). Estas diferencias en los niveles de GR en condiciones basales y en respuesta al estrés crónico podría dar cuenta de una sensibilidad diferencial del eje HHA a la retroalimentación negativa de los GCs según el sexo (Gallucci y cols, 1993). Por ejemplo, la baja densidad de GR en CA1 en hembras podría explicar los mayores niveles basales de corticosterona en comparación a los machos (Kitraki y cols 2004). Sin embargo, a la fecha no se ha determinado ni en machos ni hembras si existen diferencias en los niveles basales entre los polos dorsal y ventral del hipocampo, o si la administración crónica de CORT es capaz de reproducir el efecto del CRS en los niveles de GR.

1.3 El estrés crónico produce alteraciones en la neuroplasticidad hipocampal

La neuroplasticidad o plasticidad cerebral es la propiedad de las neuronas de adaptarse en respuesta a estímulos; es decir, la capacidad de reconfigurar sus conexiones sinápticas para afrontar un cambio. Dicho cambio puede ser un daño físico o un estímulo como el sometimiento a un estresor (Pittenger y Duman, 2008). La neuroplasticidad puede ser evaluada en términos de modificaciones en la eficacia sináptica, la que puede comprometer el proceso de liberación y captación del neurotransmisor, como también la densidad de receptores presinápticos y postsinápticos. Es así como se ha descrito tanto la potenciación como la depresión a largo plazo (LTP y LTD, respectivamente), términos que están fuertemente relacionados a las funciones hipocampales de aprendizaje, memoria y adaptabilidad. La LTP es una intensificación de larga duración en la neurotransmisión glutamatérgica, que resulta en la estimulación sincronizada y a alta frecuencia (Bliss y Collingridge, 1993). Se cree que la LTP tiene un rol fundamental en los mecanismos subyacentes a la consolidación del aprendizaje y la memoria (Bliss y Collingridge, 1993). Por otro lado, la LTD se produce por una estimulación a baja frecuencia en las neuronas, que resulta en la lenta debilitación de las conexiones sinápticas, disminuyendo la eficacia de la neurotransmisión. Durante mucho tiempo se aceptó que la LTP y la LTD ejercían funciones opuestas (memoria y olvido, por ejemplo). Sin embargo, la LTD no puede ser considerada como el proceso opuesto a la LTP en términos de su función biológica, puesto que evidencia actual indica que se requiere para la formación de memoria (Ito, 1989). Tanto la LTP como la LTD son necesarias y esenciales para la función hipocampal.

La respuesta estrés también conlleva cambios neuroplásticos y el hipocampo posee una adaptabilidad superior a otras estructuras cerebrales en respuesta a estímulos estresores (McEwen, 1999). Interesantemente, se han encontrado diferencias en esta respuesta en los distintos polos del hipocampo. Se ha descrito que el hipocampo ventral de roedores machos tiene una capacidad reducida de generar LTP en relación a la porción dorsal (Segal y cols, 2010). En contraste, el estrés agudo o la administración de CORT en roedores machos facilita la LTP en hipocampo ventral, pero en cambio la

suprime en el polo dorsal (Maggio y Segal, 2011). Estas modificaciones pueden explicar la respuesta emocional (hipocampo ventral) y déficit cognitivo (hipocampo dorsal) observados en respuesta al estrés crónico. Más aún, el CUMS en machos induce una reducción de la LTD en el hipocampo ventral (Pinto y cols, 2015). Se ha propuesto que las alteraciones en la neuroplasticidad aquí descritas podrían estar relacionadas con cambios en la expresión de receptores glutamatérgicos (Pacheco y cols, 2017).

1.4 El estrés modifica la expresión de receptores de glutamato

A pesar de todas las diferencias ya establecidas en la respuesta a estrés crónico en el hipocampo de machos y hembras, existe una mayor descripción de estos efectos en machos, sobre todo en lo que respecta a la transmisión glutamatérgica. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central, luego de ser liberado actúa en sus receptores específicos a nivel pre y postsinápticos (Orrego y Villanueva, 1993).

Los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) están formados por tetrámeros de sus subunidades GluA1-4, los que forman un canal permeable a iones sodio y calcio. La conformación del receptor AMPA también determina sus características funcionales (Matsubara y cols, 1996). Por ejemplo, los receptores que contienen GluA2 muestran menor permeabilidad a calcio que los que no lo contienen (Hollmann y cols, 1991). Por otra parte, el receptor NMDA es un receptor de glutamato conformado por varias subunidades (NR1-3) las cuales pueden formar estructuras tetraméricas o pentaméricas. Estas estructuras forman un canal iónico permeable a calcio, por lo que su activación promueve la depolarización de la membrana celular (Lynch y Guttman, 2001). La subunidad NR1 es constitutiva para el receptor NMDA, y puede formar el canal en asociación con NR2A o NR2B. Así, los niveles de NR1 son indicativos del nivel total de receptores NMDA. Las características funcionales del canal dependen del tipo de subunidad NR2 que forme el receptor, lo que determina a su vez cambios en la plasticidad sináptica (Barria y Malinow, 2005). Por ejemplo, los receptores que contienen NR2B, se unen con más afinidad a CaMKII (calcio

calmodulina quinasa) que los que poseen la subunidad NR2A, por lo tanto, estos últimos causan una reducción dramática en la LTP (Barria y Malinow, 2005). Por este motivo, el cociente NR2A/NR2B es utilizado para determinar la predisposición a la formación de LTP, aunque esto último es controversial, otro grupo ha determinado que un incremento en NR2A no altera la LTP, pero favorece la LTD (Cui y cols, 2013).

Nuestro laboratorio ha descrito que el CRS en ratas macho produce un aumento en los niveles de GluA1 en hipocampo ventral, además de un aumento en la subunidad NR1 del receptor NMDA y una disminución en la razón NR2A/NR2B en hipocampo dorsal (Pacheco y cols 2017). Estos datos sugieren que en respuesta al estrés existe un mecanismo que permite desfavorecer la configuración de receptores con NR2A; efecto que, al producirse en el hipocampo dorsal, podría dar cuenta de la reducción en la capacidad de aprendizaje.

También sabemos que el estrés crónico en machos afecta a las conexiones sinápticas en el hipocampo, lo que se demuestra por el aumento de los niveles del indicador postsináptico PSD-95 en sinaptosomas de hipocampo ventral (Pacheco y cols 2017). Estas modificaciones en machos podrían ser indicativas de cambios en las características electrofisiológicas de la transmisión glutamatérgica y de la función hipocampal como consecuencia del estrés crónico; sin embargo, desconocemos si ocurren cambios similares en hembras.

Debido a que el estrés no afecta la capacidad de aprendizaje en hembras, se podría esperar que el estrés no modifique los niveles de las subunidades de receptores NMDA en el hipocampo dorsal. En cambio, esperamos cambios en la composición del receptor que favorezca la LTP en hipocampo ventral; es decir una reducción en NR2A/NR2B sináptico; lo cual podría explicar el comportamiento más emocional observado en hembras. A su vez, se desconoce si los cambios en componentes de las sinapsis excitadoras producidos por el estrés crónico se deben a la acción de los GCs en el hipocampo de hembras. El desarrollo de esta memoria de título tiene como objetivo aportar al conocimiento del efecto del estrés y de su principal mediador, la

corticosterona, sobre componentes de las sinapsis excitadoras, lo que puede explicar la respuesta diferencial del eje HHA en hembras.

Según los antecedentes expuestos:

- El DDM tiene el doble de prevalencia en mujeres que en hombres a nivel mundial y el estrés es uno de los principales factores que predispone a la aparición de éste.
- A diferencia de los machos, la actividad del eje HHA en hembras presenta una menor sensibilidad a la inhibición por los GCs.
- El hipocampo dorsal se relaciona con funciones cognitivas, como aprendizaje y memoria, mientras que el hipocampo ventral se relaciona con las emociones y la motivación.
- En hembras el estrés crónico produce comportamientos depresivos, mientras que en machos afecta principalmente la función cognitiva y parte de estos efectos dependen de la corticosterona.
- En ratas macho el estrés crónico produce una reducción de NR2A/NR2B en el hipocampo dorsal, lo que podría explicar el detrimento en la función cognitiva observada producto del estrés crónico.
- El estrés crónico induce en hembras un efecto de tipo emocional, lo que sugiere una alteración sináptica en el hipocampo ventral.

2. HIPÓTESIS

“A diferencia de los machos, el CRS reduce la razón de las subunidades NR2A/NR2B del receptor NMDA a nivel sináptico en el hipocampo ventral de ratas hembras, efecto que es emulado por la administración de corticosterona”.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Demostrar que el CRS induce una reducción en la relación NR2A/NR2B a nivel sináptico en el hipocampo ventral de ratas hembras, y que este es dependiente de corticosterona.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Determinar que el CRS afecta diferencialmente los polos hipocampales dorsal y ventral en relación a los componentes de la transmisión glutamatérgica relacionados a la composición en las subunidades del receptor NMDA a nivel sináptico.

3.2.2 Establecer que los cambios observados dependen de la corticosterona.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales y procedimiento de estrés crónico

Se utilizaron 40 ratas *Sprague Dawley* hembras adultas con un peso entre 130-170 g al inicio de los procedimientos. Los animales fueron criados y mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile en un ciclo controlado de luz/oscuridad de 12/12 horas, a temperatura de $\pm 22^{\circ}$ C y con 45% de humedad. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a los protocolos establecidos y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (Código de aprobación CBE: CBE2018-04).

Las ratas se mantuvieron con agua y alimentos a libre disponibilidad, se pesaron diariamente hasta alcanzar pesos entre 250-280 g. Estos procedimientos además son útiles para la adaptación de los animales a la manipulación y tuvieron una duración de aproximadamente dos semanas. Los animales fueron divididos en tres grupos experimentales: Grupo control (C), estrés crónico (RS) y administración crónica de corticosterona (CORT) (figura 3). Los procedimientos comenzaron cuando las ratas

alcanzaron una edad de 60 a 70 días y ciclaban regularmente. No se tomó en cuenta el estadio del ciclo estral.

El grupo CORT recibió una dosis diaria de CORT disuelta en propilenglicol 30 mg/kg de animal por vía subcutánea durante 14 días, que permite alcanzar niveles séricos de corticosterona semejantes a los observados en condición de estrés crónico (figura 3). El grupo control fue pesado diariamente y fueron inyectados con propilenglicol (1µl/g de animal) vía subcutánea, esto para poder ser comparado con los otros grupos experimentales (figura 3). Para el último grupo experimental, se administró propilenglicol vía subcutánea como al grupo control y los animales fueron sometidos durante 2,5 h a CRS. Este paradigma estresor consiste en posicionar a los animales en tubos de acrílico de 55 mm de diámetro para restringir su movimiento, en los ejes transversal y anteroposterior, permitiendo el movimiento en el eje longitudinal (figura 3).

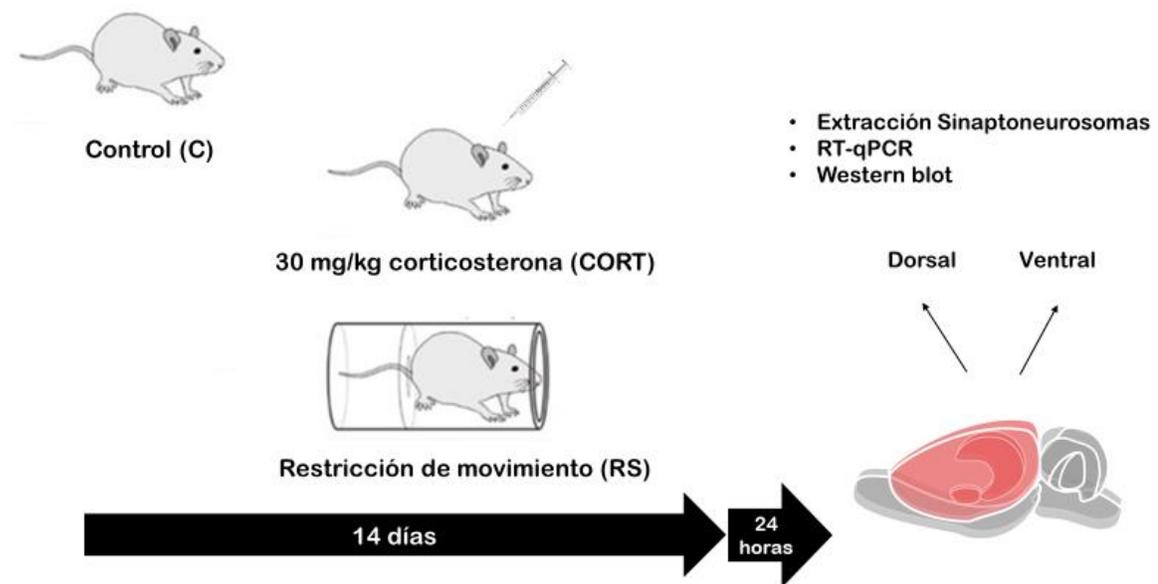


Figura 3 | Diseño experimental y metodología. Los animales se dividieron aleatoriamente en los grupos control (C), estrés crónico (RS) y administración crónica de corticosterona (CORT). Se realizaron los procedimientos correspondientes durante 14 días entre 9 AM y 12 PM. Luego de 24 horas desde la última sesión, los animales fueron sacrificados por decapitación. Se disecó el hipocampo separando polos dorsal y ventral para luego realizar los análisis experimentales que serán descritos posteriormente.

El procedimiento de estrés se realizó de acuerdo con los estándares del laboratorio, por 14 días consecutivos. Las sesiones de restricción se realizaron durante la mañana (entre las 9:00 AM y 12:00 PM) para dejar de lado los efectos inespecíficos de los ciclos circadianos (por ejemplo, variaciones en los niveles de corticosterona). Durante este procedimiento los animales no tuvieron acceso a agua ni comida. Durante las sesiones de estrés, se cuantificaron las heces producidas por los animales para ser comparadas con el grupo control. Además, se determinó el porcentaje de consumo de alimento de forma indirecta, diariamente se dejaron 200 g de alimento en pellet y se determinó el peso del alimento restante a la misma hora del día siguiente.

4.2 Obtención de tejidos

Luego de 24 horas de la última sesión de estrés los animales fueron eutanasiados por decapitación mediante el uso de una guillotina para animales menores y se recolectó una muestra de sangre en un tubo cónico de 15 ml sin anticoagulante para su posterior centrifugación y obtención de suero. De forma rápida y estéril se extrajeron los hipocampos, se dividieron los polos dorsal y ventral, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y fueron almacenados a -80°C para la posterior obtención de extractos de proteínas y RNA. Además, se extrajeron las glándulas adrenales para determinar su peso.

4.3 Obtención de extractos de proteínas de hipocampo dorsal y ventral mediante centrifugación diferencial para Western blot

Los hipocampos dorsales y ventrales fueron descongelados por 5 minutos en 1,5 ml de amortiguador SNS1 (Sacarosa 0,35 M, Hepes 0,01 M pH 7,4, DTT 0,25 mM), en presencia de un cóctel inhibidor de proteasas (complete EDTA-free, Roche, Alemania) y un cóctel clásico de inhibidores de fosfatasas (Na_3VO_4 0,125 mM, NaF 2 mM y pirofosfato de sodio 0,25 mM) (figura 4). Luego fueron homogeneizados en un homogeneizador vidrio-teflón con 30 pasajes con un motor a mínima velocidad (2 rev/s) (figura 4). De este homogeneizado inicial se tomaron 300 μl como homogeneizado total (H) para análisis de proteínas y se tomaron 300 μl para la obtención de RNA (figura 4). Los 1,1 ml restantes se centrifugaron a $1000 \times g$ por 10 minutos a 4°C , se vertió el sobrenadante

en un tubo cónico de 15 ml con 6 ml de SNS1, se resuspendió el pellet en 1,5 ml de SNS1 y se rehomogeneizó con 30 pasajes y se centrifugó a 1000 g por 10 minutos a 4°C (figura 4). El pellet fue resuspendido en 300 µl de SNS1 y se guardó como fracción nuclear (N). El sobrenadante se juntó con el anterior y se hizo pasar por filtros de 100, 80, 30 y 10 µm en forma consecutiva utilizando jeringas estériles de 10 ml y realizando todo el procedimiento a 4°C (figura 4). El filtrado fue centrifugado a 18000 x g por 20 minutos a 4° C (Thermo Scientific Sorvall centrifuge, Thermofisher, EE. UU.). Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 200 µl de amortiguador de lisis SNS2 (Hepes 0,01 M pH 7,4, DTT 0,25 mM, inhibidores de fosfatasa y proteasas), y esta fracción corresponde a los sinaptoneurosomas (S) (figura 4). Parte de las fracciones de extracto total, nuclear y sinaptoneurosomal fueron denaturadas en relación 3:1 con amortiguador de carga (concentración final de: Tris 250 mM pH 6,8, SDS 5%, glicerol 6,7% v/v, DTT 0,512 mg/ml, azul de bromo fenol 13,33 mg/ml). Finalmente, las muestras fueron alicuotadas y calentadas a 95° durante 5 minutos y fueron congeladas a -80°C para su análisis en geles de poliacrilamida. La cuantificación de proteínas de todas las fracciones extraídas se realizó mediante un kit basado en el método del ácido bicinónico (Sapan y cols, 1999). En microplacas de 96 pocillos, utilizando como estándar suero bovino albúmina (BSA) y midiendo la absorbancia a 562 nm. La preparación de las fracciones fue validada cualitativamente mediante Western blot.

4.4 SDS-PAGE y Western Blot

Las proteínas fueron resueltas en geles de poliacrilamida-SDS. Se utilizó un gel concentrador compuesto por 5% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), SDS 0,1% y Tris 125 mM A pH 6,8. El gel separador se preparó al 10% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), SDS 0,1% y Tris 375 mM pH 8,8. La electroforesis fue realizada en una cámara Mini Protean III (Biorad, EE. UU.) en amortiguador Tris 2,5 mM, SDS 0,01%, glicina 19 mM. Se resolvieron 30 µg de proteína en el caso del homogenizado, y 15 µg para la fracción sinaptoneurosomas y nuclear, utilizando 4 µl de un estándar de peso molecular de rango amplio.

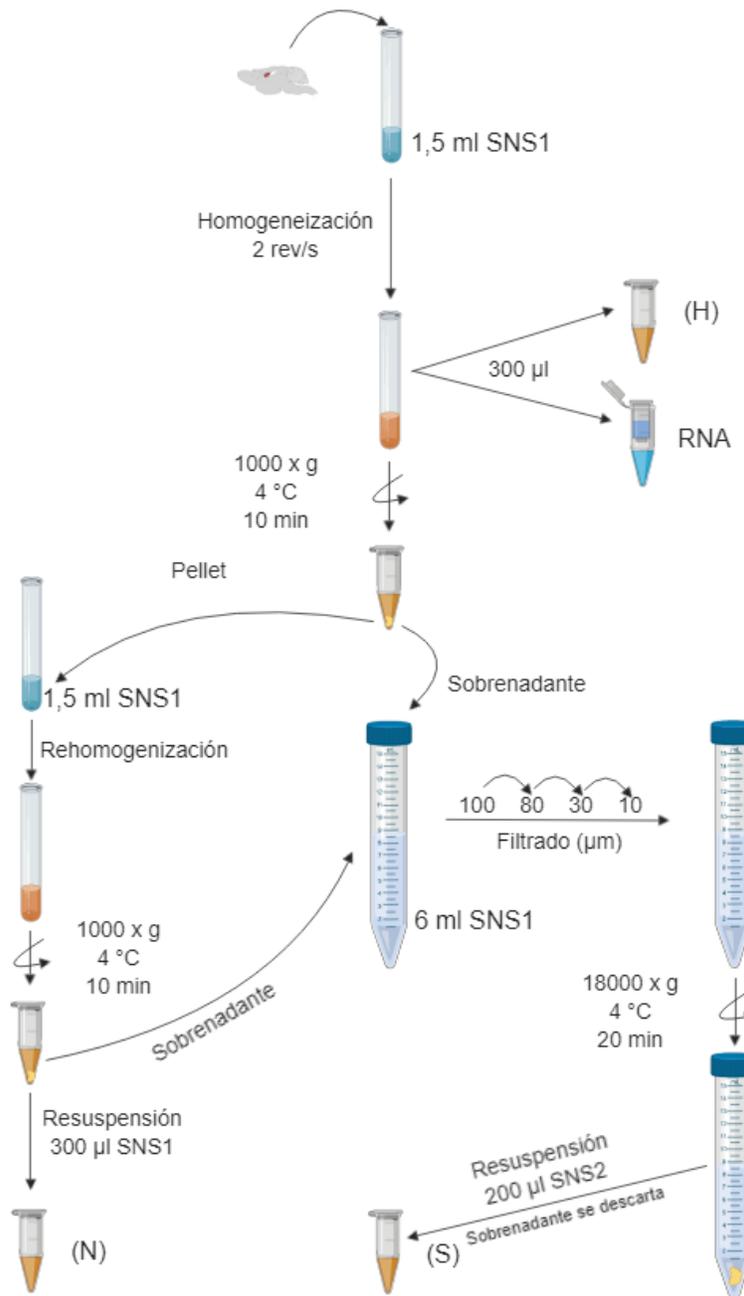


Figura 4| Obtención de extractos hipocámpales mediante centrifugación diferencial y posterior separación por tamizaje de fracciones sinápticas enriquecidas. El tejido hipocámpal fue descongelado y homogeneizado en un homogeneizador vidrio-teflón en 1,5 ml de amortiguador SNS1. Del homogeneizado obtenido se tomaron 300 µl para la obtención e identificación de proteínas (H) y 300 µl para la purificación de RNA. El homogeneizado restante fue centrifugado a 1000 x g a 4 °C por 10 minutos, el sobrenadante se vertió en un tubo cónico con 6 ml de SNS1 y el precipitado fue rehomogeneizado en 1,5 ml de SNS1. El homogeneizado se centrifugó a 1000 x g a 4 °C por 10 minutos, el sobrenadante se vertió en el mismo tubo con 6 ml de SNS1 utilizado anteriormente y el precipitado fue resuspendido en 300 µl de SNS1 y almacenado como fracción nuclear (N). El contenido del tubo cónico se hizo pasar consecutivamente por filtros de 100, 80, 30 y 10 µm de diámetro. El filtrado se centrifugó a 18000 x g a 4 °C por 20 minutos. El sobrenadante fue descartado, el precipitado fue resuspendido en 200 µl de SNS2 y almacenado como fracción sinaptoneurosomal. Se agregó amortiguador de carga en un tercio del volumen final a todas las fracciones destinadas a la determinación de proteínas. Las fracciones fueron hervidas a 95°C por 5 minutos y almacenadas a -80°C.

Luego, se realizó la electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (PROTRAN™, PerkinElmer, EE. UU.) o polifluoruro de vinilideno (PVDF) (PolyScreen 2, PerkinElmer, EE. UU.) en una celda de transferencia *mini Trans-blot mini Protean III* (BioRad, EE.UU.), en amortiguador de transferencia preparado con glicina 19 mM, Tris 2,5 mM en metanol 20% v/v para proteínas menores a 100 kDa, y metanol 5% para proteínas mayores a 100 kDa. Las electrotransferencias se realizaron a 4°C. Luego, las membranas fueron lavadas con PBS o TBS 1X con o sin Tween 20 al 0,1% v/v, dependiendo de las proteínas de interés. Posteriormente se realizó un bloqueo con leche o BSA de concentración dependiente de la proteína de interés. Se incubó con anticuerpo primario en la solución de bloqueo utilizada anteriormente durante la noche en el caso de la mayoría de las proteínas, y durante una hora en el caso de la β -actina en membrana de nitrocelulosa. Las condiciones y concentraciones de incubación se encuentran descritas en la tabla 1. Luego de la incubación con anticuerpo primario, se realizaron tres lavados de cinco minutos con el amortiguador en el que se incubó con anticuerpo. Finalmente, las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-especie en dilución 1:10.000 en leche al 3% p/v en TBS-Tween 0,1% v/v durante dos horas, o una hora en el caso de la β -actina en membrana de nitrocelulosa, se realizaron nuevamente los tres lavados mencionados anteriormente y las membranas fueron reveladas.

Las membranas fueron reveladas por el método de quimioluminiscencia, se incubó con los sustratos *EZ-ECL* (Biological Industries, EE. UU.) para la peroxidasa durante aproximadamente un minuto. Fueron expuestas en el equipo G: *BOX Chemi XT4* (Syngene, Frederick, MD, EE. UU.) mediante su software *GeneSys*. Las bandas se analizaron mediante densitometría utilizando el programa *UN-SCAN-IT gel Automated Digitizing System Versión 4,1 Windows* (Silk Scientific Inc., Orem, UT, EE.UU.). Para determinaciones semicuantitativas, la intensidad de las bandas de cada proteína fue normalizada con respecto a la intensidad de la banda de la proteína constitutiva β -actina, valor que se relativizó con respecto a la condición control.

Tabla 1: Dilución del anticuerpo primario y condiciones de bloqueo utilizadas para el Western blot.

Proteína	Peso Molecular	Fabricante	N° de catálogo	Hospedero	Dilución	Solución de Bloqueo
GluA1	110 kDa	Synaptic Systems	182011	Ratón	1:1000 Fracción total 1:500 Sinaptoneurosomas	BSA 1%-PBS 1X
GluA2	110 kDa	Synaptic Systems	182103	Conejo	1:1000 Fracción total 1:2000 Sinaptoneurosomas	Leche 3%-PBS 1X
NR1	120 kDa	Synaptic Systems	114011	Ratón	1:300 Fracción total 1:500 Sinaptoneurosomas	Leche 3%-PBS 1X
NR2A	170 kDa	Merck Millipore	07-632	Conejo	1:300	BSA 1%-PBS 1X
NR2B	170 kDa	Synaptic Systems	244103	Conejo	1:1000	BSA 1%-PBS 1X
PSD-95	95 kDa	Abcam	ab18258	Conejo	1:500	BSA 1%-PBS 1X
Homer-1	40 kDa	Synaptic Systems	160003	Conejo	1:1000	BSA 1%-PBS 1X
Sinaptofisina	38 kDa	BD Biosciences	611880	Ratón	1:50000	Leche 2%-PBS 1X Tween 0,1%
GFAP	50 kDa	Sigma-Aldrich	G3893	Ratón	1:1000	Leche 1%-PBS 1X Tween 0,1%
Lamin A/C	65 kDa Lamin C 70 kDa Lamin A	Santa Cruz	sc-7292	Ratón	1:2000	BSA 3%-PBS 1X
B-actina	42 kDa	Synaptic Systems	251003	Conejo	1:25000 nitrocelulosa 1:10000 PVDF	Leche 3%-TBS 1X Tween 0,1%

4.5 RT-qPCR

Se purificó el RNA total desde los 300 µl de homogeneizado de hipocampo dorsal y ventral apartados durante el fraccionamiento. La purificación se llevó a cabo mediante el kit *NORGEN Total RNA Purification Kit* (Biotek Corp, Canadá) siguiendo el protocolo del proveedor con algunas modificaciones. Brevemente, los 300 µl de homogeneizado se mezclaron con 900 µl de amortiguador RL. Luego, se removió el DNA genómico centrifugando la columna de remoción a 14000 x g por 1 minuto. El eluido fue mezclado con etanol al 100% (60 µl por cada 100 µl de eluido) y luego fue unido a la columna de purificación centrifugando a 3500 x g por 1 minuto; la columna fue lavada 3 veces con solución de lavado. Finalmente, se eluyó 3 veces con 10 µl de solución de elución centrifugando a 200 x g por 1 minuto y luego a 14000 x g por 1 minuto adicional. La concentración de las muestras fue cuantificada por espectrofotometría (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific).

Se realizó una transcripción inversa con 1000 ng de RNA, 500 ng de partidores oligo dT (Invitrogen, California, EE. UU.) y 0,01 µg de cada nucleótido (Invitrogen, California, EE. UU.). La mezcla fue calentada a 65°C por 5 minutos y luego enfriada rápidamente a 4°C para la impedir renaturación del RNA. Se agregó amortiguador *5X First Strand Buffer* (Invitrogen, California, EE. UU.), DTT 0,2 µmol y e inhibidor de ribonucleasa 40 U (*RNasin* Promega, Wisconsin, EE. UU.), se homogenizó y se calentó a 42°C por 5 minutos para el apareamiento de los partidores con el transcrito. Finalmente, se agregaron 200 U de transcriptasa inversa *Superscript II* (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen final de 20 µl. Se incubó a 42°C por 50 minutos para la restrotranscripción y luego a 70°C por 15 minutos para inactivar la enzima.

El qPCR se realizó con 10 ng de cDNA molde. Se agregó el par de partidores en una concentración final de 0,12 µM y *Brilliant II Ultra-fast SYBR Green QPCR Máster Mix* (Agilent Technologies) en un volumen final de 20 µl. Se utilizó una rampa térmica estándar para todos los genes evaluados: La primera fase de denaturación se realizó a 95°C por 10 minutos. Luego se sometió a 40 ciclos de denaturación a 95°C por 15 segundos. La fase de alineamiento se llevó a cabo a 60°C por 15 segundos. Por último, la extensión se realizó a 72°C por 20 segundos. Cada amplificación con su respectivo blanco se realizó en duplicado, y se complementó con su curva de fusión para confirmar la presencia de un amplicón único. La cuantificación se realizó de forma relativa al control de cada camada, utilizando el método del $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ corregido por las eficiencias de cada partidior (Schmittgen y Livak, 2008). La lista y características de los partidores se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencia de los partidores utilizados para el PCR cuantitativo.

Transcrito	Número de acceso	Partidor sentido (5'→3')	Partidor anti sentido (5'→3')	Tamaño amplicón (pb)	Eficiencia (%)
C-fos	NM_022197.2	TGACCGGCTCCAAGGATGGCT	TGACCGGCTCCAAGGATGGCT	321	130,4
Arc	XM_006241734.1	GCATCTGTTGACCGAAGTGTCC	GCACCCAAGACTGGTATTGCTG	455	138
NR1	NM_001270610.1	GATGTCTTCTAAGTATGCGGACGG	TCACTCATTGTGGGCTTGACG	276	77,5
NR2A	NM_012573.3	CCCTGCACCAATTCATGGTC	AGGTGGTTGTCATCTGGCTC	220	89,7
NR2B	NM_012574.1	AACAGGTGCCTAGCCGATG	CAAAGAAGGCCCACTGAC	160	76,8
GluA1	NM_031608.1	GGAAGGAAGGGAGGAAGGAAAG	GGAGAACTGGGAACAGAAACGG	383	81
GluA2	NM_017261.2	CTACCGCAGAAGGAGTAGCC	TTACTTCCCGAGTCCTTGGC	289	94,7
B-actina	NM_031144.3	TTGTCCCTGTATGCCTCTGGTC	ACCGCTCATTGCCGATAGTG	346	94,7

4.6 Análisis estadístico

Los análisis se realizaron con el programa estadístico *GraphPad Prism* en su versión 6 (GraphPad Software Incorporated). Los datos fueron evaluados por los análisis de *D'Agostino-Pearson* y *Shapiro-Wilk* para determinar si seguían o no una distribución normal. Para las cuantificaciones de pesos y heces se realizaron análisis paramétricos *t-test* no pareados. Para las demás determinaciones de datos no paramétricos se utilizaron los análisis *Mann Whitney* no pareado y *Kruskal-Wallis* con comparación múltiple a través del post test de *Dunn*, con un intervalo de confianza del 95%.

5. RESULTADOS

5.1 Efectos del estrés crónico en la ganancia de peso corporal, evacuación fecal durante el procedimiento y peso de las glándulas adrenales.

La ganancia de peso de las ratas al punto final de los procedimientos se muestra en la figura 5A. El análisis revela que el grupo control presenta en promedio un aumento del 7,7% del peso inicial; en contraste, los animales estresados exhiben una disminución del 2,5% en el peso ($P= 0,0007$). Además, se evaluó la evacuación fecal cada día durante el procedimiento estresor con el fin de evaluar la efectividad de la restricción. Hay evidencias que respaldan que el aumento en los niveles de CRH durante la restricción de movimiento produce una estimulación en la motilidad del colon, induciendo la evacuación fecal (Nakade y cols, 2007). En la figura 5B se puede observar que las ratas estresadas presentan un aumento significativo de aproximadamente el 50% en la evacuación fecal con respecto al grupo control ($P < 0,0001$). Adicionalmente, se determinó si la restricción induce variaciones en el peso de las glándulas adrenales, sin embargo, como se puede apreciar en la figura 5C, no se observan diferencias significativas con respecto al grupo control.

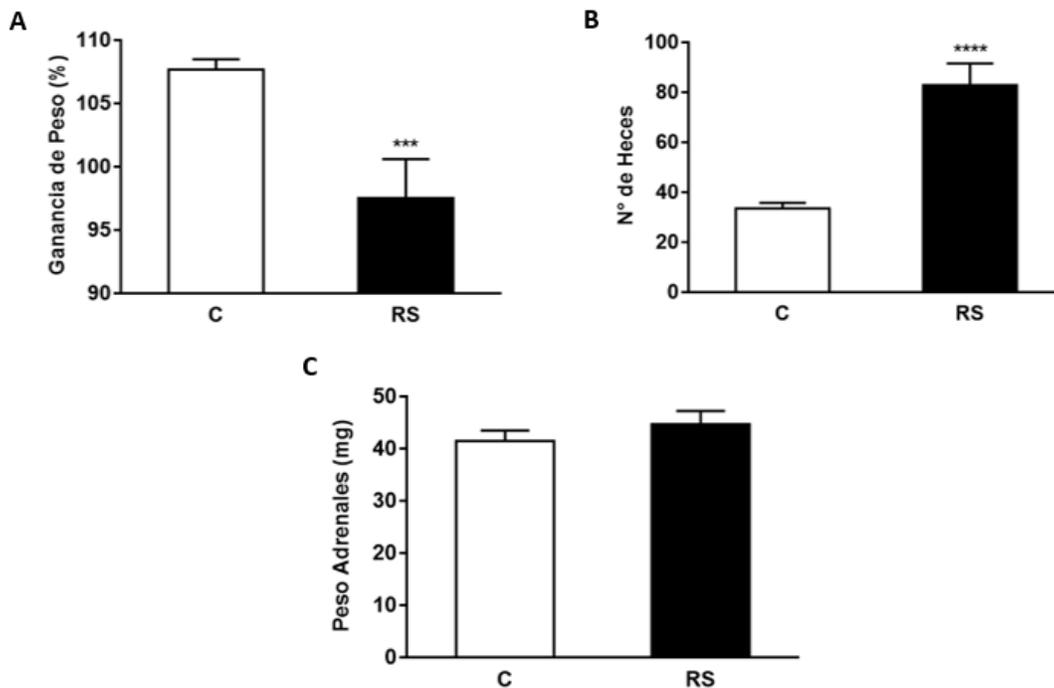


Figura 5| El CRS modifica los parámetros fisiológicos. Todos los gráficos representan el promedio \pm SEM de cada grupo experimental. **(A)** Se evaluó la variación del peso corporal al punto final del procedimiento. Las ratas fueron pesadas diariamente y un grupo fue estresado por 14 días consecutivos. **(B)** Se evaluó diariamente la evacuación fecal en el grupo control (C) (por 2,5 horas) y en el grupo estresado (RS) durante cada sesión de restricción. Los datos representan la suma del total de las heces cuantificadas diariamente. **(C)** Se determinó el peso de las glándulas adrenales en el punto final de los procedimientos en el grupo control y en los animales estresados. Control (n = 20) Estrés (n = 13). Los datos presentan una distribución normal y fueron analizados por t-test no pareado de dos colas, *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$.

5.2 El estrés crónico afecta el consumo de alimento

Se calculó indirectamente el consumo de alimento diario mediante el pesaje del alimento sobrante cada día. Como se puede apreciar en la figura 6A, el porcentaje de consumo de alimento en el grupo estrés fue aproximadamente un 10% menor que el del grupo control durante casi todos los días de procedimientos. El porcentaje de alimento consumido durante todo el proceso también evidencia un 10% menos de consumo en el grupo estrés con respecto al grupo control (figura 6B).

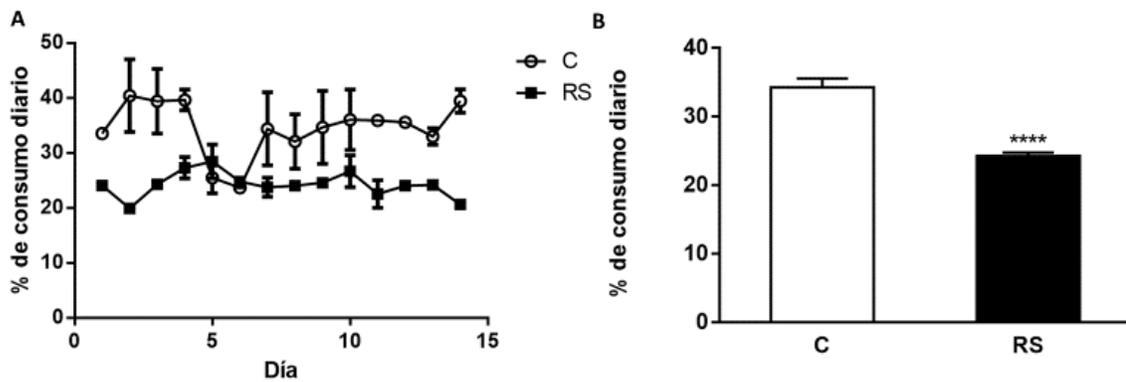


Figura 6 | Consumo diario de alimento. Los resultados representan el promedio \pm SEM (A) Se determinó el porcentaje de consumo de alimento diario durante los 14 días de procedimientos. Los círculos blancos indican el porcentaje de consumo del grupo control, los cuadrados negros indican el porcentaje de consumo del grupo estrés. (B) Porcentaje de consumo total en los 14 días, analizado por *t-test* no pareado de dos colas. Control (n=6); Estrés (n=6). *****P*<0,0001.

5.3 Determinación de los transcritos *C-fos* y *Arc* como marcadores de actividad sináptica en el hipocampo dorsal y ventral.

Se determinaron los niveles de transcrito de los genes de respuesta temprana *C-fos* y *Arc*, estos transcritos son marcadores de actividad sináptica. Como se puede observar en la figura 7, los niveles del transcrito de *Arc* en el hipocampo dorsal aumentan significativamente casi al triple en el grupo estrés con respecto al control (*P*= 0,0179; figura 7A). No se evidencian diferencias significativas en los niveles de transcrito de *C-fos*. En el hipocampo ventral, los niveles de transcrito de *Arc* disminuyen de forma significativa un 37% en el grupo estresado con respecto al grupo control (*P*= 0,0357; figura 7B). En el caso de *C-fos*, se observa una disminución significativa del 70% en los animales estresados con respecto al grupo control (*P*= 0,0357; figura 7B).

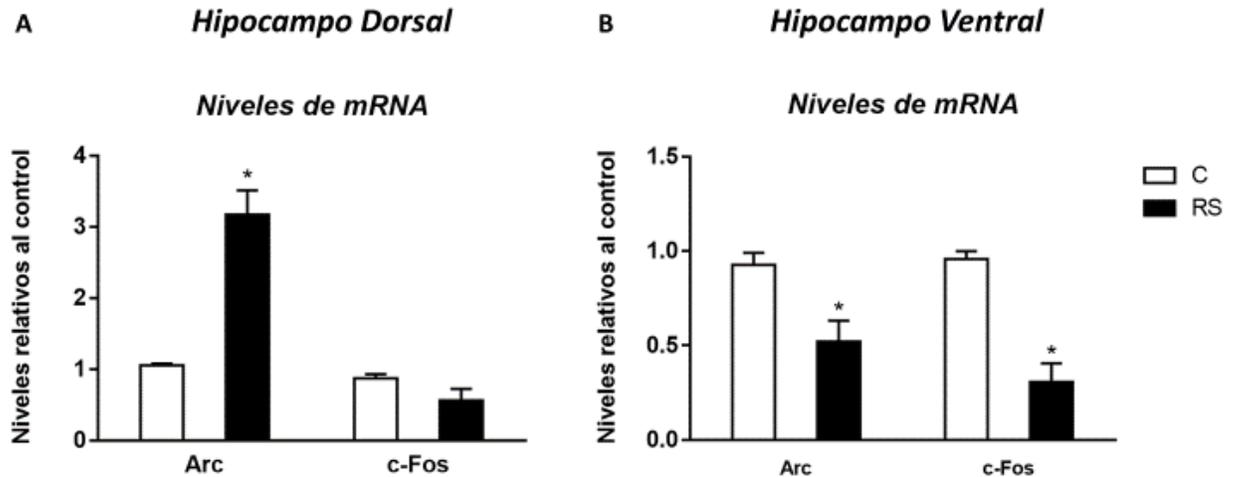


Figura 7 | Niveles de mRNA de los genes de expresión temprana *Arc* y *c-Fos*. Los resultados representan el promedio \pm SEM. **(A)** Niveles de transcrito en el hipocampo dorsal. **(B)** Niveles de transcrito en el hipocampo ventral. Control (n=5); Estrés (n=4). Los datos fueron analizados por $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ usando β -actina como normalizador y luego por el test de *Mann-Whitney*. * $P < 0,05$.

5.4 El estrés crónico afecta diferencialmente los niveles de mRNA de las subunidades del receptor AMPA y NMDA en los polos hipocampales.

Para determinar los efectos del estrés crónico en la transmisión glutamatérgica, se examinaron los niveles de mRNA de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA. Como se exhibe en la figura 8, en el hipocampo dorsal el estrés crónico induce una disminución significativa del 34% en los niveles de transcrito de la subunidad GluA1 con respecto al grupo control ($P = 0,0317$; figura 8A). Los niveles de mRNA de la subunidad GluA2 no se ven afectados por el estrés en el hipocampo dorsal. En el hipocampo ventral no se encontraron diferencias significativas en los niveles de mRNA de GluA1 ni GluA2 con respecto al grupo control (figura 8B). Además, se determinaron los niveles de transcrito de las subunidades del receptor NMDA. No se evidencian diferencias significativas en NR1, NR2A ni NR2B en ningún polo del hipocampo producto del estrés (figuras 8C y 8D).

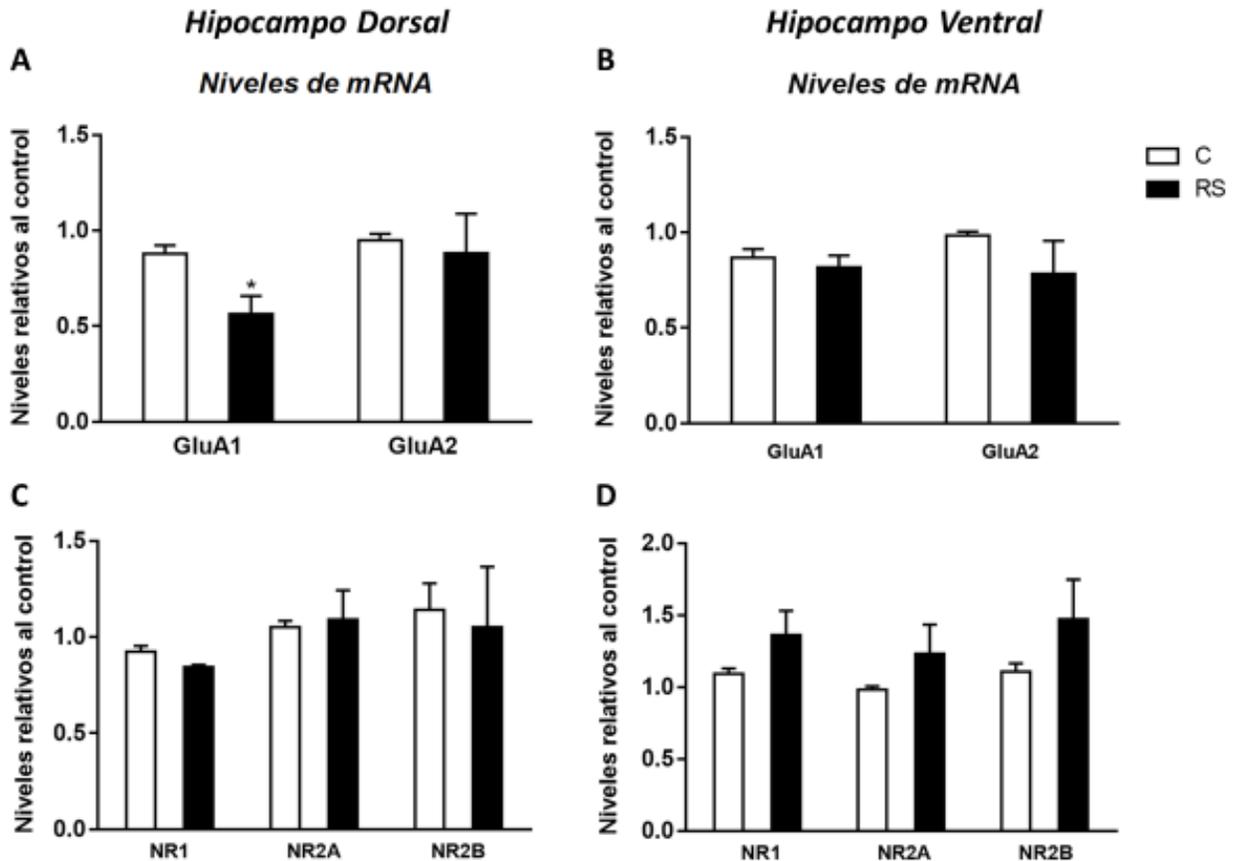


Figura 8| Los niveles de transcrito de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA están diferencialmente alterados en el hipocampo dorsal y ventral de ratas hembras crónicamente estresadas. Evaluación de los niveles de mRNA de GluA1 y GluA2 en hipocampo dorsal (A) y ventral (B). Evaluación de los niveles de mRNA de NR1, NR2A y NR2B en hipocampo dorsal (C) y ventral (D). Los datos fueron analizados por $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ usando β -actina como normalizador. Los gráficos representan el promedio \pm SEM para cada grupo experimental. Los datos fueron analizados por test de *Mann-Whitney* de dos colas. Control (n=5); Estrés (n=4). * $P < 0,05$.

5.5 El CRS produce alteraciones diferenciales en los niveles de las subunidades del receptor AMPA en hipocampo dorsal y ventral.

Se evaluaron los niveles de proteína de GluA1 y GluA2 en extracto total de hipocampo dorsal y estos no se ven alterados por el estrés crónico en comparación al grupo control (figura 9A). Por otro lado, en extracto total de hipocampo ventral se observa un aumento significativo del 30% en los niveles de GluA1 ($P = 0,0023$; figura 9B) en los animales estresados con respecto al grupo control. No se observan diferencias significativas en los niveles de GluA2 con respecto al grupo control (figura 9B).

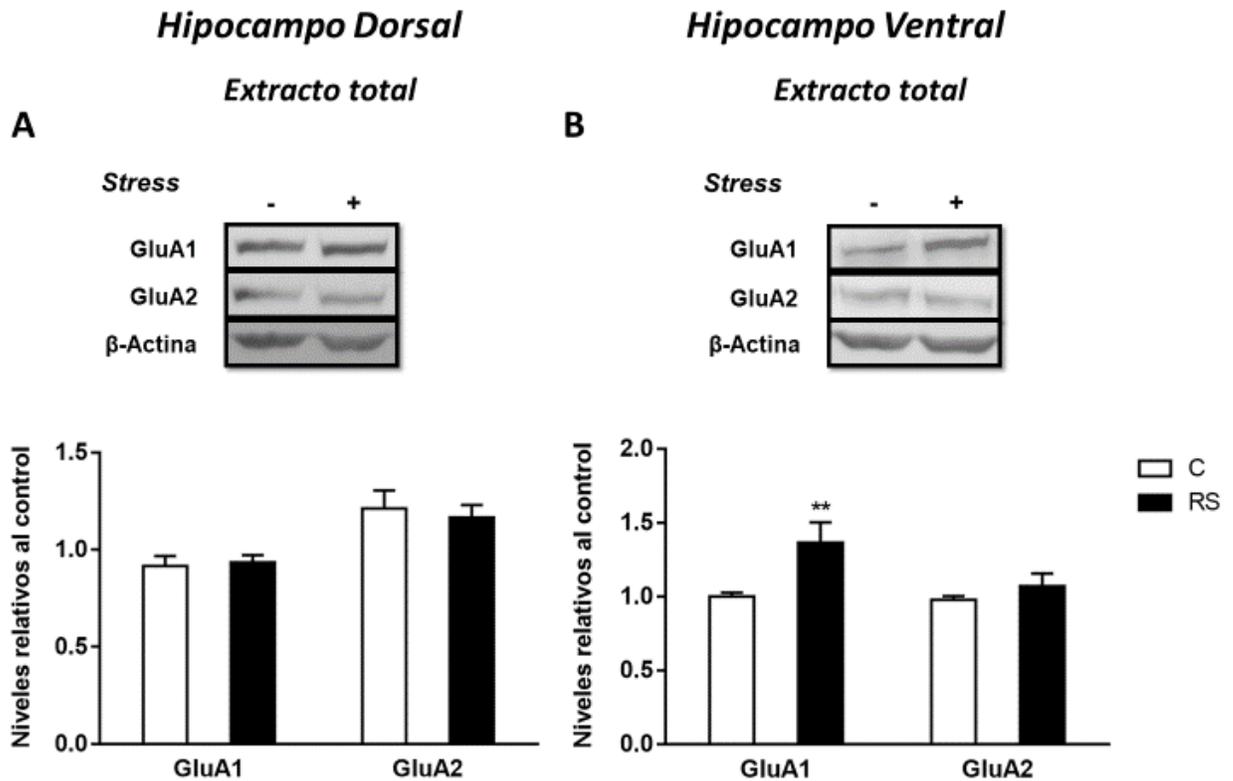


Figura 9 | Efecto del estrés crónico en los niveles de las subunidades del receptor AMPA en extracto total de hipocampo dorsal y ventral de ratas hembras. (A) Niveles de GluA1 y GluA2 en extracto total de hipocampo dorsal. **(B)** Niveles de GluA1 y GluA2 en extracto total de hipocampo ventral. El panel superior exhibe una imagen representativa del análisis por western blot. Los gráficos representan el promedio \pm SEM para cada grupo experimental. Los datos fueron analizados por el test *Mann-Whitney* de dos colas. Control (n=7); Estrés (n=7). ** $P < 0,01$.

Para determinar si el estrés crónico produce alteraciones en la distribución de las subunidades del receptor a nivel sináptico, se preparó una fracción sinaptoneurosomal de hipocampo dorsal y ventral, que corresponde a un extracto enriquecido en conexiones sinápticas. Por análisis de western blot se determinó que la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador de filamentos intermedios de células gliales, no se encuentra enriquecida en esta fracción (S). Además, la proteína Lamin A, un marcador nuclear no se encuentra en las fracciones de homogenizado total (H) y sinaptoneurosomal, encontrándose en la fracción nuclear (N). Adicionalmente, GR se encuentra enriquecido en la fracción total y sinaptoneurosomal. Mas aún, la fracción

sinaptoneurosomal presenta un enriquecimiento en marcadores sinápticos, como sinaptofisina (Syn), Homer-1, PSD-95 y GluA2 (figura 10A).

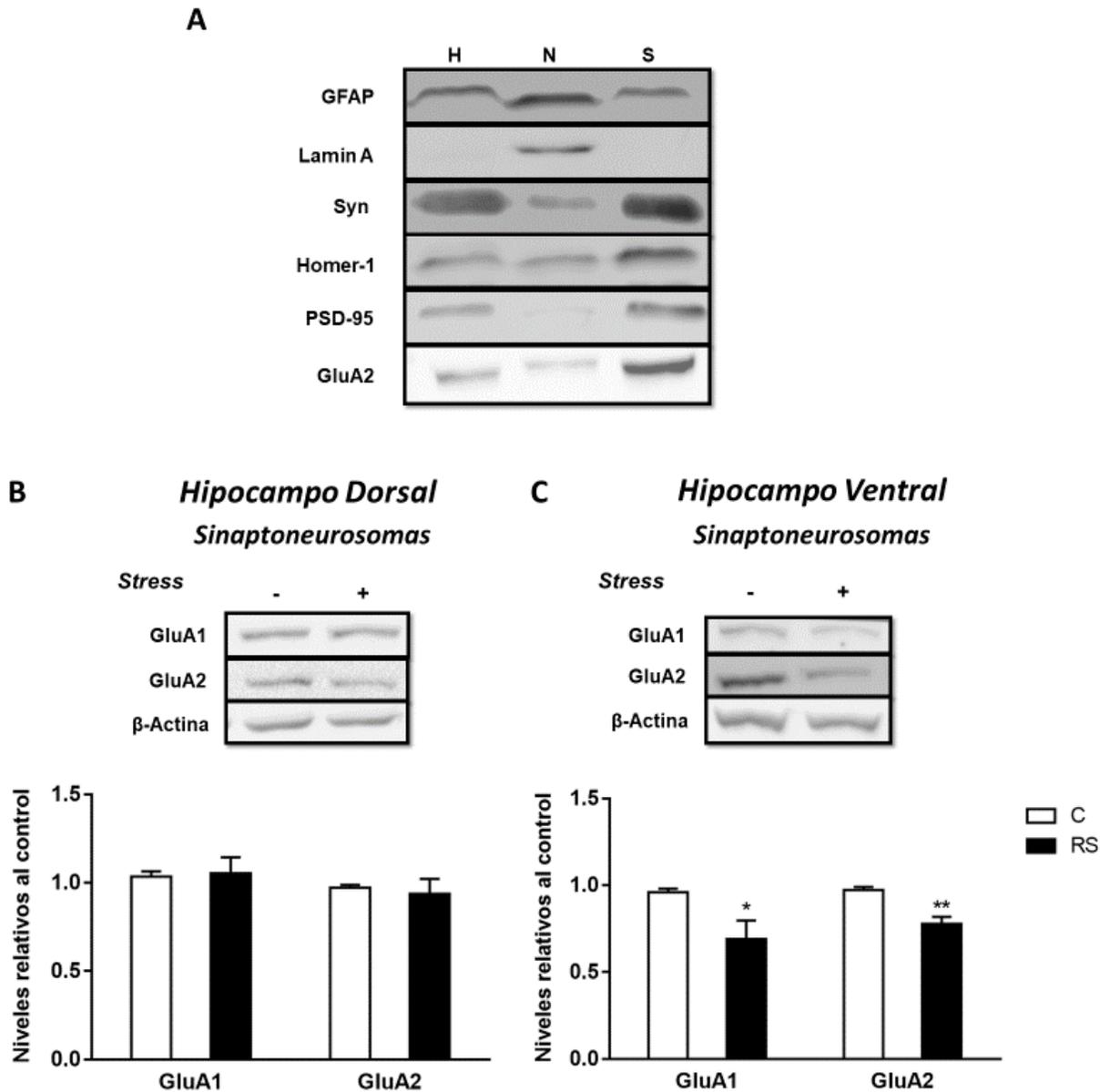


Figura 10| El CRS afecta diferencialmente los niveles de las subunidades del receptor AMPA en fracción sinaptoneurosomal de hipocampo dorsal y ventral de ratas hembras. (A) Caracterización bioquímica del fraccionamiento para la obtención de sinaptoneurosomas. H representa el homogenizado hipocampal total, N representa la fracción nuclear y S representa la fracción sinaptoneurosomal. Se evaluaron los niveles de proteína de las subunidades GluA1 y GluA2 en fracciones sinaptoneurosomales de hipocampo dorsal **(B)** y ventral **(C)**, el panel superior exhibe una imagen representativa del análisis por western blot. Los gráficos representan el promedio \pm SEM para cada grupo experimental. Los datos fueron analizados por el test *Mann-Whitney* de dos colas. Control (n=7); Estrés (n=7). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$.

En la fracción sinaptoneurosomal dorsal, se observa que los niveles de GluA1 y GluA2 no son alterados por el estrés crónico (figura 10B). En contraste, en sinaptoneurosomas de hipocampo ventral, se presenta una disminución significativa del 35% en GluA1 ($P=0,0408$; figura 10C) y del 24% en GluA2 ($P=0,0051$; figura 10C).

5.6 El estrés modifica diferencialmente los niveles de las subunidades del receptor NMDA en hipocampo dorsal y ventral.

Se evaluaron los niveles de proteína de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en los animales estresados con respecto al control. En extracto total de hipocampo dorsal se observa un aumento del 18% en los niveles de NR1 ($P=0,0291$; figura 11A), en contraste a una disminución del 23% en los niveles de NR2A ($P=0,0012$; figura 11A); no observándose una diferencia significativa en los niveles de NR2B. En el hipocampo ventral no se observan diferencias significativas en los niveles de estas subunidades (figura 11B).

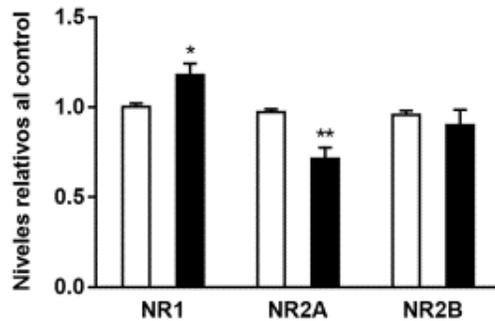
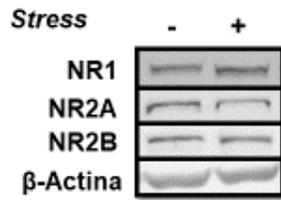
Se evaluaron cambios en la distribución de las subunidades determinando los niveles de proteína en fracciones sinaptoneurosomales. En el hipocampo dorsal no se observan cambios en los niveles sinápticos de NR1, NR2A ni NR2B en los animales estresados con respecto al control (figura 11C). Interesantemente, en el hipocampo ventral se evidencia una disminución significativa del 48% en los niveles de NR2A sináptico en las ratas estresadas con respecto al grupo control ($P=0,0012$; figura 11D). Los niveles sinápticos de NR1 y NR2B no se ven alterados por el estrés crónico (figura 11D).

Adicionalmente, se determinó si existen diferencias en la razón NR2A/NR2B en extracto total de hipocampo dorsal y ventral en los animales estresados con respecto al grupo control. En hipocampo dorsal se evidencia una disminución del 19% en la razón NR2A/NR2B producto del estrés crónico ($P=0,042$; figura 12A). En extracto total de hipocampo ventral no se observan diferencias significativas en la razón NR2A/NR2A como consecuencia del estrés (figura 12B). Además, se evaluaron los niveles de PSD-95, un marcador de conectividad y efectividad sináptica. No se evidencian diferencias significativas con respecto al control en extracto total de hipocampo dorsal y ventral (figuras 12C y 12D).

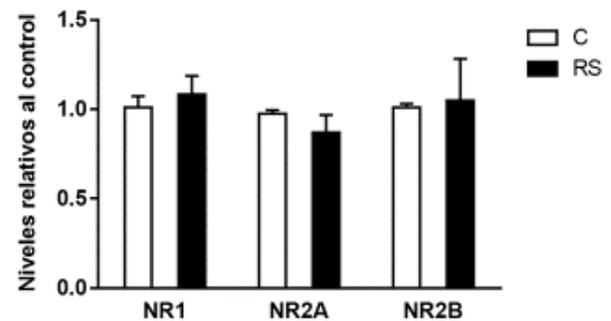
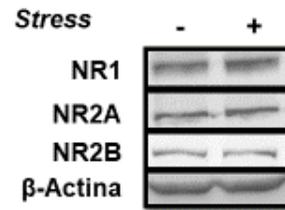
Hipocampo Dorsal

Hipocampo Ventral

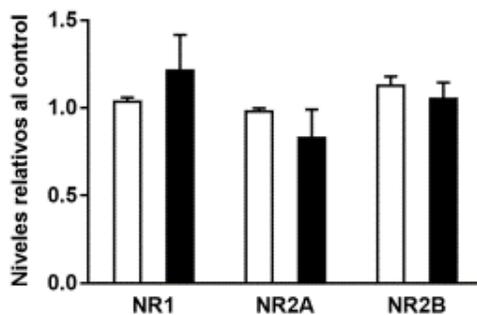
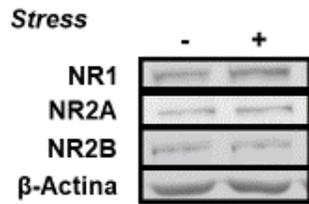
A Extracto total



B Extracto total



C Sinaptoneurosomas



D Sinaptoneurosomas

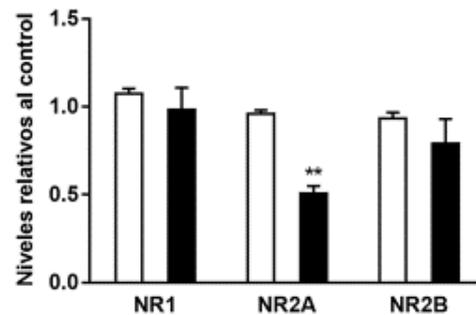
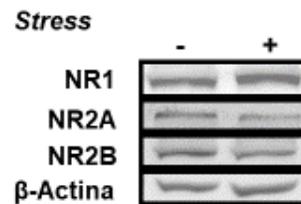


Figura 11 | Efecto diferencial del CRS en los niveles de las subunidades del receptor NMDA en hipocampo dorsal y ventral de ratas hembras. (A) Niveles de NR1, NR2A y NR2B en extracto total de hipocampo dorsal. **(B)** Niveles de NR1, NR2A y NR2B en extracto total de hipocampo ventral. **(C)** Niveles de NR1, NR2A y NR2B en sinaptoneurosomas de hipocampo dorsal. **(D)** Niveles de NR1, NR2A y NR2B en sinaptoneurosomas de hipocampo ventral. El panel superior exhibe una imagen representativa del análisis por western blot. Los gráficos representan el promedio \pm SEM para cada grupo experimental. Los datos fueron analizados por el test *Mann-Whitney* de dos colas. Control (n=7); Estrés (n=7). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$.

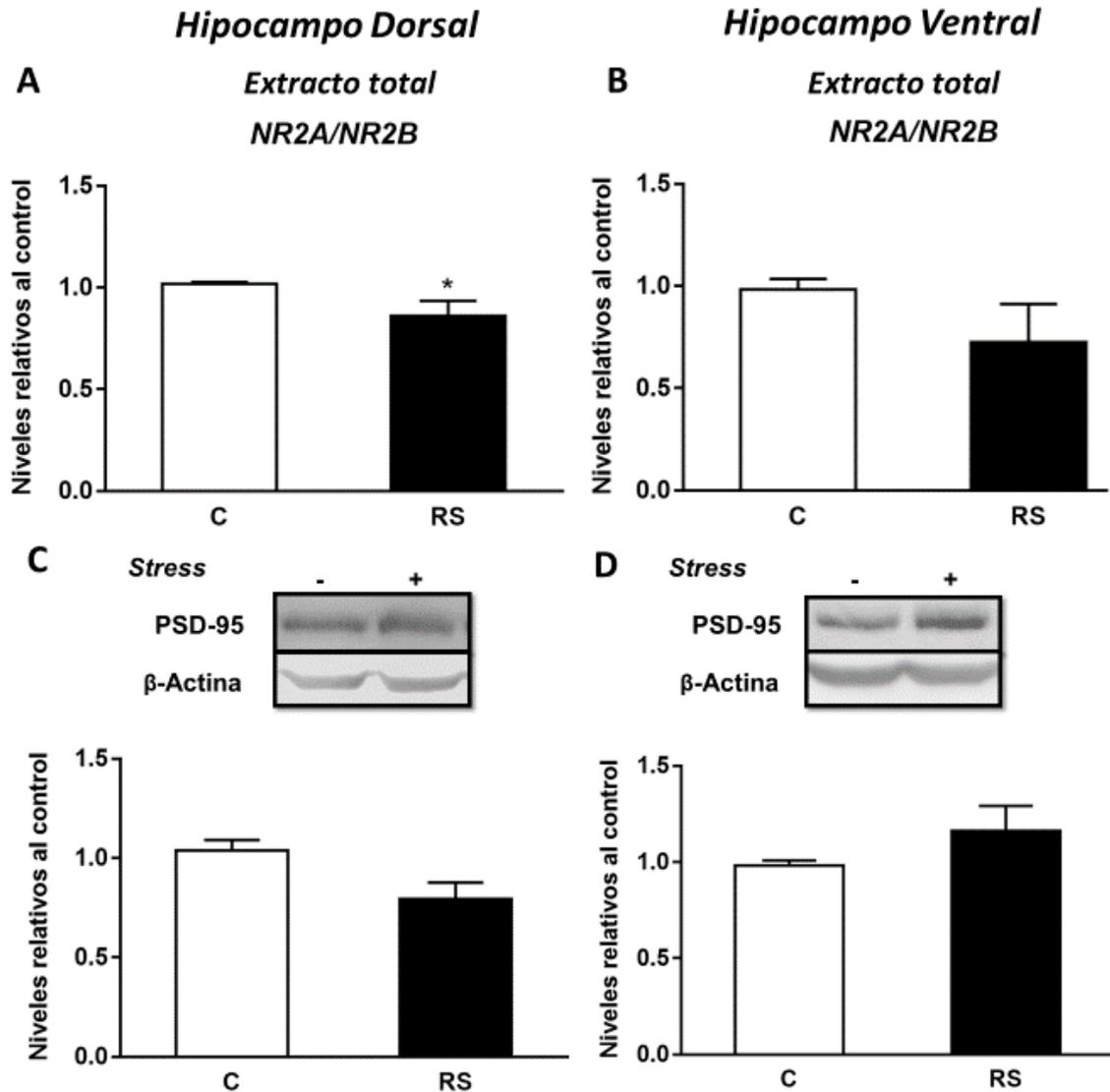


Figura 12 | El estrés crónico disminuye la razón NR2A/NR2B sin alterar los niveles de PSD-95 en extracto total de hipocampo dorsal. Evaluación de la razón proteica de NR2A/NR2B en hipocampo dorsal (A) y ventral (B). Niveles del indicador PSD-95 en extracto total de hipocampo dorsal (C) y ventral (D). Los gráficos representan el promedio \pm SEM para cada grupo experimental. Los datos fueron analizados por test de *Mann-Whitney* de dos colas. Control (n=7); Estrés (n=7). * $P < 0,05$.

Finalmente, se evaluó la razón sináptica NR2A/NR2B en ambos polos del hipocampo de los animales estresados con respecto al grupo control; en el hipocampo dorsal no se observan diferencias significativas producto del estrés (figura 13A). Interesantemente, en sinaptoneurosomas de hipocampo ventral existe una disminución del 38% ($P =$

0,0297; figura 13B). Los niveles sinápticos de PSD-95 no se ven alterados por el estrés en el hipocampo dorsal (figura 13C). En cambio, en sinaptoneurosomas de hipocampo ventral de ratas estresadas se evidencia una disminución del 26% en los niveles sinápticos de PSD-95 con respecto al grupo control ($P=0,0408$; figura 13D).

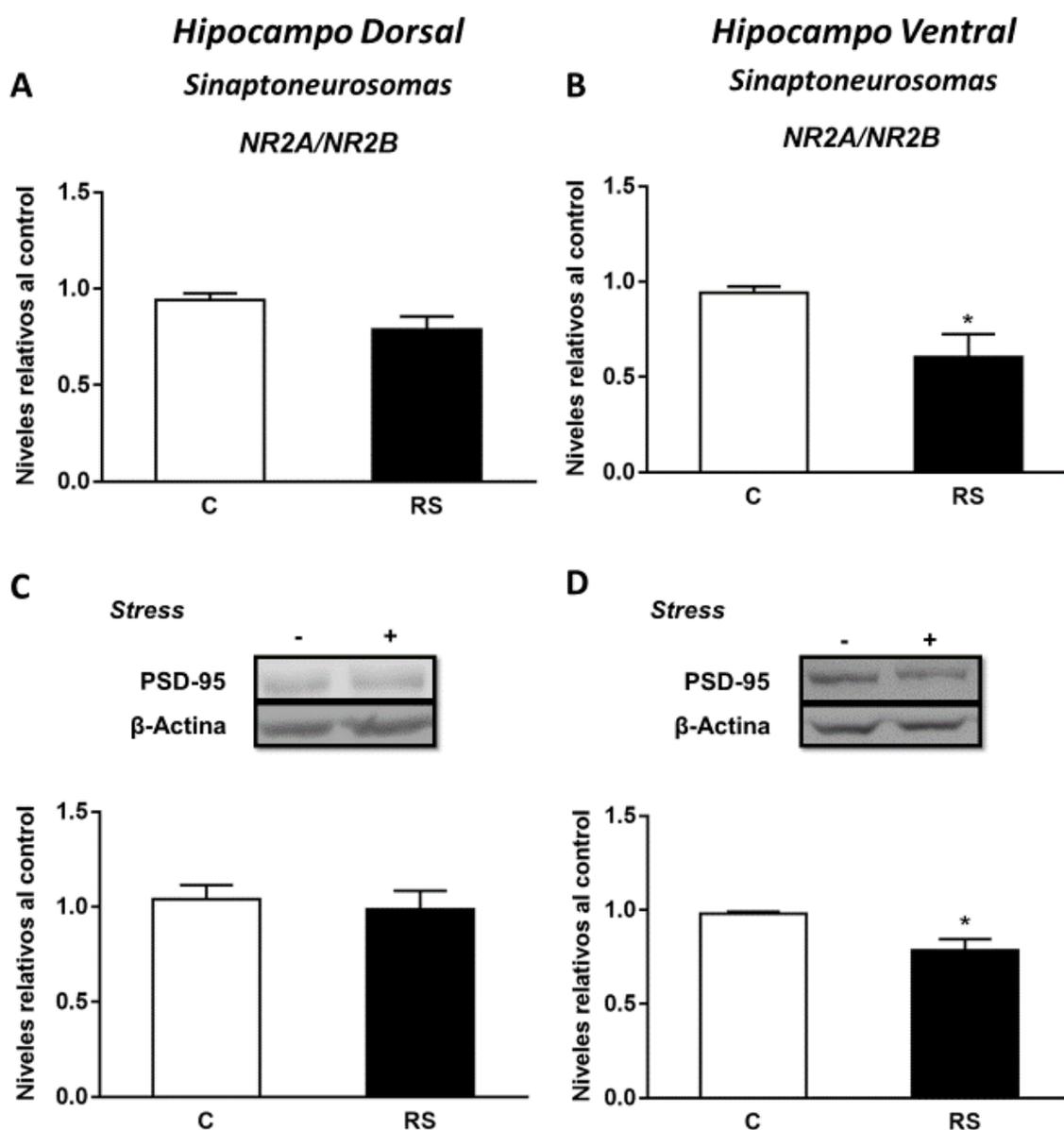


Figura 13| Efecto del estrés crónico en la razón NR2A/NR2B y en los niveles de PSD-95 en sinaptoneurosomas de hipocampo dorsal y ventral. Evaluación de la razón proteica de los niveles sinápticos de NR2A/NR2B en hipocampo dorsal (**A**) y ventral (**B**). Niveles sinápticos del indicador PSD-95 en hipocampo dorsal (**C**) y ventral (**D**). Los gráficos representan el promedio \pm SEM para cada grupo experimental. Los datos fueron analizados por test de *Mann-Whitney* de dos colas. Control (n=7); Estrés (n=7). * $P<0,05$.

En la tabla 3 se presenta un cuadro resumen de los resultados del objetivo 1, es decir, los efectos del estrés crónico en los niveles proteicos de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA y de los indicadores sinápticos. En resumen, en el hipocampo dorsal solo se observan efectos a nivel de extracto total, específicamente, se evidencia un aumento en NR1 y una disminución en NR2A, además de una disminución del cociente NR2A/NR2B. Por otro lado, en el hipocampo ventral se observan más alteraciones a nivel sináptico, específicamente, se evidencia un aumento en los niveles de GluA1 en extracto total, pero a nivel sináptico se observa una disminución en los niveles de dicha subunidad. Además, a nivel sináptico se observa una disminución en los niveles de GluA2. En el caso del receptor NMDA, se observa una disminución en los niveles de NR2A, lo que se refleja en una disminución en NR2A/NR2B, acompañado de una disminución en los niveles del indicador sináptico PSD-95.

Tabla 3 | Resumen de resultados del objetivo específico 1.

Proteína	Homogeneizado Dorsal	Sinaptoneurosomas Dorsal	Homogeneizado Ventral	Sinaptoneurosomas Ventral
GluA1	ns	ns	↑	↓
GluA2	ns	ns	ns	↓
NR1	↑	ns	ns	ns
NR2A	↓	ns	ns	↓
NR2B	ns	ns	ns	ns
NR2A/NR2B	↓	ns	ns	↓
PSD-95	ns	ns	ns	↓

5.7 Los efectos del estrés crónico en los niveles de las subunidades de AMPA no son emulados por CORT.

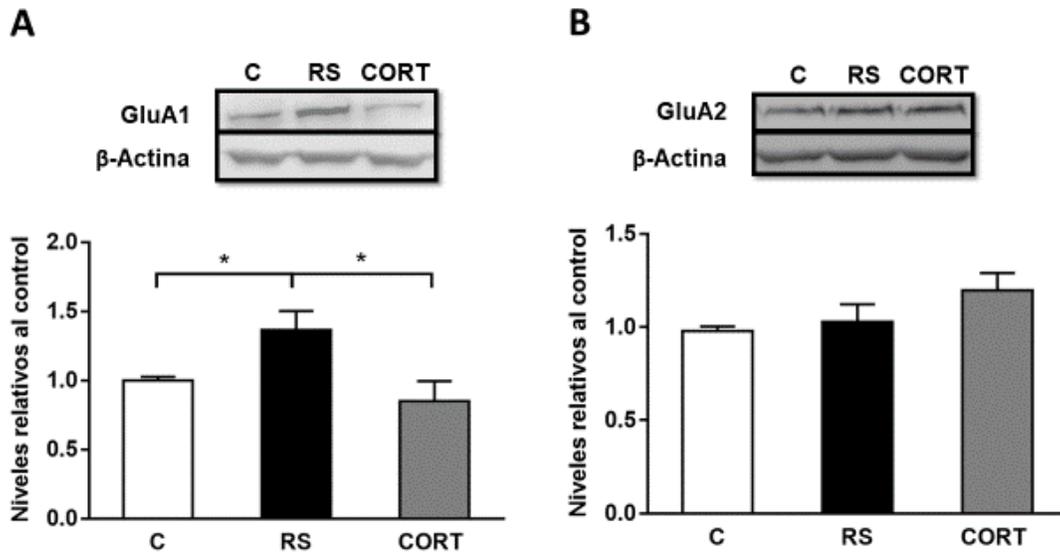
El segundo objetivo de esta memoria fué determinar si los cambios observados anteriormente son mediados por CORT. Para abordar este objetivo se agregó un grupo experimental al que se le administró CORT de forma crónica.

En el caso del receptor AMPA el estrés induce alteraciones solo en el hipocampo ventral. En primer lugar, se observa una disminución en los niveles de GluA1 en extracto total de hipocampo ventral (figura 9B y tabla 3). Como se puede observar en la figura 14A, este efecto no es emulado por CORT (las medianas varían significativamente; $P= 0,0039$), se vuelve a evidenciar el aumento significativo en GluA1 producto del estrés con respecto al grupo control ($P= 0,0498$; figura 14A). El grupo CORT no muestra niveles de GluA1 significativamente diferentes del grupo control, pero sí una disminución significativa con respecto al grupo estresado ($P= 0,0193$; figura 14A). En el caso de GluA2, ni el estrés ni la administración de CORT producen cambios significativos, las medianas no varían significativamente (figura 14B).

En sinaptoneurosomas de hipocampo ventral se evidenció una disminución en GluA1 producto del estrés con respecto al grupo control (figura 10C y tabla 3). Sin embargo, al agregar el grupo CORT, el análisis de *Kruskal-Wallis* determina que las medianas no son significativamente diferentes (figura 14C). Además, se observó que el estrés induce una disminución en los niveles de GluA2 en sinaptoneurosomas de hipocampo ventral (figura 10C y tabla 3). Sin embargo, tal como con GluA1, al agregar el grupo CORT, el análisis de *Kruskal-Wallis* determina que las medianas no varían significativamente, aunque el valor P de esta determinación es de $0,0505$ (figura 14D).

Hipocampo Ventral

Extracto total



Sinaptoneurosomas

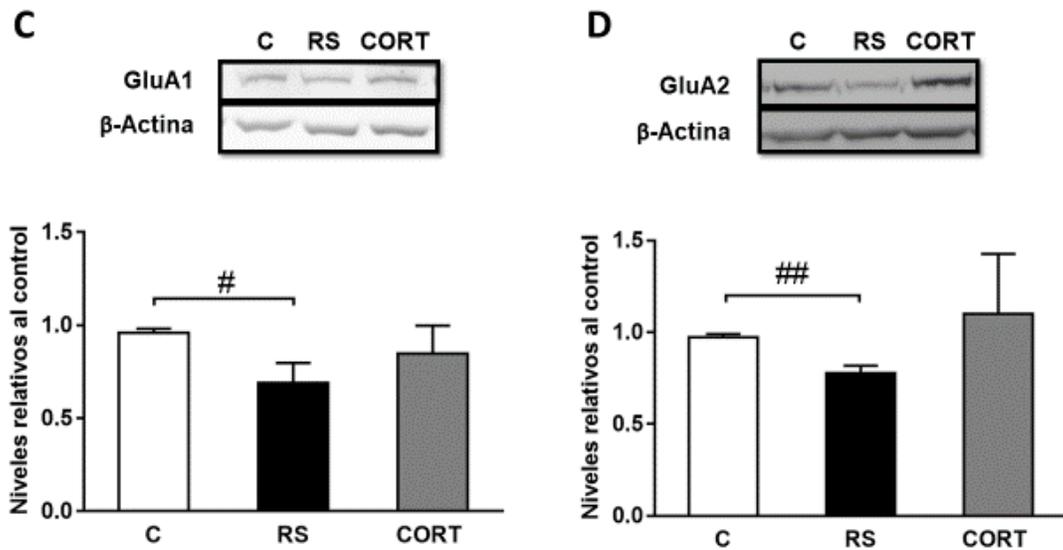


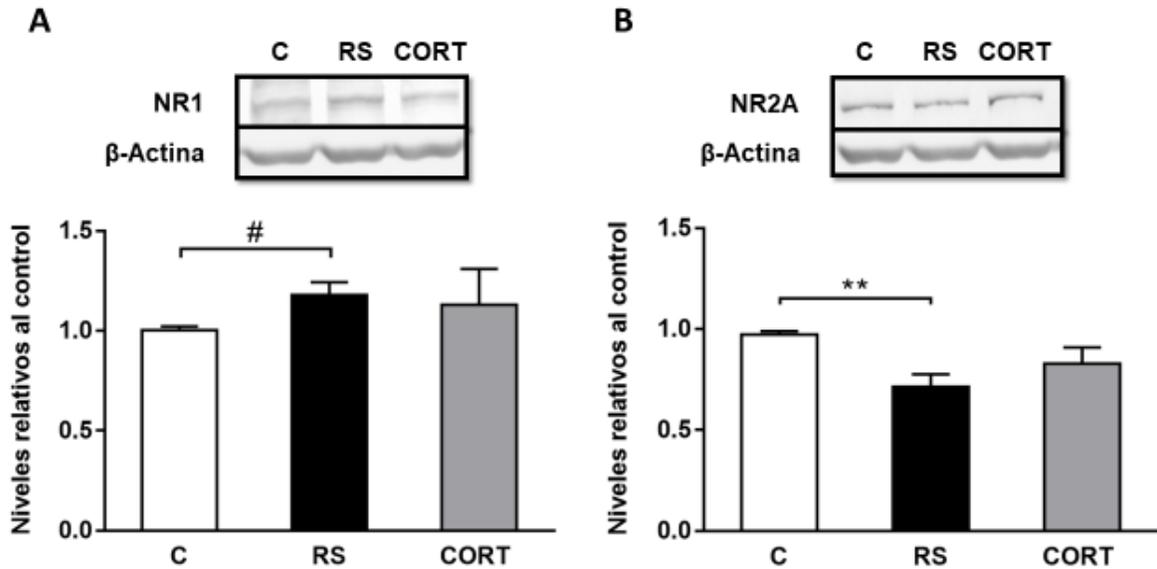
Figura 14 | Los efectos del estrés en GluA1 y GluA2 no son emulados por CORT. Niveles de GluA1 (A) y GluA2 (B) en extracto total de hipocampo ventral. Niveles de GluA1 (C) y GluA2 (D) en sinaptoneurosomas de hipocampo ventral. Los gráficos representan el promedio \pm SEM. El panel superior presenta una imagen representativa del análisis por western blot. Los datos fueron analizados por *Kruskal-Wallis* con post-test de *Dunn*. Control (n=7); Estrés (n=7); CORT (n=4). * $P < 0,05$. # ($P < 0,05$) y ## ($P < 0,01$) representan los resultados obtenidos al comparar el grupo control con el grupo estrés por el test de *Mann-Whitney*.

5.8 Parte de los efectos del estrés crónico en los niveles de las subunidades de NMDA son emulados por la administración de CORT.

En el caso del receptor NMDA el estrés induce alteraciones solo en extracto total de hipocampo dorsal y en sinaptoneurosomas de hipocampo ventral.

En primer lugar, el estrés produce un aumento en los niveles de la subunidad constitutiva NR1 en extracto total de hipocampo dorsal, además de una disminución en los niveles de NR2A (figura 11A y tabla 3). En el caso de NR1, al agregar el grupo CORT el análisis por *Kruskal-Wallis* determina que las medianas no varían significativamente debido a la variación de dicho grupo experimental ($P= 0,0804$; figura 15A). Sin embargo, el nivel promedio de NR1 en el grupo CORT es similar a los niveles del grupo estresado (figura 15A). En el caso de NR2A, al agregar el grupo CORT, el análisis por *Kruskal-Wallis* determina que las medianas son significativamente diferentes ($P= 0,0045$; figura 15B). El post-test de *Dunn* vuelve a evidenciar la disminución en los niveles de NR2A en extracto total de hipocampo dorsal de animales estresados con respecto al grupo control ($P= 0,0086$; figura 15B). Sin embargo, los niveles de NR2A en el grupo CORT no son significativamente diferentes del grupo control ni del grupo estresado (figura 15B). En sinaptoneurosomas de hipocampo ventral se observó una disminución en los niveles de NR2A, junto con una disminución en los niveles del indicador sináptico PSD-95 producto del estrés. En el caso de NR2A, al agregar el grupo CORT el análisis por *Kruskal-Wallis* determina que las medianas varían significativamente ($P < 0,0001$). El post-test de *Dunn* reafirma la disminución en los niveles de NR2A en el grupo estresado con respecto al grupo control ($P= 0,0016$; figura 15C). Sin embargo, por medio de este test no se evidencian diferencias significativas del grupo CORT con respecto a los otros grupos experimentales. Al analizar mediante el test de *Mann-Whitney*, se evidencia que el grupo CORT presenta una disminución significativa en los niveles de NR2A con respecto al grupo control en sinaptoneurosomas de hipocampo ventral ($P= 0,0091$; figura 15C). En el caso de PSD-95, el análisis por *Kruskal-Wallis* indica que las medianas no varían significativamente. Sin embargo, el promedio de los niveles de PSD-95 en el grupo CORT se asemeja a los niveles del grupo estresado (figura 15D).

Hipocampo Dorsal
Extracto total



Hipocampo Ventral
Sinaptoneurosomas

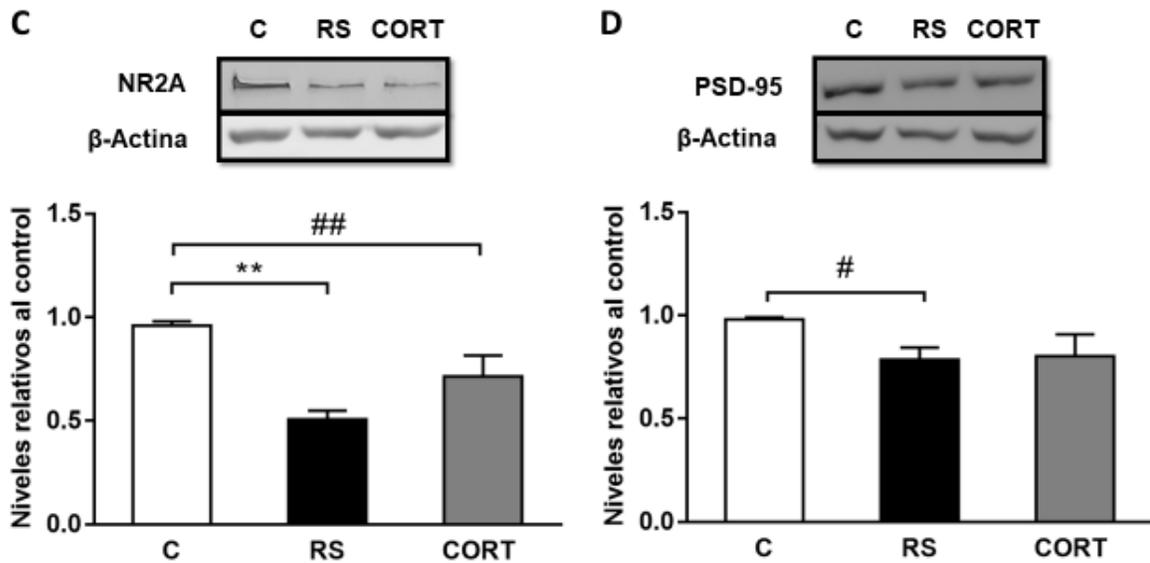


Figura 15| La administración de CORT emula parte de los efectos del estrés en las subunidades de NMDA. Niveles de NR1 (**A**) y NR2A (**B**) en extracto total de hipocampo dorsal. Niveles de NR2A (**C**) y PSD-95 (**D**) en sinaptoneurosomas de hipocampo ventral. Los gráficos representan el promedio \pm SEM. El panel superior presenta una imagen representativa del análisis por western blot. Los datos fueron analizados por *Kruskal-Wallis* con post-test de *Dunn*. Control (n=7); Estrés (n=7); CORT (n=4). ** $P < 0,01$. # ($P < 0,05$) y ## ($P < 0,01$) representan los resultados obtenidos al comparar dos grupos experimentales por el test de *Mann-Whitney*.

5.9 La disminución sináptica de NR2A/NR2B inducida por el CRS en hipocampo ventral es mediada por CORT

La disminución en NR2A producto del estrés se traduce en una disminución en la razón NR2A/NR2B en extracto total de hipocampo dorsal (figura 12A y tabla 3) y en sinaptoneurosomas de hipocampo ventral (figura 13B y tabla 3). En el caso del hipocampo dorsal, al agregar el grupo CORT el análisis por *Kruskal-Wallis* determina que las medianas no varían significativamente (figura 16A). Interesantemente, la disminución en NR2A en sinaptoneurosomas de hipocampo ventral es emulada por la administración crónica de CORT (figura 16B). El análisis por *Kruskal-Wallis* indica que las medianas varían significativamente ($P=0,0082$; figura 16B). El post-test de *Dunn* revela que grupo CORT presenta una disminución significativa en la razón NR2A/NR2B ($P=0,0364$; figura 16B) con respecto al grupo control, y esta disminución llega a niveles semejantes a la disminución observada por el test de *Mann-Whitney* en los animales estresados en relación al grupo control ($P=0,0297$; figura 16B).

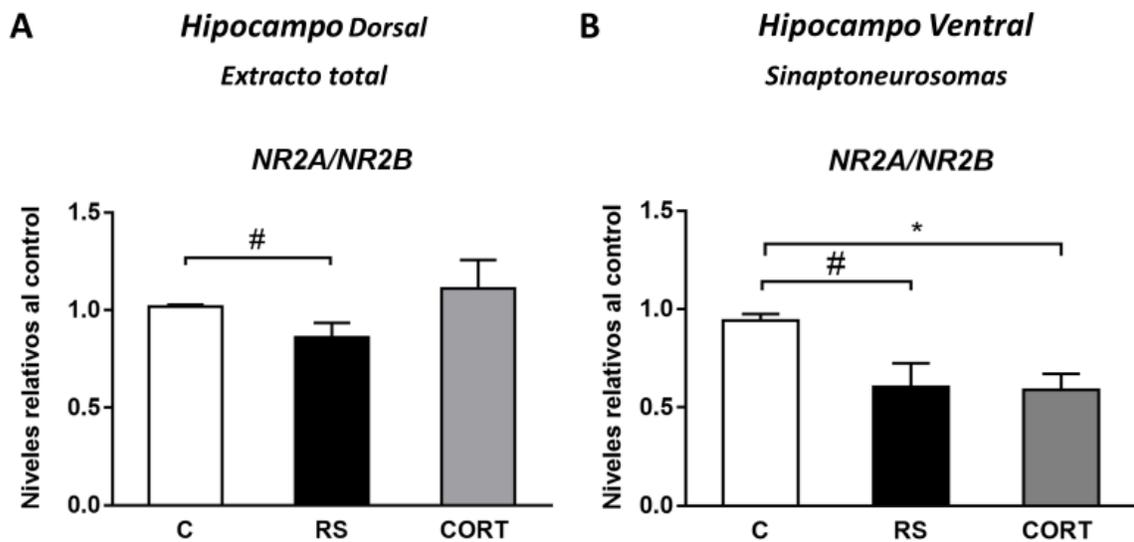


Figura 16| La administración de CORT emula el efecto del estrés en la razón sináptica NR2A/NR2B en el hipocampo ventral. Evaluación de la razón proteica de los niveles de NR2A/NR2B en extracto total de hipocampo dorsal (A) y sinaptoneurosomas de hipocampo ventral (B). Los gráficos representan el promedio \pm SEM para cada grupo experimental. Los datos fueron analizados por test de *Kruskal-Wallis* y post-test de *Dunn*. Control (n=7); Estrés (n=7); CORT (n=4). * $P<0,05$. # ($P<0,05$) representa los resultados obtenidos al comparar el grupo control con el grupo estrés por el test de *Mann-Whitney*.

En la tabla 4 se presenta un cuadro resumen de los resultados del objetivo 2. Los efectos inducidos por la administración de CORT se representan en color azul. En resumen, la administración crónica de CORT emula los efectos del estrés crónico en los niveles de las subunidades del receptor NMDA a nivel sináptico en el hipocampo ventral; específicamente, la disminución en NR2A y en la razón NR2A/NR2B.

Tabla 4| Resumen de resultados del objetivo específico 2.

Proteína	Homogeneizado Dorsal	Sinaptoneurosomas Dorsal	Homogeneizado Ventral	Sinaptoneurosomas Ventral
GluA1	ns	ns	↑	↓
GluA2	ns	ns	ns	↓
NR1	↑	ns	ns	ns
NR2A	↓	ns	ns	↓
NR2B	ns	ns	ns	ns
NR2A/NR2B	↓	ns	ns	↓
PSD-95	ns	ns	ns	↓

6. DISCUSIÓN

Los antecedentes sugieren que el estrés crónico y los GCs afectan diferencialmente al eje dorso-ventral del hipocampo en función del sexo. Es así que en machos se altera el aprendizaje y la memoria viso-espacial, funciones asociadas al hipocampo dorsal; mientras que en las hembras, se observan comportamientos de tipo ansioso y depresivo, elementos asociados a la función del hipocampo ventral. Se ha propuesto que las alteraciones en el comportamiento derivan de alteraciones en la excitabilidad neuronal en los distintos circuitos presentes en los polos del hipocampo, y éstas a su vez, se asocian a variaciones en la composición en subunidades de los receptores AMPA y NMDA (Pacheco y cols 2017). Como en ratas hembras el estrés crónico no afecta de forma negativa la función cognitiva, sino que más bien produce comportamientos de tipo depresivo, el desarrollo de esta memoria permitió indagar diferencias a nivel molecular en ambos polos hipocampales y contrastar estas modificaciones con cambios en la excitabilidad y conectividad reportados en la bibliografía.

6.1 El estrés crónico reduce la ganancia de peso corporal y el consumo de alimento

Diferentes autores han evaluado la ganancia de peso con el objetivo de validar el modelo de estrés utilizado. En ratas macho, el CRS produce una disminución en la ganancia de peso (Doremus-Fitzwater y cols, 2009; Pacheco y cols 2017). A diferencia de los machos, en esta memoria se demostró que el estrés crónico en ratas hembras produce una disminución en el peso corporal, lo que ha sido descrito por otros autores (Doremus-Fitzwater y cols 2009). Esta pérdida de peso se puede explicar por la disminución observada en el consumo diario de alimento durante los días de procedimiento estresor; efecto que no se produce en ratas macho (Pare y cols 1999). Estos resultados podrían sugerir efectos de tipo depresivo en hembras, como la pérdida de apetito, motivación y anhedonia, entre otros. Alternativamente, se debe considerar que el estrés crónico también produce la activación del eje HHA induciendo un aumento en los niveles circulantes de CORT en ratas hembras, hormona que incrementa el catabolismo promoviendo una disminución en el peso corporal (Baxter y Forsham,

1972). Además, la activación del eje HHA estimula la evacuación fecal durante el estrés (Nakade y cols 2007), efecto también observado en las ratas hembras durante el procedimiento de restricción, lo que contribuye a la pérdida en el peso corporal. Esta alternativa deberá ser confirmada por la evaluación de los niveles séricos de CORT.

6.2 El CRS altera diferencialmente los niveles de transcrito de los genes de expresión temprana *Arc* y *C-fos* y la actividad neuronal en hipocampo dorsal y ventral

Los genes de expresión temprana aumentan su transcripción dentro de los primeros minutos en respuesta a estímulos extracelulares, aumento que no necesariamente conlleva a un incremento en los niveles de proteína codificada (Sheng y Greenberg, 1990). Se ha propuesto que los genes de expresión temprana codifican para proteínas regulatorias que controlan la expresión de genes de respuesta lenta, que corresponden a genes cuya transcripción se activa de forma tardía en lapsos de horas (Sheng y Greenberg, 1990). Actualmente sabemos que muchos de estos genes de transcripción temprana codifican factores de transcripción que tienen implicancia en el comportamiento, memoria y aprendizaje (Dragunow, 1996).

C-fos es un gen de expresión temprana cuya expresión es dependiente de calcio y cAMP (Sagar y cols, 1988). Además, la proteína FOS al dimerizar con otros miembros de la familia JUN, constituye un factor de transcripción llamado AP-1 (*activator protein-1*) y transactiva genes de expresión tardía, influyendo en el fenotipo celular (Kovacs, 1998; Sagar y cols 1988). Por otra parte la expresión de *C-fos* ha sido ampliamente utilizado como un marcador en la actividad neuronal (Bisler y cols, 2002; Zangenehpour y Chaudhuri, 2002). En ratas macho sometidas al mismo modelo de estrés crónico utilizado en esta memoria, se produce un leve aumento en el transcrito de *C-fos* en hipocampo dorsal y ventral (Pacheco y cols 2017). En cambio, en esta memoria se determinó que en hembras el CRS, aunque no produce cambios en los niveles de transcrito de *C-fos* en hipocampo dorsal, produce una disminución en el hipocampo ventral. Estos resultados sugieren que el estrés crónico induce una disminución en la actividad neuronal del hipocampo ventral.

El gen *Arc* (*activity-regulated, cytoskeleton-associated*) corresponde también a un gen de expresión temprana y juega un rol crítico mediando la neuroplasticidad en respuesta a estímulos estresores (Ons y cols, 2010). Codifica para una proteína que, entre otras funciones, se asocia al citoesqueleto de actina, la cual es abundante en los sitios sinápticos (Fosnaugh y cols, 1995). Además, se ha determinado que ARC participa activamente en el tráfico de receptores AMPA, mediando su internalización endocítica (Chowdhury y cols, 2006). En machos, el CRS induce un aumento en los niveles del transcrito de *Arc* en hipocampo dorsal y ventral (Pacheco y cols 2017). En contraste, en este estudio determinamos que en ratas hembras el CRS aumenta tres veces los niveles de transcrito de *Arc* en hipocampo dorsal, indicando que no existe un efecto adaptativo producto de la cronicidad del estrés en el cambio de este transcrito en el polo dorsal del hipocampo. Además, el CRS reduce significativamente los niveles de transcrito de *Arc* en hipocampo ventral. Estos resultados sugieren un aumento de la actividad neuronal en el hipocampo dorsal, lo que podría estar relacionado con la mejora en el desempeño cognitivo observado en hembras estresadas (Bowman y cols 2001). Es necesario destacar que los cambios en los niveles de transcrito son independientes de los niveles de proteína, por lo tanto, no sería válido discutir sobre las posibles implicancias de cambios a nivel de proteína, ya que estos no fueron evaluados en esta memoria. Sin embargo, en otro estudio hemos demostrado que las variaciones en los niveles de transcrito coinciden con alteraciones en los niveles de proteína en estratos específicos del hipocampo (Pacheco y cols 2017).

La disminución de ambos transcritos en hipocampo ventral sugiere que la cronicidad del estrés produce un efecto adaptativo. En conjunto, las alteraciones en los transcritos de *C-fos* y *Arc* sugieren una disminución en la actividad de las neuronas del hipocampo ventral producto del estrés crónico. Esto podría estar relacionado con los comportamientos de tipo ansioso y depresivo observados en ratas estresadas (Doremus-Fitzwater y cols 2009; Palanza, 2001; Pohl y cols, 2007).

6.3 El estrés crónico afecta diferencialmente la expresión y la distribución de las subunidades del receptor AMPA en hipocampo dorsal y ventral

Estudios en roedores macho han evidenciado que en animales con fenotipo depresivo se produce una disminución en los niveles de transcrito de GluA1 y un aumento en los niveles de transcrito de GluA2 en hipocampo dorsal en comparación a animales resilientes, proponiendo que este perfil podría favorecer la exposición de receptores AMPA conteniendo GluA2 (Schmidt y cols, 2010). En contraste, en hipocampo ventral de ratas macho expuestas a CRS se produce un aumento en los niveles de transcrito de GluA1 sin alteraciones a nivel de proteína, lo que se ha interpretado como un aumento en la reserva de transcrito cuya traducción se encuentra inactiva (Pacheco y cols 2017). En esta memoria describimos por primera vez que el estrés produce una disminución en los niveles de transcrito de GluA1 en el hipocampo dorsal de hembras sin cambio en los niveles de proteínas, de forma similar a lo descrito en machos con fenotipo depresivo (Schmidt y cols 2010). A pesar de que no hay variación en los niveles de mRNA de GluA1 y GluA2 en hipocampo ventral de hembras, observamos un aumento en los niveles de GluA1 en extracto total de hipocampo y una disminución de las subunidades GluA1 y GluA2 a nivel sináptico.

El perfil de expresión observado en hembras estresadas a nivel total y sináptico podría sugerir que el estrés crónico induce la internalización de receptores AMPA en hipocampo ventral. El incremento en las subunidades GluA1 en extracto total de hipocampo ventral probablemente ocurra como un fenómeno adaptativo para favorecer la exposición de receptores carentes de la subunidad GluA2, los cuales median un aumento en la permeabilidad al ion calcio. Sin embargo, como estas variaciones no tienen correspondencia con lo que se observa a nivel sináptico, se podría especular que los mecanismos asociados al tráfico y/o exposición de los receptores a nivel sináptico podrían estar modificados por el estrés crónico. Será importante determinar a futuro aquellas modificaciones en los receptores que involucren su exposición en los sitios sinápticos, como cambios en los niveles de fosforilación de la subunidad GluA1 en Ser831 y Ser845 (He y cols, 2011).

Estudios han determinado el efecto de los GCs como parte de la respuesta estrés, especialmente en la regulación las subunidades de los receptores a glutamato (Tse y cols, 2011; Wang y Wang, 2009). Aunque existen pocos estudios que comparan cambios en los receptores de glutamato en respuesta a CORT en función del sexo, se ha descrito que la administración crónica de CORT en ratas macho no produce cambios en los niveles proteicos de GluA1 y GluA2 (Liu y cols, 2006). En contraste, en hembras se observa solo un pequeño aumento en GluA2 en hipocampo total (Liu y cols 2006). En esta memoria se demostró que el aumento en GluA1 en extracto total, y las disminuciones en GluA1 y GluA2 en fracciones sinápticas de hipocampo ventral no son emulados por la administración crónica de CORT, la cual si produjo una disminución en la ganancia de peso, validando la acción de la hormona (no mostrado). De acuerdo a nuestros resultados, las alteraciones producidas por el estrés en los niveles y la distribución de las subunidades del receptor AMPA no estarían mediadas por los GCs.

6.4 El estrés crónico y la administración de CORT modifican la expresión y distribución de las subunidades del receptor NMDA en hipocampo dorsal y ventral

El estrés agudo induce cambios en la densidad de espinas en dendritas apicales en CA1 del hipocampo de forma diferencial en machos y hembras, específicamente, un aumento en machos y una disminución en hembras; siendo estos efectos prevenidos por CPP, un antagonista del receptor NMDA (Shors y cols, 2004). Otras evidencias indican que el estrés prenatal produce en la adultez una disminución en los niveles de NR1 y NR2A en el hipocampo de ratas hembras y machos, cambios relacionados a comportamientos de tipo ansioso y depresivo (Sun y cols, 2013). En ratas macho, el CRS produce un aumento en NR1 y NR2B acompañado por una disminución en NR2A y en la razón NR2A/NR2B en hipocampo dorsal, (Pacheco y cols 2017).

A la fecha no existen estudios que evalúen los efectos del estrés crónico en la expresión de las subunidades NMDA en los distintos polos del hipocampo en ratas hembras. De forma similar a los machos, aquí observamos que el CRS induce un aumento en NR1 y una disminución en NR2A en hipocampo dorsal de ratas hembras. Pero a diferencia de los machos, evidenciamos que el CRS produce una disminución significativa en NR2A en

sinaptoneurosomas de hipocampo ventral de ratas hembras, disminuyendo la razón NR2A/NR2B. Este cambio en la proporción de las subunidades a nivel sináptico sugiere que en ratas hembras se favorecería la formación de LTP en el hipocampo ventral, por lo tanto, será importante realizar ensayos electrofisiológicos para ratificar esta afirmación. En relación al impacto de la disminución de NR2A sobre el comportamiento, se ha descrito que el *knockout* de NR2A en ratones machos genera efectos ansiolíticos y antidepresivos en diversas pruebas de comportamiento (Boyce-Rustay y Holmes, 2006).

Diversos estudios han relacionado el incremento en los niveles de GCs inducido durante el estrés con cambios asociados a la conectividad de las neuronas hipocampales. Es así como la administración crónica de GCs induce atrofia en el hipocampo dorsal, efecto que se ha relacionado a las neuronas hipocampales CA3 de ratas macho, estos cambios son dependientes de la activación del receptor NMDA (Armanini y cols, 1990; Magarinos y McEwen, 1995). En relación al efecto de los GCs sobre la expresión de los receptores de glutamato, experimentos *ex-vivo* de cortes hipocampales indican que luego de la exposición por 1-2 h a CORT se produce un incremento en las subunidades NR1 y NR2A en la superficie de las membranas (Tse y cols 2011). Por otro lado, algunos autores han demostrado que el CRS o CUMS producen una disminución en la exposición de todas las subunidades de AMPA y NMDA en los sitios sinápticos de la corteza prefrontal de ratas macho, efectos que son prevenidos por RU485, un conocido antagonista de GR (Yuen y cols, 2012). En este estudio demostramos que, en hembras, la administración crónica de CORT emula los efectos del estrés crónico en la variación de los niveles de NR2A y NR2A/NR2B solo en el hipocampo ventral. Esto podría sugerir que los polos dorsal y ventral del hipocampo presentan una sensibilidad diferente a los GCs, en parte dada por diferencia en la abundancia de sus receptores.

Los receptores MR y GR se distribuyen de forma heterogénea en el cerebro (Dorey y cols, 2012). La distribución proteica de MR y GR en el hipocampo se ha evaluado solo en ratas macho. Por ejemplo, en el hipocampo dorsal MR se distribuye de forma homogénea en CA1, CA3 y giro dentado (Han y cols, 2005). En contraste, GR se

distribuye en CA1 y giro dentado, pero no se expresa en CA3 (Han y cols 2005). Varias líneas de evidencia demuestran que el estrés crónico induce una desregulación en el cociente GR/MR, lo que se ha relacionado con la propensión a desórdenes del ánimo (De Kloet y cols, 1998). Por ejemplo, la administración crónica de anfetamina a ratas macho, droga que produce comportamientos de tipo ansioso y depresivo, induce una disminución en GR solo en el hipocampo ventral, además de una disminución en la razón GR/MR en ambos polos hipocampales (Barr y Forster, 2011). Estos datos sugieren que en trastornos de tipo depresivo se podría privilegiar la actividad de MR por sobre GR en el hipocampo ventral. Adicionalmente, mediante ensayos de unión se ha demostrado que en el hipocampo de ratas hembras MR presenta menor afinidad por los GCs que en machos (Turner, 1992). Esto sugiere que el receptor MR también podría mediar efectos producidos por el estrés crónico. Será importante a futuro determinar si el estrés crónico produce en ratas hembras modificaciones en los niveles de GR y GR/MR como las descritas en machos. Si es así, esto podría explicar por qué la administración de CORT emula los efectos del estrés crónico en NR2A/NR2B en el hipocampo ventral y no en el hipocampo dorsal; es decir, el efecto en el hipocampo ventral podría ser mediado por MR.

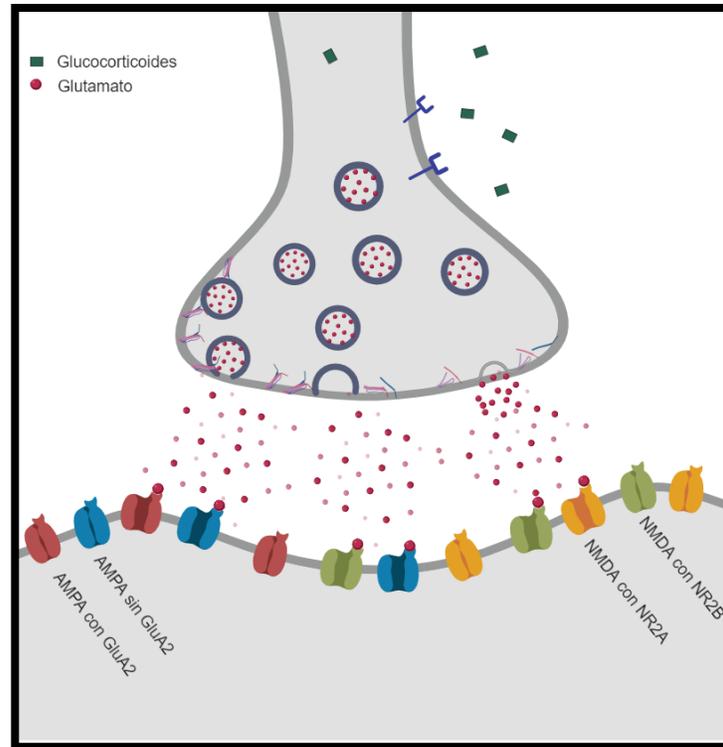
Estas evidencias en su conjunto sugieren que el estrés crónico, a través del incremento en los niveles de GCs y presumiblemente mediante la participación del receptor MR, favorece la exposición de receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B; cambio que favorecería la excitabilidad neuronal y la formación de LTP solo en el hipocampo ventral de ratas hembra.

6.5 Modelo propuesto

El estrés crónico mediante el aumento en la liberación de GCs induce un aumento en la liberación de glutamato en las neuronas hipocampales (Moghaddam, 2002) (figura 17). La actividad excitatoria por tiempos prolongados produce efectos detrimentales, por lo tanto, se produce una reprogramación adaptativa en la transmisión glutamatérgica. En el **hipocampo dorsal** el estrés crónico aumenta a nivel global la reserva interna de NR1

y se favorece la conformación de receptores con la subunidad NR2B sin existir cambios a niveles de sus transcritos (figura 17). Estos cambios no se reflejan a nivel sináptico, sugiriendo que el destino o la exposición de receptores NMDA se ve afectada por el estrés de manera independiente de GCs. Por otro lado, el estrés crónico en el hipocampo ventral promueve una menor exposición de receptores AMPA conformados por GluA2 y a la vez aumenta la reserva interna de la subunidad GluA1 para mantener una excitabilidad basal (figura 17). Las variaciones en los niveles de las subunidades GluA1 y GluA2 son independientes de CORT, pero dependientes del estrés. A nivel **sináptico en el hipocampo ventral** los GCs favorecen la conformación de receptores NMDA con la subunidad NR2B (figura 17). Así, mientras en el hipocampo dorsal el estrés crónico no produce cambios efectivos a nivel sináptico, en el hipocampo ventral se produce una reconfiguración en la transmisión excitatoria que favorece la formación de LTP dependiente de NMDA e inducida por los GCs, además de una excitabilidad moderada a través del receptor AMPA. Como consecuencia de esta reprogramación se produce una disminución en la maduración y conectividad sináptica, lo que se ve representado por una disminución en PSD-95.

Control Hipocampo Dorsal y Ventral



CRS Hipocampo Dorsal

CRS Hipocampo Ventral

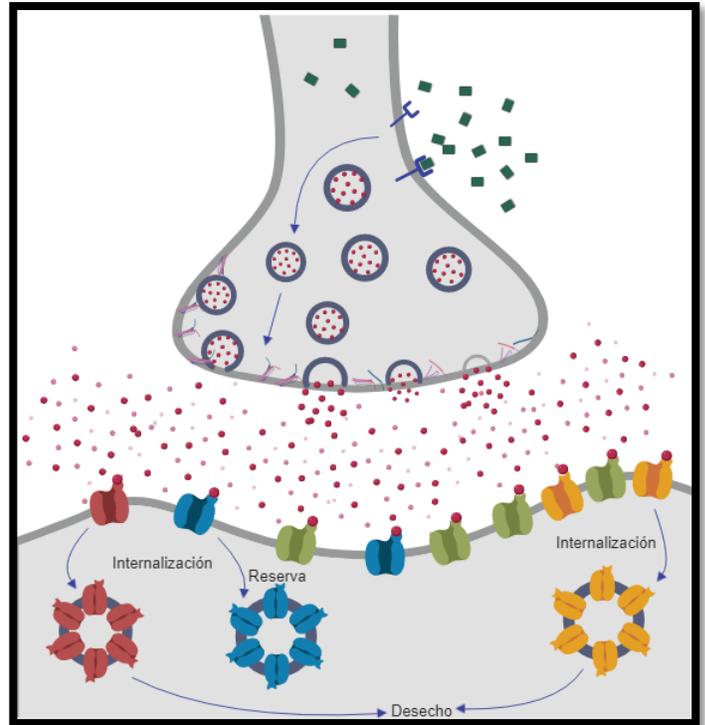
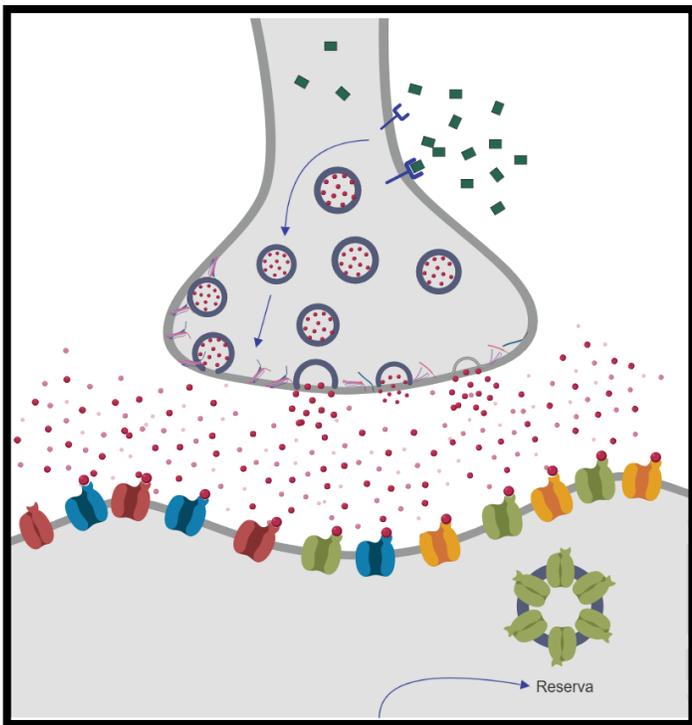


Figura 17| Modelo propuesto de los efectos del estrés y los glucocorticoides a partir de los resultados. Arriba, condiciones en estado basal. Inferior izquierdo, los efectos del CRS en el hipocampo dorsal. Inferior derecho, los efectos del CRS en el hipocampo ventral.

7. CONCLUSIONES

- A diferencia de los machos, el CRS induce una disminución en la razón NR2A/NR2B a nivel sináptico en el hipocampo ventral de ratas hembras, efecto que es mediado por los GCs.
- El CRS produce una disminución en las subunidades del receptor AMPA a nivel sináptico en el hipocampo ventral.
- Probablemente existe un detrimento en la efectividad y conectividad sináptica en el hipocampo ventral como consecuencia del estrés crónico.
- El CRS induce un aumento en NR1 y una disminución en NR2A/NR2B en el hipocampo dorsal, sin embargo, estos efectos no se reflejan a nivel sináptico.
- Esta memoria de título sigue recalcando la importancia de considerar ambos sexos en la investigación biomédica de los trastornos del ánimo, además de la importancia de considerar la heterogeneidad estructural y funcional del hipocampo.

En conclusión, se confirma la hipótesis propuesta, el CRS produce una disminución en la razón sináptica NR2A/NR2B en el hipocampo ventral de ratas hembras, y dicho efecto es emulado perfectamente por la administración crónica de CORT. Este estudio demuestra que el hipocampo ventral es más sensible al estrés y los GCs en relación al hipocampo dorsal en ratas hembra, hecho que podría explicar el comportamiento de tipo depresivo, además del dimorfismo sexual en los desórdenes del ánimo como el DDM.

8. LIMITACIONES Y PROYECCIONES

En este estudio no se evaluó la exposición en la membrana de las subunidades. Para superar esta limitación será importante evaluar variaciones en algunas fosforilaciones indispensables para la exposición de algunas de estas subunidades. Por ejemplo, la fosforilación de la subunidad GluA1 en Ser831 y Ser845 son útiles para evaluar la exposición y la conductancia del receptor AMPA. Además, para complementar, sería útil realizar ensayos electrofisiológicos para evaluar la formación de LTP en ambos polos hipocampales.

A pesar de que los niveles de transcrito de los genes de expresión temprana son un buen indicador de la actividad neuronal, sería interesante evaluar los niveles de proteína codificada, ya que éstas juegan un rol importante en la plasticidad sináptica. En el caso la proteína FOS, esta actúa a nivel transcripcional formando parte del factor AP-1. Por otro lado, ARC participa directamente a nivel sináptico regulando internalización de vesículas y el tráfico de receptores.

Además, en esta memoria no se evaluaron los niveles de los receptores GR y MR. Como se menciona en la discusión, será importante evaluar la abundancia y distribución de dichos receptores en los distintos polos del hipocampo. También sería interesante evaluar el efecto de la administración de inhibidores de estos receptores para confirmar su participación en los cambios descritos.

Adicionalmente, en los resultados se pueden observar varios cambios que no llegan a ser significativos, especialmente en los experimentos de RT-qPCR y en el grupo experimental CORT. Para solucionar este problema estadístico, sería útil aumentar el número de animales utilizados en estas determinaciones.

Finalmente, un factor importante es que los animales no fueron segregados según la etapa del ciclo estral en que iniciaron los procedimientos y en la que fueron sacrificados. Para determinaciones futuras se tendrá este factor en cuenta. A pesar de esto, la variación obtenida no es excesiva y se obtuvieron resultados robustos.

1. BIBLIOGRAFÍA

- Armanini, M. P., Hutchins, C., Stein, B. A. y Sapolsky, R. M. (1990). Glucocorticoid endangerment of hippocampal neurons is NMDA-receptor dependent. *Brain Res*, 532(1-2), 7-12.
- Barr, J. L. y Forster, G. L. (2011). Serotonergic neurotransmission in the ventral hippocampus is enhanced by corticosterone and altered by chronic amphetamine treatment. *Neuroscience*, 182, 105-114. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.020
- Barria, A. y Malinow, R. (2005). NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron*, 48(2), 289-301. doi: 10.1016/j.neuron.2005.08.034
- Baum, A., O'Keefe, M. K. y Davidson, L. M. (1990). Acute Stressors and Chronic Response: The Case of Traumatic Stress1. *Journal of Applied Social Psychology*, 20(20), 1643-1654. doi: 10.1111/j.1559-1816.1990.tb01499.x
- Baxter, J. D. y Forsham, P. H. (1972). Tissue effects of glucocorticoids. *Am J Med*, 53(5), 573-589.
- Belmaker, R. H. y Agam, G. (2008). Major depressive disorder. *N Engl J Med*, 358(1), 55-68. doi: 10.1056/NEJMra073096
- Bisler, S., Schleicher, A., Gass, P., Stehle, J. H., Zilles, K. y Staiger, J. F. (2002). Expression of c-Fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: time course of induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment. *J Chem Neuroanat*, 23(3), 187-198.
- Bliss, T. V. y Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31-39. doi: 10.1038/361031a0
- Bowman, R. E., Zrull, M. C. y Luine, V. N. (2001). Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats. *Brain Res*, 904(2), 279-289.
- Boyce-Rustay, J. M. y Holmes, A. (2006). Genetic inactivation of the NMDA receptor NR2A subunit has anxiolytic- and antidepressant-like effects in mice. *Neuropsychopharmacology*, 31(11), 2405-2414. doi: 10.1038/sj.npp.1301039
- Bravo, J. A., Diaz-Veliz, G., Mora, S., Ulloa, J. L., Berthoud, V. M., Morales, P., Arancibia, S. y Fiedler, J. L. (2009). Desipramine prevents stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal markers of neuroprotection. *Behav Pharmacol*, 20(3), 273-285. doi: 10.1097/FBP.0b013e32832c70d9
- Castaneda, P., Munoz, M., Garcia-Rojo, G., Ulloa, J. L., Bravo, J. A., Marquez, R., Garcia-Perez, M. A., Arancibia, D., Araneda, K., Rojas, P. S., Mondaca-Ruff, D., Diaz-Veliz, G., Mora, S., Aliaga, E. y Fiedler, J. L. (2015). Association of N-cadherin levels and downstream effectors of Rho GTPases with dendritic spine loss induced by chronic stress in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res*, 93(10), 1476-1491. doi: 10.1002/jnr.23602
- Cui, Z., Feng, R., Jacobs, S., Duan, Y., Wang, H., Cao, X. y Tsien, J. Z. (2013). Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. *Sci Rep*, 3, 1036. doi: 10.1038/srep01036
- Chaplin, T. M., Hong, K., Bergquist, K. y Sinha, R. (2008). Gender differences in response to emotional stress: an assessment across subjective, behavioral, and physiological domains and relations to alcohol craving. *Alcohol Clin Exp Res*, 32(7), 1242-1250. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00679.x
- Chmielarz, P., Kreiner, G., Kot, M., Zelek-Molik, A., Kowalska, M., Baginska, M., Daniel, W. A. y Nalepa, I. (2015). Disruption of glucocorticoid receptors in the noradrenergic system leads to BDNF up-regulation and altered serotonergic transmission associated with a depressive-like phenotype in female GR(DBHCre) mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 137, 69-77. doi: 10.1016/j.pbb.2015.08.001

- Chowdhury, S., Shepherd, J. D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R. S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R. L. y Worley, P. F. (2006). Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 52(3), 445-459. doi: 10.1016/j.neuron.2006.08.033
- Das-Munshi, J., Goldberg, D., Bebbington, P. E., Bhugra, D. K., Brugha, T. S., Dewey, M. E., Jenkins, R., Stewart, R. y Prince, M. (2008). Public health significance of mixed anxiety and depression: beyond current classification. *Br J Psychiatry*, 192(3), 171-177. doi: 10.1192/bjp.bp.107.036707
- De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S. y Joels, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*, 19(3), 269-301. doi: 10.1210/edrv.19.3.0331
- Dittmar, K. D., Demady, D. R., Stancato, L. F., Krishna, P. y Pratt, W. B. (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor.hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60.hsp70. *J Biol Chem*, 272(34), 21213-21220.
- Doremus-Fitzwater, T. L., Varlinskaya, E. I. y Spear, L. P. (2009). Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiol Behav*, 97(3-4), 484-494. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.03.025
- Dorey, R., Pierard, C., Chauveau, F., David, V. y Beracochea, D. (2012). Stress-induced memory retrieval impairments: different time-course involvement of corticosterone and glucocorticoid receptors in dorsal and ventral hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 37(13), 2870-2880. doi: 10.1038/npp.2012.170
- Dragunow, M. (1996). A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behav Genet*, 26(3), 293-299.
- Fanselow, M. S. y Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), 7-19. doi: 10.1016/j.neuron.2009.11.031
- Fosnaugh, J. S., Bhat, R. V., Yamagata, K., Worley, P. F. y Baraban, J. M. (1995). Activation of arc, a putative "effector" immediate early gene, by cocaine in rat brain. *J Neurochem*, 64(5), 2377-2380.
- Gallucci, W. T., Baum, A., Laue, L., Rabin, D. S., Chrousos, G. P., Gold, P. W. y Kling, M. A. (1993). Sex differences in sensitivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Health Psychol*, 12(5), 420-425.
- García-Rojo, G., Fresno, C., Vilches, N., Díaz-Veliz, G., Mora, S., Aguayo, F., Pacheco, A., Parra-Fiedler, N., Parra, C. S., Rojas, P. S., Tejos, M., Aliaga, E. y Fiedler, J. L. (2017). The ROCK Inhibitor Fasudil Prevents Chronic Restraint Stress-Induced Depressive-Like Behaviors and Dendritic Spine Loss in Rat Hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol*. doi: 10.1093/ijnp/pyw108
- Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R. y Joels, M. (2011). Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J Endocrinol*, 209(2), 153-167. doi: 10.1530/JOE-10-0472
- Hall, B. S., Moda, R. N. y Liston, C. (2015). Glucocorticoid Mechanisms of Functional Connectivity Changes in Stress-Related Neuropsychiatric Disorders. *Neurobiol Stress*, 1, 174-183. doi: 10.1016/j.ynstr.2014.10.008
- Han, F., Ozawa, H., Matsuda, K., Nishi, M. y Kawata, M. (2005). Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neurosci Res*, 51(4), 371-381. doi: 10.1016/j.neures.2004.12.013
- He, K., Goel, A., Ciarkowski, C. E., Song, L. y Lee, H. K. (2011). Brain area specific regulation of synaptic AMPA receptors by phosphorylation. *Commun Integr Biol*, 4(5), 569-572. doi: 10.4161/cib.4.5.15890
- Hollmann, M., Hartley, M. y Heinemann, S. (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*, 252(5007), 851-853.

- Ito, M. (1989). Long-term depression. *Annu Rev Neurosci*, 12, 85-102. doi: 10.1146/annurev.ne.12.030189.000505
- Jacobson, L. y Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev*, 12(2), 118-134. doi: 10.1210/edrv-12-2-118
- Kalynchuk, L. E., Gregus, A., Boudreau, D. y Perrot-Sinal, T. S. (2004). Corticosterone increases depression-like behavior, with some effects on predator odor-induced defensive behavior, in male and female rats. *Behav Neurosci*, 118(6), 1365-1377. doi: 10.1037/0735-7044.118.6.1365
- Kendler, K. S., Thornton, L. M. y Gardner, C. O. (2000). Stressful life events and previous episodes in the etiology of major depression in women: an evaluation of the "kindling" hypothesis. *Am J Psychiatry*, 157(8), 1243-1251. doi: 10.1176/appi.ajp.157.8.1243
- Kitraki, E., Kremmyda, O., Youlatos, D., Alexis, M. N. y Kittas, C. (2004). Gender-dependent alterations in corticosteroid receptor status and spatial performance following 21 days of restraint stress. *Neuroscience*, 125(1), 47-55. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.12.024
- Kovacs, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int*, 33(4), 287-297.
- Krishnan, V. y Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455(7215), 894-902. doi: 10.1038/nature07455
- Labonte, B., Engmann, O., Purushothaman, I., Menard, C., Wang, J., Tan, C., Scarpa, J. R., Moy, G., Loh, Y. E., Cahill, M., Lorsch, Z. S., Hamilton, P. J., Calipari, E. S., Hodes, G. E., Issler, O., Kronman, H., Pfau, M., Obradovic, A. L. J., Dong, Y., Neve, R. L., Russo, S., Kazarskis, A., Tamminga, C., Mechawar, N., Turecki, G., Zhang, B., Shen, L. y Nestler, E. J. (2017). Sex-specific transcriptional signatures in human depression. *Nat Med*, 23(9), 1102-1111. doi: 10.1038/nm.4386
- Liu, H. H., Payne, H. R., Wang, B. y Brady, S. T. (2006). Gender differences in response of hippocampus to chronic glucocorticoid stress: role of glutamate receptors. *J Neurosci Res*, 83(5), 775-786. doi: 10.1002/jnr.20782
- Lynch, D. R. y Guttman, R. P. (2001). NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr Drug Targets*, 2(3), 215-231.
- MacQueen, G. y Frodl, T. (2011). The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? *Mol Psychiatry*, 16(3), 252-264. doi: 10.1038/mp.2010.80
- Magarinos, A. M. y McEwen, B. S. (1995). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*, 69(1), 89-98.
- Maggio, N. y Segal, M. (2011). Persistent changes in ability to express long-term potentiation/depression in the rat hippocampus after juvenile/adult stress. *Biol Psychiatry*, 69(8), 748-753. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.11.026
- Matsubara, A., Laake, J. H., Davanger, S., Usami, S. y Ottersen, O. P. (1996). Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *J Neurosci*, 16(14), 4457-4467.
- Mayberg, H. S., Liotti, M., Brannan, S. K., McGinnis, S., Mahurin, R. K., Jerabek, P. A., Silva, J. A., Tekell, J. L., Martin, C. C., Lancaster, J. L. y Fox, P. T. (1999). Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. *Am J Psychiatry*, 156(5), 675-682. doi: 10.1176/ajp.156.5.675
- McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 22, 105-122. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.105

- McEwen, B. S., De Kloet, E. R. y Rostene, W. (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev*, 66(4), 1121-1188. doi: 10.1152/physrev.1986.66.4.1121
- McLay, R. N., Freeman, S. M. y Zadina, J. E. (1998). Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes maze. *Physiol Behav*, 63(5), 933-937.
- MINSAL. (2018). Primeros y segundos resultados de ENS 2016-2017 Retrieved 29 Abr 2019, 2019, from <http://epi.minsal.cl/resultados-encuestas/>
- Moghaddam, B. (2002). Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol Psychiatry*, 51(10), 775-787.
- Moghaddam, B., Bolinao, M. L., Stein-Behrens, B. y Sapolsky, R. (1994). Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res*, 655(1-2), 251-254.
- Moser, M. B. y Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6), 608-619. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7
- Nakade, Y., Fukuda, H., Iwa, M., Tsukamoto, K., Yanagi, H., Yamamura, T., Mantyh, C., Pappas, T. N. y Takahashi, T. (2007). Restraint stress stimulates colonic motility via central corticotropin-releasing factor and peripheral 5-HT₃ receptors in conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292(4), G1037-1044. doi: 10.1152/ajpgi.00419.2006
- NIMH. (2017). Major Depression. Retrieved 27 enero 2019, 2019, from <https://www.nimh.nih.gov/health/statistics/major-depression.shtml>
- OMS. (2018). Depression. Retrieved 27 enero 2019, 2019, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- Ons, S., Rotllant, D., Marín-Blasco, I. J. y Armario, A. (2010). Immediate-early gene response to repeated immobilization: Fos protein and arc mRNA levels appear to be less sensitive than c-fos mRNA to adaptation. *European Journal of Neuroscience*, 31(11), 2043-2052. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07242.x
- Orrego, F. y Villanueva, S. (1993). The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neuroscience*, 56(3), 539-555.
- Pacheco, A., Aguayo, F. I., Aliaga, E., Muñoz, M., García-Rojo, G., Olave, F. A., Parra-Fiedler, N. A., García-Pérez, A., Tejos-Bravo, M., Rojas, P. S., Parra, C. S. y Fiedler, J. L. (2017). Chronic Stress Triggers Expression of Immediate Early Genes and Differentially Affects the Expression of AMPA and NMDA Subunits in Dorsal and Ventral Hippocampus of Rats. *Front Mol Neurosci*, 10, 244. doi: 10.3389/fnmol.2017.00244
- Palanza, P. (2001). Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev*, 25(3), 219-233.
- Pare, W. P., Blair, G. R., Kluczynski, J. y Tejani-Butt, S. (1999). Gender differences in acute and chronic stress in Wistar Kyoto (WKY) rats. *Integr Physiol Behav Sci*, 34(4), 227-241.
- Parker, G., Roy, K., Mitchell, P., Wilhelm, K., Malhi, G. y Hadzi-Pavlovic, D. (2002). Atypical depression: a reappraisal. *Am J Psychiatry*, 159(9), 1470-1479. doi: 10.1176/appi.ajp.159.9.1470
- Pinto, V., Costa, J. C., Morgado, P., Mota, C., Miranda, A., Bravo, F. V., Oliveira, T. G., Cerqueira, J. J. y Sousa, N. (2015). Differential impact of chronic stress along the hippocampal dorsal-ventral axis. *Brain Struct Funct*, 220(2), 1205-1212. doi: 10.1007/s00429-014-0713-0
- Pittenger, C. y Duman, R. S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 88-109. doi: 10.1038/sj.npp.1301574
- Pohl, J., Olmstead, M. C., Wynne-Edwards, K. E., Harkness, K. y Menard, J. L. (2007). Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety- and

- depression-like behaviors in adulthood: The importance of stressor type and gender. *Behav Neurosci*, 121(3), 462-474. doi: 10.1037/0735-7044.121.3.462
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S. y Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*, 13(1), 22-37. doi: 10.1038/nrn3138
- Rahman, Q., Wilson, G. D. y Abrahams, S. (2003). Sexual orientation related differences in spatial memory. *J Int Neuropsychol Soc*, 9(3), 376-383. doi: 10.1017/S1355617703930037
- Ramamoorthy, S. y Cidowski, J. A. (2016). Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am*, 42(1), 15-31, vii. doi: 10.1016/j.rdc.2015.08.002
- Sagar, S. M., Sharp, F. R. y Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 240(4857), 1328-1331.
- Sanacora, G., Treccani, G. y Popoli, M. (2012). Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology*, 62(1), 63-77. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.036
- Sapan, C. V., Lundblad, R. L. y Price, N. C. (1999). Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem*, 29 (Pt 2), 99-108.
- Schmidt, M. V., Trumbach, D., Weber, P., Wagner, K., Scharf, S. H., Liebl, C., Datson, N., Namendorf, C., Gerlach, T., Kuhne, C., Uhr, M., Deussing, J. M., Wurst, W., Binder, E. B., Holsboer, F. y Muller, M. B. (2010). Individual stress vulnerability is predicted by short-term memory and AMPA receptor subunit ratio in the hippocampus. *J Neurosci*, 30(50), 16949-16958. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4668-10.2010
- Schmittgen, T. D. y Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3(6), 1101-1108.
- Segal, M., Richter-Levin, G. y Maggio, N. (2010). Stress-induced dynamic routing of hippocampal connectivity: a hypothesis. *Hippocampus*, 20(12), 1332-1338. doi: 10.1002/hipo.20751
- Senba, E., Matsunaga, K., Tohyama, M. y Noguchi, K. (1993). Stress-induced c-fos expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway. *Brain Res Bull*, 31(3-4), 329-344.
- Seney, M. L., Huo, Z., Cahill, K., French, L., Puralewski, R., Zhang, J., Logan, R. W., Tseng, G., Lewis, D. A. y Sibille, E. (2018). Opposite Molecular Signatures of Depression in Men and Women. *Biol Psychiatry*, 84(1), 18-27. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.01.017
- Sheng, M. y Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477-485.
- Shors, T. J., Falduto, J. y Leuner, B. (2004). The opposite effects of stress on dendritic spines in male vs. female rats are NMDA receptor-dependent. *Eur J Neurosci*, 19(1), 145-150.
- Sun, H., Guan, L., Zhu, Z. y Li, H. (2013). Reduced levels of NR1 and NR2A with depression-like behavior in different brain regions in prenatally stressed juvenile offspring. *PLoS One*, 8(11), e81775. doi: 10.1371/journal.pone.0081775
- Tse, Y. C., Bagot, R. C., Hutter, J. A., Wong, A. S. y Wong, T. P. (2011). Modulation of synaptic plasticity by stress hormone associates with plastic alteration of synaptic NMDA receptor in the adult hippocampus. *PLoS One*, 6(11), e27215. doi: 10.1371/journal.pone.0027215
- Turner, B. B. (1992). Sex differences in the binding of type I and type II corticosteroid receptors in rat hippocampus. *Brain Res*, 581(2), 229-236.
- Ulloa, J. L., Castaneda, P., Berríos, C., Díaz-Velíz, G., Mora, S., Bravo, J. A., Aráneda, K., Menares, C., Morales, P. y Fiedler, J. L. (2010). Comparison of the antidepressant sertraline on differential depression-like behaviors elicited by restraint stress and repeated corticosterone administration. *Pharmacol Biochem Behav*, 97(2), 213-221. doi: 10.1016/j.pbb.2010.08.001

- Wang, C. C. y Wang, S. J. (2009). Modulation of presynaptic glucocorticoid receptors on glutamate release from rat hippocampal nerve terminals. *Synapse*, 63(9), 745-751. doi: 10.1002/syn.20654
- Yuen, E. Y., Wei, J., Liu, W., Zhong, P., Li, X. y Yan, Z. (2012). Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron*, 73(5), 962-977. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.033
- Zangenehpour, S. y Chaudhuri, A. (2002). Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Brain Res Mol Brain Res*, 109(1-2), 221-225.