



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

Efectos del estrés crónico por hacinamiento, ruido o ambos, sobre la memoria espacial, conducta exploratoria y población neuronal del hipocampo, en ratas macho recién destetadas.

TESIS

que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO
(opción Neurociencias)

presenta

Carlos Eduardo Valencia Alfonso

Comité tutelar:

Dra. en C. Ma. Sonia Luquín De Anda (Directora)

Dr. en C. Joaquín García Estrada

Dr. en C. Jorge Juárez González

Dr. en C. Alfredo Feria Velasco

Guadalajara, Jalisco

Diciembre de 2003

A las heroicas **104 ratitas Wistar (incluyendo las del estudio piloto)** de quienes tomamos su vida con respeto y algo de tristeza para tratar de satisfacer este deseo voraz de explicar las cosas. Espero que su sacrificio haya valido la pena.

A **mi mamá**, por su amor incondicional, por protegerme y alejarme “inconscientemente” de las garras del psicoanálisis y por hacerme creer desde chiquito, eso de que soy capaz de hacer lo que sea que se me ocurra proponerme. Ojalá sea cierto.

A **mi papá**, por sus consejos y su amistad, y por contagiarme la curiosidad sobre el cómo y el por qué de la naturaleza, motivación fundamental cualquier aspirante a científico. Ya de grande descubrí que el también quiso serlo alguna vez, aunque claro, la genética del frijol no es mucho más interesante que el estrés de ratas.

A **mi hermana**, por su inquebrantable amor fraterno, por sus incesantes preguntas y el constante entrenamiento en tener que contra-argumentar cualquiera de sus posiciones. Esto entrenaría a cualquiera para la disertación más difícil.

A **mi moquita**, por amarme aun después de conocerme, y por entender y compartir la extraña manera de ver el mundo que tenemos por delante juntos, y a veces, revueltos.

A mis **familiares y amigos** que día a día se preguntaron con curiosidad, asombro, e incluso aburrimiento ¿qué rayos tiene que ver la psicología con recolectar orina de rata? Espero que por fin les quede claro si leen este trabajo.

Finalmente a **cualquiera que quiera leer esta tesis** y que haga parte de la comunidad de ñoños que creemos firmemente que el mundo a través de los ojos de la ciencia, realmente puede llevarnos a alguna parte.

¡Que nos coma a todos el marrano!

Con mucho amor,

Charlie

Quiero agradecer a las instituciones y personas que brindaron su apoyo a este proyecto.

- **SIMORELOS** 19990302034, a partir del mes de febrero de 1999. Responsable. Dra. en C. Ma. Sonia Luquín de Anda. Dpto. de Neurociencias del CUCS. Efectos del estrés crónico sobre aprendizaje, memoria y respuesta inmune cerebral en ratas machos y hembras jóvenes.

- **CONACYT** clave 35384-M, a partir del mes de enero de 2001 Responsable. Dra. en C. Ma. Sonia Luquín de Anda. Dpto. de Neurociencias del CUCS. Efectos protectores de neuroesteroides progenitores sobre daño neuronal en la corteza cerebral y el hipocampo de ratas sometidas a estrés crónico.

- **Secretaría de Relaciones Exteriores de México**. Programa Cuauhtemoc II. Este trabajo fue realizado con una beca otorgada por el Gobierno de México a través del Instituto Mexicano de Cooperación Internacional (IMEXCI) de la Secretaría de Relaciones Exteriores.

- **Laboratorio de Neuroendocrinología** del Centro de Investigación Biomédica de Occidente.

- **Departamento de Neurociencias** del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, de la Universidad de Guadalajara.

- **Instituto de Neurociencias** de la Universidad de Guadalajara.

- **Dr. Jorge Juárez y Dr. Alfredo Feria**, por sus valiosos aportes al trabajo de investigación, sus observaciones y sugerencias al mismo.

Agradecimientos

- **Dra. Sonia “donde está Charlie” Luquín**, por su apoyo en cada una de las actividades experimentales y académicas de este trabajo. Además por la oportunidad de presentar nuestros trabajos en eventos nacionales e internacionales, y por ayudarme maternalmente en cada paso del proceso de vivir en México.

- **Dr. Joaquín “hágase novia a fulanita” García**, por sus valiosos consejos en la corrección del manuscrito, en la planeación de los experimentos y en los análisis de los resultados. Además por sus reiteradas aunque fallidas recomendaciones acerca de mi “life style” y la novia ideal.

- **Dr. Oscar “son las 2, ya me voy” González** por permitirse la constante interrupción de su día, para enseñarme alguna de las miles de cosas que no sabía como hacer, por brindarme su amistad sus consejos y su inquebrantable honestidad.

- **Ricardo “yo trabajé en la playa” Solis**, por su ayuda en todos los detalles cotidianos que usualmente pasan desapercibidos para todos, menos para él.

- **M. en C. Rocío “aguas con el paraformaldehído” González**, por interesarse en el conductismo, por ser mi amiga, escucharme y aconsejarme y por prestarme la plancha y el saco de dormir.

- **Adriana “ya me di cuenta” Castellanos**, por mostrarme el principio de todo lo bonito de México y por las interminables discusiones sobre filosofía y la física cuántica de los fantasmas.

- **Martita “¿que hay en el cine?” Morales**, por llevarme de la mano al bajo mundo de la inmunocitoquímica, por acompañarme al cine y no poner tanta rola de Mecano.

- **Homero**, por corroborarme que la mediocridad es un enemigo invencible.

Agradecimientos

- **Sandra, Nivea y Rocío “los ángeles de Charlie”;** Mario y Fabián, por su ayuda en los experimentos, por su interés y confianza en la psicología científica, y por su esfuerzo en ir más allá de lo que les exige la licenciatura.

- **Dra. Yolanda Díaz**, por brindarme la oportunidad de seguir vinculado al laboratorio luego de terminar los créditos de la maestría y terminar mi tesis al mismo tiempo. Por los platanitos de Colima y la multa de la federal de caminos.

- **M. en C. Claudia González, Jorge, Gerardo, Paty y Lalo “los yolanditos”** por su ayuda en el proceso experimental y sus ganas de aprender.

Carlos.

CONTENIDO	PÁGINA
ABREVIATURAS Y SIGLAS	
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Respuesta de estrés	3
Efectos de los glucocorticoides en el sistema nervioso	4
Estrés social	6
Efecto del estrés sobre las funciones hipocampales	10
<i>Alteraciones en memoria y aprendizaje</i>	10
<i>Alteraciones sobre la conducta exploratoria</i>	15
Desarrollo ontogenético del hipocampo	16
Mecanismos de daño por glucocorticoides	19
<i>Papel de los receptores a glucocorticoides</i>	20
<i>Hiperactividad del eje HPA inducida por glucocorticoides</i>	20
<i>Neurotoxicidad inducida por glucocorticoides</i>	21
<i>Factores del sistema inmune asociados a glucocorticoides.</i>	22
<i>Apoptosis relacionada con los glucocorticoides</i>	23
ANTECEDENTES	27
	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
HIPÓTESIS	36
OBJETIVO GENERAL	37

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
DISEÑO EXPERIMENTAL	39
Cronograma del estudio	39
Grupos de estudio	40
<i>Control</i>	40
<i>Hacinamiento</i>	40
<i>Ruido</i>	40
<i>Hacinamiento y ruido</i>	40
Descripción operativa de las variables independientes	40
<i>Estrés crónico de tipo social</i>	40
Descripción operativa de las variables dependientes	41
<i>Peso corporal y tamaño</i>	41
<i>Índice de neuronas del hipocampo, en necrosis y apoptosis</i>	41
<i>Actividad exploratoria en el campo de agujeros</i>	42
<i>Memoria espacial en el laberinto acuático de Morris</i>	42
Criterios de inclusión	42
Criterios de exclusión	42
MATERIALES Y MÉTODOS	43
Animales de experimentación	43
Medidas somatométricas	43
Exposición de los animales al estrés	43
Estudios analíticos	44
<i>Cuantificación de corticosterona en orina</i>	44
<i>Cromatografía de líquidos</i>	45
Estudios conductuales	46
<i>Campo de agujeros (Hole board).</i>	46
<i>Laberinto acuático de Morris.</i>	47
Estudios morfológicos	49
<i>Perfusión intracardiaca para fijación del cerebro</i>	49

	<i>Índice</i>
<i>Inmunocitoquímica para evaluación de apoptosis o necrosis neuronal</i>	50
Tratamiento de las muestras	51
Inmunohistoquímica para identificación de neuronas	52
Cuantificación de neuronas	52
Análisis estadístico	53
RESULTADOS	55
Datos somatométricos	55
Cuantificación de corticosterona urinaria	55
Estudios de comportamiento	59
<i>Campo de agujeros, (Hole Board)</i>	59
<i>Laberinto acuático de Morris</i>	62
Estudios morfológicos	62
<i>Evaluación del daño neuronal</i>	62
DISCUSIÓN	68
Elevación de los niveles de corticosterona	68
<i>Cambios en la CORT del grupo de Hacinamiento</i>	68
<i>Cambios en la CORT del grupo de Ruido</i>	72
<i>Cambios en la CORT del grupo de Hacinamiento y ruido</i>	73
Retardo en las medidas somatométricas	75
Daño neuronal	79
Estudios del comportamiento	85
<i>Campo de agujeros (Hole Board) y conducta exploratoria</i>	85
<i>Laberinto acuático de Morris (MWM) y memoria espacial</i>	90
CONCLUSIONES	94
REFERENCIAS	95

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica (Adrenocorticotropic Hormone)
AIF	Factor Inductor de Apoptosis (Apoptosis Inducing Factor)
APAF1	Factor 1 Inductor de Proteasa Apoptótica (Apoptotic Protease Inductor Factor 1)
CAMP	Adenosín Monofosfato Cíclico (Cyclic Adenosin Monophosphate)
CORT	Corticosterona
c-PCA	c-Fenilcoralanina (c-Phenilchloralanine)
CRH	Hormona Liberadora de la Corticotropina (Corticotropin Release Hormone)
DG	Giro dentado (Dentate Gyrus)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Desoxyribonucleic Acid)
EAA	Aminoácidos Excitatorios (Excitatory Aminoacids)
GCs	Glucocorticoides
GRs	Glucoreceptores
HPA	Hipotálamo-Pituitario-Adrenal
IL	Interleucina (Interleukin)
LTP	Potenciación a Largo Plazo (Long Term Potentiation)
MRs	Mineraloreceptores
MWM	Laberinto Acuático de Morris
NMDAR	Receptor N-Metil de Aspartato (N-Metil Aspartate Receptor)

NO	Óxido Nítrico (Nitric Oxide)
PKA	Proteína Cinasa A (Protein Kinasa A)
PN	Día Postnatal (Postnatal Day)
PVN	Núcleo Paraventricular (Paraventricular Nucleus)
SNC	Sistema Nervioso Central
TNF	Factor de Necrosis Tumoral (Tumoral Necrosis Factor)
USVs	Vocalizaciones Ultrasónicas (Ultrasonic Vocalizations)

RESUMEN

Antecedentes. El hacinamiento y el ruido son factores sociales estresantes en algunas especies al activar el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA). La elevación de glucocorticoides durante este estrés crónico, afecta la población celular del hipocampo de roedores, particularmente la región CA1 y el giro dentado, así como también la memoria espacial y conducta exploratoria. Sin embargo; se desconocen los efectos que producen el hacinamiento y ruido sobre estas funciones cognitivas y los mecanismos de la posible muerte celular hipocampal, especialmente en individuos jóvenes. **Materiales y métodos.** 4 grupos (n=13) de ratas Swiss-Wistar machos recién destetados (21 días), fueron expuestas a cuatro condiciones (una condición por grupo) durante 10 días: control (C), hacinamiento de 45 cm²/rata (H), ruido de ultrafrecuencia de 22 kHz a 80-90 dB (R) y hacinamiento más ruido ultrasónico (HR). El nivel de estrés se evaluó indirectamente con los registros somatométricos de peso y longitud, y directamente con la concentración de corticosterona urinaria. Se evaluó la conducta exploratoria en campo de agujeros y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris. De los cerebros incluidos en parafina se realizaron cortes coronales de 10 µm para doble marcaje inmunocitoquímico con anexina y anticuerpo anti NeuN, en la región CA1 y giro dentado (DG) del hipocampo. Allí se cuantificó el índice de neuronas en apoptosis/campo (739 µm²). **Resultados.** Al final del experimento a los 32 días de edad, el incremento inicial de corticosterona (ng/ul) de todos los grupos estresados, estaba diferenciado: *Media±SE* (C:20.09±2.99; H: 35.88±2.33; R: 55.82±2.26; HR: 45.73±2.39). H desarrolló habituación, R se mantuvo constante el incremento con tendencia a aumentar, y en HR la elevación inicial disminuyó lentamente. Para el día 32 todos los grupos experimentales mostraron disminución del peso en gramos (C: 71.35±0.57; H: 63.50±1.10; R: 64.51±1.22; HR: 66.34±1.25), y talla en centímetros (C: 15.66±0.08; H: 14.75± 0.15; R: 14.97±0.11; HR: 14.12±0.12). Solamente en R resultó un mayor índice de neuronas apoptóticas en CA1 (C: 0.65±0.08; H: 1.03±0.09; R: 1.19±0.14; HR: 0.90±0.13) y en DG (C: 0.09±0.02; H: 0.15±0.03; R: 0.22±0.02; HR: 0.15±0.02). La ejecución en el laberinto de Morris fue menos efectiva para los grupos estresados, tanto en la fase de entrenamiento como lo muestra el tiempo de latencia de escape del último ensayo (C: 29.90±2.48; H: 52.90±4.77; R: 57.12±1.57; HR: 59.00±1.20), como en la de prueba, evidenciado por el tiempo en el cuadrante de la plataforma (C: 28.54±2.61; H: 15.50±1.16; R: 15.62±1.66; HR: 12.37±1.25). Además, los grupos estresados mostraron menores tiempos de exploración central (C: 8.42±0.69; H: 3.35±0.83; R: 3.10±0.56; HR: 3.84±0.72) y mayor tiempo de movilidad en el campo de agujeros (C: 491.92±31.65; H: 671.00±40.78; R: 795.80±17.32; HR: 698.30±36.6304). **Conclusiones.** Los niveles de glucocorticoides sufrieron cursos distintos luego de un incremento inicial general, y muestran que el estrés de características sociales puede alterar la actividad del eje HPA. Las condiciones estresantes produjeron retraso en el desarrollo corporal, déficit en la memoria espacial y alteraciones en los patrones de exploración (incremento en la ansiedad y excitabilidad) por igual en todos los grupos experimentales. El ruido fue la única condición estresante que evidenció un mayor índice de apoptosis neuronal, tal vez en relación a su carácter unimodal e inescapable. Los cambios comportamentales parecen estar más relacionados con las condiciones hormonales que celulares, aunque tal vez no se deban únicamente a este fenómeno. Se sugiere el uso de modelos animales de estrés social para generar respuestas fisiológicas análogas a las observadas en los humanos.

ABSTRACT

Background. Overcrowding and noise are social stressors for some species. They activate hipotalamus pituitary adreanal axis (HPA). Glucocorticoids incrementing in chronic stress have impact on cellular population in rodents hippocampus CA1 and dentate gyrus (DG), affecting spatial memory and exploratory behavior. However effects of overcrowding and noise on these cognitive functions and their possible cell death mechanisms are unknown, especially in young individuals. **Materials and methods.** 4 groups (n=13) of 21 days age male Swiss-Wistar rats, were exposed to four conditions (one per group) for 10 days: control (C), overcrowding of 45 cm²/rat (H), ultra frequency noise of 22 kHz and 80-90 dB (R) y overcrowding plus ultrasonic noise (HR). Stress level was evaluated indirectly with somatometric measures and directly with urinary corticosterone concentration. Exploratory behavior was evaluated with Hole Board test, and spatial memory with Morris Water Maze. From parafine included brains, 10 μm slices were obtained for double immunocytochemical staining with Annexin and Neun. In hippocampus CA1 and DG neuronal apoptosis index was measured. **Results.** At 32 days age, initial corticosterone increment of all stressed groups had differentiated: *Mean±SE* (C:20.09±2.99; H: 35.88±2.33; R: 55.82±2.26; HR: 45.73±2.39). H habituated, R was constant with its initial raise and showed tendency to increase, and in HR initial raise slowly went down. For day 32 all experimental groups showed decrement in weight (grams) (C: 71.35±0.57; H: 63.50±1.10; R: 64.51±1.22; HR: 66.34±1.25), and size (centimeters) (C: 15.66±0.08; H: 14.75± 0.15; R: 14.97±0.11; HR: 14.12±0.12). Only R showed a bigger apoptosis index in CA1 (C: 0.65±0.08; H: 1.03±0.09; R: 1.19±0.14; HR: 0.90±0.13) and DG (C: 0.09±0.02; H: 0.15±0.03; R: 0.22±0.02; HR: 0.15±0.02). Performance in Morris maze was impaired in stressed groups during training as showed by escape latency time from last rehearsal (C: 29.90±2.48; H: 52.90±4.77; R: 57.12±1.57; HR: 59.00±1.20), as well as in test, showed by time in correct quadrant (C: 28.54±2.61; H: 15.50±1.16; R: 15.62±1.66; HR: 12.37±1.25). Stressed groups also showed lower time of central exploration (C: 8.42±0.69; H: 3.35±0.83; R: 3.10±0.56; HR: 3.84±0.72) and higher time of mobility in Hole Board Test (C: 491.92±31.65; H: 671.00±40.78; R: 795.80±17.32; HR: 698.30±36.6304). **Conclutions.** Glucocorticoids level had different courses alter a general inicial raise, and show that social stress can alter HPA activity. Stress conditions generated retardation in corporal development, impairment in spatial memory and exploratory behavior alterations (elevated anxiety and excitability) in all experimental groups. Noise was the only stimulus that showed an increased apoptosis index. Maybe this was related to its unimodal and inescapable characteristics. Behavioral changes may be related to hormonal conditions and not to cellular death, although perhaps are not due solely to this phenomenon. Social stress animal models are suggested in order to generate physiological responses analog to those observed in humans.

INTRODUCCIÓN

Las hormonas pueden agudizar el daño sobre las neuronas o protegerlas, específicamente los glucocorticoides (GCs) secretados durante la respuesta al estrés pueden llegar a producir efectos neurotóxicos (Smith y cols., 1995). Eventos sociales como el hacinamiento, vocalizaciones ultrasónicas (USV's), derrota social, presencia de individuos dominantes, y separación de madre y crías pueden producir estrés acompañado por incremento en los glucocorticoides y efectos nocivos celulares en el sistema nervioso (SN) de los organismos expuestos, tales como la neurogénesis, plasticidad neuronal y apoptosis, que son causa de deterioro cognoscitivo. Estos trastornos son más severos cuando suceden en etapas tempranas del desarrollo ontogénico (Greene y cols., 2001) y posteriormente se manifiestan por anomalías conductuales como alteraciones de la memoria espacial y conducta exploratoria, entre otras (McEwen, 2000; Raber, 1998).

Respuesta de estrés.

El estrés es un estado de disarmonía o de homeostasis amenazada, provocado por un evento ambiental o biológico, que produce efectos sobre el SNC y el sistema inmune, al activar un circuito bidireccional entre ambos, a través del eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal (HPA) y su retroalimentación (Black, 1995), por lo que resulta un circuito reverberante, cuyas consecuencias pueden pasar de lo fisiológico a lo patológico cuando la activación es excesiva (Angelucci, 2000). Las alteraciones en etapas tempranas pueden reducir la capacidad de respuesta de este sistema en la vida adulta (Mc Ewen, 2000).

La estimulación aversiva (innata o aprendida) es integrada sensorialmente a nivel del tálamo, y la evaluación límbica induce la secreción de hormona liberadora de la corticotropina (CRH) en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo. En la glándula pituitaria la CRH estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que a través de la sangre alcanza la corteza de las glándulas adrenales, y ellas liberan una hormona corticosteroide de tipo glucocorticoide o mineralocorticoide (Rosenweig y Leinman 1992; de Kloet, 2000). Ésta se puede autorregular a través de un sistema de retroalimentación negativa (Harbuz y col, 1999).

Una liberación elevada del glucocorticoide corticosterona (CORT) en ratas, o de cortisol en humanos se utiliza tradicionalmente en la literatura como criterio de medición del estrés (Black, 1995). Estas hormonas median sus efectos a través de sus mineralo-receptores tipo I (MRs) y gluco-receptores tipo II (GRs) (de Kloet, 2000).

Efectos de los glucocorticoides en el sistema nervioso.

Los efectos de glucocorticoides son muy variados en el sistema nervioso, según si la exposición es aguda o crónica, y la etapa del desarrollo cuando esta sucede. Resulta particularmente afectado el sistema límbico, especialmente el hipocampo (McEwen y cols., 1968), alterándose consecuentemente funciones como el aprendizaje y la memoria. Algunos de estos efectos pueden revertirse al retirar los corticoesteroides, pero otros no (Cameron y McKay, 1999).

En general; el estrés agudo favorece funciones cognoscitivas como la atención, memoria y aprendizaje, sin dañar las neuronas (Raber, 1998). Así se facilita el enfrentamiento del estímulo estresante agudo, la adaptación comportamental y preparación para futuras situaciones similares (de Kloet, 2000). A nivel

comportamental, el efecto agudo de los glucocorticoides es excitatorio y tiene una importancia adaptativa, ya que promueve la reactividad conductual, es decir, eleva los niveles de actividad del organismo para incrementar la variabilidad de respuestas en espera que alguna lleve al enfrentamiento o evitación del estímulo estresante.

Por otra parte, el estrés crónico conlleva a efectos perjudiciales como daño neuronal o déficit de aprendizaje y memoria (de Kloet, 2000), y conductualmente inhibe comportamientos como la agresión, conducta sexual y exploración, y puede generar ansiedad y depresión (Haller y cols., 1998). A pesar del patrón crónico, en ocasiones puede existir un control espontáneo de los cambios hormonales (Spehner y cols., 1996), o bien una habituación fisiológica de los individuos que normaliza los niveles de corticosterona (Kant y cols., 1987).

Los efectos del estrés sobre el organismo dependen también de la etapa del desarrollo en la que sucede, el estrés crónico en etapas tempranas del desarrollo provoca daños cerebrales más severos, que la exposición durante la vida adulta y tales excesos en etapas tempranas pueden alterar la capacidad del sistema para responder en la adultez (Huot y cols., 2002). De hecho, el incremento de glucocorticoides en etapas tempranas del desarrollo se encuentra más relacionado con daños en la estructura y organización del cerebro, que la exposición a los mismos niveles en otras etapas (McEwen, 2000).

Dada la plasticidad ontogénica del hipocampo, las variaciones en la experiencia social temprana también tienen efectos profundos en el comportamiento adulto, como actividad locomotora y conducta exploratoria, así como en la morfología y neuroquímica cerebrales, en una gran variedad de especies (Greene y cols, 2001).

Estrés social.

Muchos experimentos han tratado de reproducir las reacciones frente al estrés, mediante la aplicación exógena de las hormonas relacionadas, sin embargo no basta la simple administración de una hormona glucocorticoide para igualar la complejidad de la respuesta fisiológica frente al estrés; y resultaría mejor generar la respuesta endógena, aunque no siempre ésta conduce a daños en el hipocampo (Angelucci, 2000).

La respuesta de estrés caracterizada por secreción endógena de glucocorticoides puede suceder ante diversos estímulos. Hans Selyé demostró experimentalmente que una gran variedad de factores pueden generar lo que el llamó -síndrome de adaptación general, entre ellos; agentes tóxicos o infecciosos, traumatismos o eventos emocionales.

La reacción de los organismos ante estos estímulos resulta general e inespecífica (De la Fuente, 1992). Sin embargo, conductualmente algunos de los acontecimientos estresantes son más manejables que otros, y la oportunidad de enfrentarlos disminuye sus efectos nocivos sobre el organismo (Young, 1973).

Bajo condiciones naturales, rara vez un organismo enfrenta eventos estresantes como el frío extremo, movimientos de nado forzados, inmovilización o choques eléctricos, -entre algunas de las situaciones extremas utilizadas artificialmente para provocar estrés experimental. Por lo contrario, constantemente se encuentra expuesto a relaciones de dominio y sumisión, separación materna, confrontaciones y peleas con miembros de su especie etc. Por esta razón, los eventos sociales al parecer tienen un significado biológico mucho más importante y semejan mejor la etiología del estrés humano (Henry y cols., 1993).

En los humanos, el estrés social comprende todas aquellas situaciones y estados psicológicos como conflictos, frustraciones, pérdidas o amenazas que pueden activar emociones y producir cambios fisiológicos. Esta forma de estrés puede ser tan dañina como las temperaturas extremas, los microorganismos patógenos y los traumatismos físicos. Sus efectos sobre la salud dependen de la capacidad del organismo para enfrentar la situación (De la Fuente, 1992).

Así pues; una gran variedad de estímulos producen estrés, pero son especialmente relevantes aquellos generados por la misma especie, ya que necesariamente están presentes en la ontogenia y filogenia de cada individuo, en particular si la exposición es crónica.

Sin embargo, los efectos de la respuesta fisiológica de estrés social deben ser analizados mucho más cuidadosamente, porque puede tratarse de cambios más sutiles. De hecho, algunos autores sugieren que el estrés social se diferencia fisiológicamente de los demás ya que por ejemplo, han observado una reacción noradrenérgica exacerbada en situaciones que involucran una gran actividad física en la respuesta al evento estresante, mientras que; en las reacciones al estrés psicológico se incrementa la adrenalina (Koolhaas y cols., 1997), aunque en ambas condiciones sucede incremento de corticosteroides.

Otros autores, argumentan que la información acerca de los estímulos estresantes físicos como hipoxia, frío, o exposición al éter, está relacionada con el núcleo paraventricular por vías ascendentes viscerales y somatosensoriales, mientras que los efectos del estrés emocional (derrota social, o inmovilización, se

relacionan más con procesamientos cognoscitivos a través de estructuras límbicas y dependen en gran medida del hipocampo (Steckler, 2001).

Los humanos forman parte de comunidades que generan estimulación social estresante, la organización comunitaria socioeconómica regula el comportamiento social e influye sobre el ambiente familiar, es en este tejido social que la gente construye sus vidas y experimenta diferentes grados de éxito, fracaso y frustración (McEwen, 2001).

A través de la activación del eje HPA el estrés social puede llegar a producir consecuencias severas en el organismo, especialmente durante etapas tempranas del desarrollo posnatal. Por ejemplo, los efectos psicosociales y económicos tienen impacto en el desarrollo corporal y talla de las personas, así; el retardo en el crecimiento sugiere la existencia de estrés psicosocial causado por un conflicto familiar, para comprender las causas de éste es necesario realizar más estudios que proporcionen información acerca de los procesos a través de los cuales se incrementan los riesgos para la salud, a través de la vida de aquellos individuos con experiencias aversivas en la infancia. Al considerar que el crecimiento refleja la actividad metabólica subyacente, su retraso permitirá identificar la existencia de procesos que son en sí mismos potencialmente dañinos para la salud mental y fisiológica futura (Montgomery y cols., 1997).

Al respecto, antes de que los niños alcancen 7 años, su crecimiento lento indica significativamente que puede existir conflicto familiar, hacinamiento y dificultades relacionadas con un bajo estrato social, es posible que tales influencias tengan un efecto sobre el desarrollo físico y emocional, que a su vez tenga impacto sobre la salud y el comportamiento social de esos niños, cuando sean adultos (Montgomery y

cols., 1997). Los corticosteroides se relacionan ampliamente con el desarrollo por su interacción con procesos apoptóticos y de reproducción celular (Reagan y McEwen, 1997). Igualmente, las condiciones estresantes a través de estas hormonas generan procesos anoréxicos, glucolíticos, gluogenolíticos, gluconeogénicos y lipolíticos que contribuyen al catabolismo celular.

El estrés crónico infantil generado en las familias disfuncionales está asociado al lento crecimiento, y puede provocar deterioro en las habilidades cognitivas futuras (Uno y cols., 1989). Si los niños estresados sufren daño hipocampal, entonces también resultarán alteraciones de sus habilidades cognitivas, en la medida que el hipocampo participa para el aprendizaje y la memoria (Meaney y cols., 1988).

Los efectos remanentes del estrés se evidencian también en la incapacidad del niño de estructurar una respuesta fisiológica, neuroendocrina y comportamental adecuada frente a situaciones de estrés (Repetti y cols., 2002). Estudios recientes en humanos, sugieren que aquellas personas que responden débilmente pueden ser más susceptibles a trastornos autoinmunes (Sternberg y cols., 1989), mientras que aquellos que sobre-reaccionan tienen una mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas (Mason, 1991).

La respuesta adrenocortical del estrés se condiciona a factores psicosociales que están desigualmente distribuidos entre las clases sociales. Las mayores reacciones se derivan del fracaso real o proyectado, de enfrentar las amenazas (Brunner, 1997).

En resumen, las diferentes actividades de las comunidades pueden generar múltiples situaciones en las cuales tenga lugar la respuesta fisiológica y conductual del estrés. Esta respuesta puede afectar una gran cantidad de fenómenos comportamentales y cognoscitivos.

Efecto del estrés sobre las funciones hipocampales.

Alteraciones sobre memoria y aprendizaje.

El aumento inducido de corticosteroides produce déficit de aprendizaje y memoria (de Kloet y cols, 1999). Aprendizaje es el proceso por el cual se adquiere conocimiento acerca del entorno, mientras que; la memoria es el proceso por el cual este conocimiento es codificado, almacenado y posteriormente evocado (Kandel y Hawkins, 1992; Kandel y cols. 2000). Sin embargo, no es posible considerar el aprendizaje sin la memoria, o viceversa (Agranoff y Uhler, 1994).

En general se considera que existe la memoria a corto plazo, la memoria de trabajo y la memoria a largo plazo (Klein, 1992). Básicamente, se distinguen dos tipos diferentes de memoria a largo plazo, la implícita y explícita. La memoria implícita o no declarativa, involucra tareas aprendidas que tienden a ser reflexivas mas que reflectivas, e involucra hábitos y habilidades perceptivas o motoras, no requiere de conciencia o procesos cognoscitivos complejos como la comparación y la evaluación, -se refiere al cómo ejecutar algo (Squire,1992).

La memoria explícita o declarativa, se relaciona con el conocimiento de personas, lugares y cosas y lo que éstos significan, pero estos recuerdos necesitan de un esfuerzo conciente y deliberado (Kandel y cols. 2000; Squire,1992). Esta memoria ha sido dividida además en episódica; relacionada con eventos y experiencias personales; y semántica, o memoria de hechos (Tulving, 1990). En los

vertebrados, las funciones de la memoria explícita se basan principalmente en estructuras del lóbulo temporal (Kandel y Hawkins, 1992).

En modelos animales y en los humanos el estrés produce alteraciones del hipocampo y déficit en la memoria, dependientes de su intensidad y duración (Keenan y cols., 1995; Lupien y McEwen, 1997). Los corticosteroides son responsables de esta relación, ya que a través de ellos; los eventos estresantes generan modificaciones sobre la estructura y funcionalidad del hipocampo, como cambios en la zona CA3 que impiden el aprendizaje (Brown, y cols., 1999).

Al respecto; se ha sugerido que los eventos bioquímicos relacionados con la memoria están regulados por mecanismos hormonales y neurohumorales asociados con estrés y ansiedad (Silva y Frussa-Filho, 2000). En otros trabajos se ha descrito que la corticotropina y glucocorticoides facilitan la memoria a dosis bajas, pero la impiden a dosis altas (McGaugh y cols, 1995), en estudios con resonancia magnética de pacientes psiquiátricos y seniles en los que existen anomalías de corticosteroides se ha observado atrofia selectiva del hipocampo, acompañada por déficit en la memoria declarativa, espacial y contextual. (McEwen, 2000).

El lóbulo temporal está estrechamente relacionado con la memoria explícita, como ha sido demostrado a través de estudios con lesiones cerebrales en diferentes especies, el daño al hipocampo o áreas de asociación polimodal en la corteza temporal vinculadas con éste (corteza perirrinal y parahipocampal), dificulta la memoria explícita (Kandel y Hawkins, 1992). Al parecer, el conocimiento almacenado como memoria explícita se adquiere primero a través del procesamiento de una o más de las cortezas polimodales de asociación (prefrontal, límbica y parieto-occipital-temporal), que sintetizan la información de los diferentes canales sensoriales.

De estas cortezas la información es llevada en serie a las cortezas parahipocampal y perirrinal, luego a la corteza entorrinal, al giro dentado (DG) del hipocampo por la vía perforante, a la zona CA3 por las fibras musgosas que se comunican con CA1 por las colaterales de Schaffer, de ahí al subículo, y finalmente de vuelta a la corteza entorrinal. De la corteza entorrinal, la información es enviada de vuelta a las cortezas parahipocampal y perirrinal y finalmente a las áreas de asociación polimodal de la neocorteza. De esta manera, la corteza entorrinal tiene una doble función, pues constituye la principal fuente de aferencias y eferencias del hipocampo (Kandel y cols. 2000), ver fig. 1.

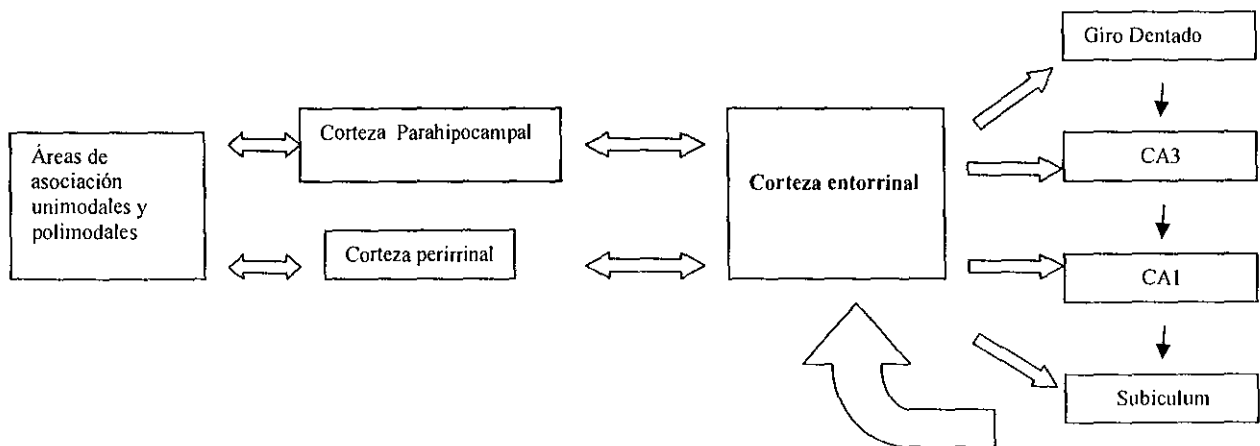


Fig. 1. Diagrama de flujo de las vías de integración en el lóbulo temporal.

Las diferentes regiones del lóbulo temporal medial no tienen exactamente las mismas funciones en la memoria explícita, sino que la formación hipocampal y las cortezas perialocorticales muestran cierto grado de especialización. La corteza perirrinal, parahipocampal y entorrinal, controlan el almacenamiento de la memoria de objeto, mientras que el hipocampo puede ser más importante para la representación del espacio (Jaffard y Meunier, 1993).

Evidencia de esto es que, las lesiones localizadas en hipocampo afectan poco las tareas de no igualdad en ratas, y lesiones químicas del fórnix, CA1 y el DG se han relacionado incluso con un mejoramiento en la ejecución durante la adquisición inicial de tareas visotáctiles de no igualdad (Sutherland and McDonald, 1990). Por otra parte, las mismas lesiones si interfieren con la memoria de los sujetos, en cuanto al espacio y el contexto, pues células individuales en el hipocampo codifican información espacial (Kandel y cols. 2000).

Ratas con lesión hipocámpal tienen impedimentos en el uso de claves espaciales de su medio ambiente para recordar lugares particulares (Jarrad, 1993). La evidencia de la sobreposición de funciones puede surgir porque al tratar de lesionar una se daña la otra, cuando existe de hecho una separación topográfica en los aferentes al hipocampo en la corteza peririnal y parahipocámpal, y puede ser que ellas sean capaces de encargarse de la memoria dentro de estas áreas separadas, mientras que la convergencia final se lleva a cabo en el área CA3 (Rolls, 2000).

El hipocampo puede ser una forma antigua de la corteza de asociación superior, como no hay equivalentes de las regiones superiores de asociación del neocórtex en la rata, las representaciones neuronales formadas en el hipocampo de los roedores pueden ser el correlato más próximo a las funciones superiores integradoras de memoria en el humano (Wolf, 1996).

El hipocampo está involucrado en la memoria y el aprendizaje episódico, declarativo, contextual y espacial, además de cumplir con el control de funciones autonómicas y vegetativas (Eichenbaum y col, 1992; Jacobson y Sapolsky, 1991, Philips y Le Doux, 1992).

Así; el hipocampo contiene un mapa cognoscitivo espacial del ambiente en el que un animal se mueve, la localización de un animal en un espacio particular es codificada en los patrones de disparo de células piramidales individuales, las mismas que sufren de Potenciación a Largo Plazo (LTP) cuando sus vías aferentes son estimuladas eléctricamente (O'keefe y Dostrovsky, 1971; O'Keefe, 1990, 1991). Cada una de estas células piramidales es una célula de lugar, que codifica una posición en el espacio.

Cuando el animal se mueve diferentes células disparan, al entrar a un nuevo ambiente se forman nuevos campos de lugar en pocos minutos y se mantienen estables durante semanas o meses. Las mismas células piramidales pueden señalar información de diferentes ambientes, y por lo tanto pueden utilizarse en más de un mapa espacial (Kubie y Muller, 1991).

De esta manera, existe información a partir de la respuesta de muchas células acerca del lugar donde se encuentra la rata en su medio ambiente, pues las células granulares del DG y las células piramidales de CA3 y CA1 responden a combinaciones de las aferencias recibidas (Rolls, 2000). Por esta razón, se define al hipocampo como un mapa espacial cognoscitivo, que puede realizar operaciones espaciales para ejecutar la navegación a través del medio ambiente (O'Keefe y Nadel, 1978; Burgess y cols, 1994), que en las ratas constituye una analogía clara del sistema de memoria episódica (Rolls, 2000), a través de una sencilla red de auto-asociación en CA3 (Marr, 1971).

Las sinapsis hipocampales muestran cambios asociados a la consolidación, más que al almacenamiento de información espacial, pueden suceder modificaciones presinápticas en la liberación del transmisor contenido de las vesículas, cambios en

la translocación, fusión o cinética, e influjo de calcio; así como alteraciones postsinápticas en la densidad y distribución de los receptores. También es posible que sucedan cambios en los patrones de activación de sistemas enzimáticos intracelulares, y la expresión genética para la síntesis de proteínas (Andersen y Trommald, 1995)

Alteraciones sobre la conducta exploratoria.

La motivación para explorar ambientes ha sido otra de las consecuencias de la alteración del eje HPA y del hipocampo, los receptores tipo I o MRs están relacionados con el comportamiento exploratorio de nuevos ambientes y la conducta en laberintos acuáticos, y los receptores tipo II están relacionados con efectos en la consolidación y retención del comportamiento aprendido (Oitzl, Fluttert y de Kloet, 1994). Además, el deterioro del funcionamiento hipocampal, reduce el aprendizaje, la memoria espacial y la habilidad para explorar adecuadamente el ambiente (Raber, 1998).

El hipocampo juega un papel importante en las respuestas ante estímulos novedosos, al afectarse se reduce la tendencia del animal a explorar flexiblemente su ambiente, y perseveran comportamientos previamente adquiridos debido a incapacidad para reaccionar a estímulos, ya que los MRs están relacionados con el proceso de selección de respuesta, y por tanto determinan el patrón de conducta generado por un nuevo ambiente.

Aunque Harris y Cols, (1997) no observaron cambios en el patrón de exploración o motivación de ratas adultas expuestas a estrés crónico de intensidad media, en una prueba de campo abierto, Oitzl y de Kloet (1992) observaron que niveles disminuidos de CORT provocan un mayor recorrido de la zona central de un

ambiente novedoso y un mayor tiempo de permanencia en la misma, mientras que niveles normales de CORT (ocupación de MRs) resultan en menores niveles de este patrón de exploración.

Sin embargo, un exceso de CORT (ocupación de MRs y GRs) los vuelve a incrementar. Al bloquearse los MRs, vuelve a presentarse una baja conducta exploratoria central. En esta prueba, el bloqueo de GRs no tuvo efectos significativos sobre el patrón de exploración, tampoco impidió la consolidación de la información espacial, ni la adquisición y evocación de la información aprendida, en cambio; el bloqueo de MRs produce un patrón de búsqueda alterado, al parecer la función de MRs está involucrada con la elección de la respuesta comportamental.

El bloqueo de ambos tipos de receptores produjo alteración de la navegación para aprendizaje de lugar (Oitzl y de Kloet, 1992). En general, los estudios al respecto sugieren que los glucocorticoides a través de sus receptores MR tienen una gran influencia sobre la conducta exploratoria ante eventos novedosos (de Kloet y cols., 2000).

Desarrollo ontogénico del hipocampo.

Cómo se mencionó anteriormente, los efectos cerebrales de los corticosteroides en el cerebro varían mucho con la edad. En la rata se completa la maduración cerebral durante la vida postnatal.

En el hipocampo de la rata recién nacida ya está completo un grupo de células piramidales, y el neuropilo de CA1 muestra un desarrollo postnatal considerable; de manera que, entre la primera y segunda semana postnatales están completos los prerrequisitos para la transmisión sináptica. Sin embargo, electrofisiológicamente el

hipocampo no se encuentra maduro (Greene y col, 2001). Más del 85% de la neurogénesis de las células granulares ocurre postnatalmente en la ratas y tiene su pico en el día postnatal (PN) 5-7, pero el número total de células continúa incrementándose durante el primer año de vida (Bayer y cols., 1982).

La mayoría de las neuronas granulares hipocampales se desarrollan y extienden sus axones (las fibras musgosas) para inervar las neuronas piramidales del CA3 entre PN1 y PN21 (Amaral y Dent, 1981). Los periodos predominantes de desarrollo dendrítico y sináptico hipocampal, tienen lugar entre los días 4-12 y 11-25 respectivamente (Fricke y Cowan, 1977).

El período cumbre de la neurogénesis y crecimiento de las fibras musgosas se superpone con un periodo de hiporreactividad al estrés alrededor del día PN 14 caracterizado por bajos niveles basales y de reacción de corticosterona (Walter y cols., 1986). Es probable que este periodo proteja al cerebro de los efectos catabólicos de los glucocorticoides durante una etapa crítica del desarrollo (Gould y cols., 1991).

La diferenciación postnatal de las neuronas granulares del DG se asocia con una gran elevación de GAP-43, una proteína que parece estimular el crecimiento de las fibras musgosas y la sinaptogénesis. Tales procesos son controlados negativamente por los glucocorticoides (Chao y McEwen, 1994). De esta manera, los glucocorticoides pueden afectar el desarrollo hipocampal al influenciar de manera directa o indirecta el balance de la neurogénesis y la apoptosis en muchas especies (Gould y cols., 1991).

Durante los primeros 19 días PN, los disparos de la población neuronal de CA1 muestran un incremento gradual que disminuye notablemente entre el día PN19 y PN22, posiblemente por mecanismos de desconexión o apoptosis (Kudryashov y Kudryashova, 2001). Además, Greene y cols. (2001) encontraron una menor amplitud de los potenciales de acción y un mayor umbral de disparo en neuronas hipocampales de ratas recién destetadas sometidas a aislamiento, lo que puede contribuir a reducir la eficiencia del flujo de información de la formación hipocampal, al parecer relacionada con las vías serotoninérgicas.

De hecho, son bastante evidentes los efectos regulatorios de las vías serotoninérgicas, sobre la modulación colinérgica que recibe el hipocampo. La privación crónica de triptofano decrementó la densidad de espinas dendríticas en la zona CA1 (Pérez-Vega y col., 1998), y redujo la eficacia en pruebas de memoria de trabajo (González-Burgos y cols., 1998) y aprendizaje de lugar (Olvera-Cortés y cols., 1998) en ratas.

En resumen, el desarrollo del hipocampo está casi completo en la edad del destete, sin embargo existe evidencia de que varios procesos complejos continúan llevándose a cabo en el cerebro de las ratas destetadas. Así; los corticosteroides pueden provocar alteraciones celulares en varios tejidos a través del desarrollo ontogenético, sin embargo estas alteraciones son especialmente importantes en la infancia y pueden suceder mediante diferentes mecanismos fisiológicos, con implicaciones de severidad variable, según el caso.

Mecanismos de daño por glucocorticoides.*Papel de los receptores a glucocorticoides.*

Los receptores tipo I y II traducen al genoma las señales provenientes de un amplio rango de variaciones en la concentración de hormonas glucocorticoides, tanto en condiciones fisiológicas, como por respuesta a estrés (Reul y cols., 2000), estos receptores poseen diferentes características y distribución.

Los tipo I o MRs son de alta afinidad, constituyen la mayoría de los receptores en el hipocampo y regulan la secreción de corticosteroides por retroalimentación negativa, operan de un modo proactivo, al determinar la sensibilidad del sistema de respuesta de estrés, y están relacionados con el comportamiento ansioso, exploratorio de nuevos ambientes y la conducta de escape en laberintos acuáticos, donde se encuentran plataformas escondidas (Reul y deKloet, 1986; Oitzl, Fluttert y deKloet, 1994; Reul y col, 2000; deKloet y cols, 2000). Además, están relacionados con los procesos de neurotransmisión serotoninérgica. (Joëls y col, 1991; Meijer y de Kloet, 1998) y con propiedades antiapoptóticas de las neuronas granulares del DG. (Almeida y col, 2000).

Los receptores tipo II son de baja afinidad y se encuentran principalmente en el hipocampo, NPV y pituitaria. Estos receptores son activados principalmente al incrementarse los niveles de glucocorticoides, y generan una respuesta de retroalimentación desde estas zonas, ellos facilitan la recuperación tras estrés y están relacionados con efectos en la consolidación y retención del comportamiento aprendido (Reul y deKloet, 1986; Oitzl, Fluttert y deKloet, 1994; Reul y col, 2000; deKloet y col, 2000).

En el hipocampo, ambos tipos de receptores I y II, pueden afectar su funcionamiento a nivel de excitabilidad neuronal, neuroquímica y plasticidad estructural (de Kloet, 1998), los efectos de las hormonas esteroides sobre el hipocampo están especialmente influenciados por los aminoácidos excitatorios (EAA), los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) y la actividad serotoninérgica (McEwen, 2000).

Al parecer ambos tipos de receptores tienen una gran influencia sobre el eje HPA, cuya activación excesiva puede llegar a producir daño neuronal. Sin embargo, todavía no es claro si el estado de hiperactividad del eje HPA se debe a un incremento en la producción de CRH, que altera la función de ambos tipos de receptores, o si ocurre primero un defecto en ellos, que incrementa la secreción de CRH (Reul y col, 2000).

Hiperactividad del eje HPA inducida por glucocorticoides.

El estrés crónico a través de la hipersecreción de CRH y la disfunción de los receptores puede resultar en una deficiente retroalimentación negativa, y un incremento en los niveles de glucocorticoides circulantes, que conduce a un deterioro de las funciones del eje HPA, y alteraciones en el metabolismo de algunos neurotransmisores (Reul y col, 2000). Una manera de dañar el hipocampo a través de sus MRs y GRs de manera reversible o irreversible es, por la exposición a niveles altos de corticosteroides (McEwen y col, 1968; Lupien y McEwen, 1997).

Se ha propuesto la hipótesis de que; el daño hipocampal por el incremento en los niveles de corticoesteroides imposibilita el control de su secreción, así; el exceso de estas hormonas progresivamente produce un daño mayor para el hipocampo (Sapolsky 1985). De esta forma, resultan trastornos endocrinos, impedimentos

cognoscitivos y una mayor vulnerabilidad a futuros episodios de enfermedad, especialmente de tipo afectivo (Brown y cols., 1999).

Las acciones de los corticosteroides resultan patológicas cuando sale de control la activación de receptores MRs y GRs, y/o sucede un desequilibrio prolongado de las acciones conjuntas mediadas por los dos receptores (de Kloet y cols., 2000).

Neurotoxicidad inducida por glucocorticoides.

Los esteroides, al disminuir los niveles de glucosa en el hipocampo producen un déficit de energía que provoca disminución importante en las concentraciones de ATP y del funcionamiento mitocondrial durante las respuestas a diferentes tipos de daños. Consecuentemente se produce acumulo extracelular de glutamato y mayor concentración de calcio citosólico, que incrementan la actividad del eje HPA y agudizan la severidad de los eventos degenerativos calcio-dependientes, como proteólisis citoesquelética (Gabr y col, 1995; Smith y col, 1995; Raber, 1998). En este mecanismo es importante recalcar que los aminoácidos excitatorios relacionados con los GCs, intervienen en la muerte neuronal provocada por distintas condiciones (Lipton y Rosenberg, 1994).

Pueden suceder tres tipos de alteraciones en la formación hipocámpica, asociadas con incremento de esteroides adrenales. La primera, es la inhibición de neurogénesis en las neuronas granulares del DG (McEwen 1999; Gould y col, 2000) junto con efectos de los aminoácidos excitatorios (EAA), esta pérdida neuronal es mayor cuando el daño se produce al cerebro inmaduro (Lupien and McEwen, 1997).

La segunda relación entre plasticidad hipocampal y esteroides también sucede por la acción de aminoácidos excitatorios y receptores NMDA en una remodelación,

no necesariamente atrofica. El estrés repetido causa acortamiento y desramificación de las dendritas en la zona CA3 especialmente las apicales, -al parecer reversibles (McEwen, 1999; McEwen y Sapolsky, 1995; Magarinos y cols, 1999), en ratas estos cambios causan dificultad para el aprendizaje en tareas de memoria espacial y a corto plazo (McEwen, 1999; McEwen y Spolsky, 1995) y tareas de evitación (Bisagno y col, 2000).

Esta remodelación puede significar una estrategia protectora de las neuronas de la zona CA3, debido a que poseen numerosas ramificaciones de retroalimentación positiva (McEwen, 2000).

Un tercer tipo de efecto puede ser observado cuando los esteroides modulan de manera reversible y bifásica, la excitabilidad de neuronas hipocampales e influyen la magnitud de la potenciación a largo plazo, al igual que producen depresión a largo plazo (De Kloet, 1998; McEwen y Sapolsky, 1995)

Factores del sistema inmune asociados a glucocorticoides.

El estrés puede deprimir al sistema inmune, y éste a su vez influenciar el SNC al establecerse un circuito cerrado entre ambos (Bornstein, 2000). En la respuesta neuronal frente al estrés, en el eje HPA, suceden eventos similares a los de un sistema inmune activado, que trata de regularse (Black, 1995).

La relación entre corticosteroides y algunas citocinas puede afectar el neurodesarrollo, ya que estas permiten la comunicación entre el sistema inmune y el SN. La activación del eje HPA puede darse por la IL-1, IL-2, IL6, interferón gamma (IF γ) y el factor de necrosis tumoral alfa TNF α , a su vez estas citocinas son

influenciadas por la secreción de glucocorticoides (Ader y col, 1995). IL-1, IL-6 y el $TNF\alpha$ son capaces de regular el eje HPA a nivel central.

Por la estimulación de la CRH en la pituitaria, se establece un eje neuroinmunoendocrino en el que las citocinas mencionadas se encargan de este proceso estimulador, pero además algunas tienen un efecto estimulador directo sobre la producción de ACTH e inclusive de corticosteroides, al actuar directamente sobre la glándula (Besedovsky y del Rey, 1996; Chrousos, 1995).

En especial la IL-1, aunque no es neurotóxica por sí misma, exagera el daño cerebral isquémico o excitotóxico y, puede promover la apoptosis en neuronas cultivadas (Rothwell, 1996).

Además; algunas células implicadas en la respuesta inmune afectan la reproducción de células, el moldeamiento y la conectividad del sistema nervioso (Savino y Dardenne, 1995). También las hormonas neuroendocrinas tienen funciones para el desarrollo normal y la homeostasis de las redes neuronales, es decir; que la alteración de ambos sistemas puede tener consecuencias organizacionales ontogénicas (Merrill y Jonakait, 1995).

Apoptosis relacionada con los glucocorticoides.

La muerte celular programada o apoptosis es el mecanismo común para el recambio celular, involución y atrofia de tejidos, por ejemplo; disminución del número de linfocitos después de haberse desencadenado reacciones inmunes y eliminación de células inflamatorias. La apoptosis requiere la participación activa de las células que van a morir y no involucra un proceso inflamatorio, es esencial para el

funcionamiento normal y la supervivencia de la mayoría de los organismos multicelulares.

Se pueden diferenciar la apoptosis de la necrosis que resulta por daños y causa inflamación, la apoptosis, normalmente sucede durante el desarrollo y presenta características distintivas, se produce encogimiento de la célula, vesiculación de la membrana, condensación de la cromatina nuclear y fragmentación del DNA. Estos cambios contrastan con los que suceden durante la muerte celular por necrosis resultante de sustancias tóxicas, trauma e isquemia, -entre otras. En la necrosis, las células se hinchan y rompen con expulsión de organelos (Sastry y Rao, 2000).

Los primeros estudios sobre apoptosis mostraron fragmentación del DNA que seguía un patrón de escalera en la electroforesis (McConkey y col, 1998; Compton, 1992), sin embargo; ahora se ha visto que también es posible observar este patrón en la muerte por necrosis (Fukuda, 1993; Collins y cols., 1992). Por lo tanto, este hallazgo no es el mejor criterio para establecer que la muerte celular sucede por apoptosis, por esta razón es necesario realizar un análisis morfológico (Sastry y Rao, 2000).

Varios agentes inductores de apoptosis pueden ser: falta de soporte neurotrófico, neurotransmisores, neurotóxicos, moduladores de la fosforilación de proteínas y la homeostasis del calcio, daños del DNA, estrés oxidativo, óxido nítrico, y ceramidas (Sastry y Rao, 2000). Ciertos neurotransmisores son apoptóticos para las neuronas: la dopamina y algunos aminoácidos excitatorios como el glutamato y el kainato (Wang y cols, 1999).

Para explicar los efectos neuroexcitotóxicos del glutamato se han propuesto como implicados: el ingreso masivo de calcio al interior de la célula, la producción de

radicales libres y activación de caspasas (Sastry y Rao, 2000). Así mismo, la aplicación de algunos agonistas como el ácido kaínico ha producido apoptosis en el hipocampo y estriado. (Filipkowsky cols., 1994)

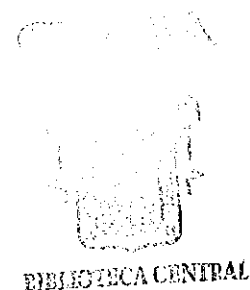
Sapolsky ha sugerido que la elevación de glucocorticoides puede iniciar apoptosis (Sapolsky, 1996) ya que los efectos combinados del estrés y de las hormonas esteroides ejercen un efecto regulatorio sobre la apoptosis de muchas células, a través de diferentes mecanismos (Anisman y cols. 1996). Los receptores de hormonas esteroides son controladores críticos de la apoptosis en muchos tejidos de mamíferos, incluyendo las glándulas mamarias, ovarios y testículos (Merino, 1999; Kiess y Gallea, 1998).

Además; el exceso de GCs incrementa los EAA y puede incrementar los niveles de calcio, y por lo tanto dañar las mitocondrias (Kannan y Jain, 2000; Yuan y Yankner, 2000). Estos procesos, vinculan el estrés con la muerte celular programada en el cerebro, ya que cuando la generación de especies de oxígeno reactivo por parte de las mitocondrias se ve incrementada, en situaciones como la presencia de iones de calcio, o cuando los mecanismos de defensa antioxidante se ven comprometidos, estas especies de oxígeno reactivo conllevan a daño irreversible del DNA mitocondrial, lípidos de la membrana y proteínas, lo que conlleva a una disfunción mitocondrial y finalmente muerte celular (Kowaltowski, y Vercesi, 1999).

La participación de los glucocorticoides ha sido evaluada en la muerte y neurogénesis de las células granulares del giro dentado, en el remodelamiento de las neuronas piramidales tanto en animales como en humanos y los mecanismos parecen encaminarse hacia una vía común que converge en la apoptosis (Reagan y McEwen, 1997).

Los efectos de la apoptosis por glucocorticoides dependen de muchos factores, y han sido mejor estudiados en eventos en los que este tipo de muerte celular depende de manera muy evidente de los cambios en dichas hormonas. Tales estudios incluyen el daño agudo isquémico, la neurotoxicidad, el envejecimiento y la aplicación exógena de las hormonas. En ellos cierta parte de la muerte neuronal es reversible y puede suceder ya sea por apoptosis, o por necrosis (Gould, 1991). Sin embargo, no han sido evaluados en profundidad los fenómenos apoptóticos en el SNC, como resultado de los incrementos fisiológicos de estas hormonas en el estrés social crónico.

Por último; las benzodiazepinas pueden contrarrestar las modificaciones neuroquímicas, comportamentales y hormonales inducidas por el estrés, los receptores para ellas se encuentran en la membrana externa mitocondrial y están relacionados con la regulación de los canales ionóforos que controlan la salida de algunos iones, y por lo tanto pueden ejercer efectos protectores sobre las mitocondrias. La respuesta de los PBR (peripheral benzodiazepine receptors) comúnmente se caracteriza por un incremento rápido ante estrés agudo, para ayudar a compensar los cambios que este ocasiona, pero un decremento ante el estrés crónico, (Salvetti y cols, 2000), esto último puede estar relacionado con la muerte mitocondrial, y el inicio de procesos apoptóticos.



ANTECEDENTES

La exposición crónica a glucocorticoides generados durante el estrés produce alteraciones en la memoria, aprendizaje y conducta exploratoria, a través de cambios dinámicos y plásticos en el hipocampo (McEwen y cols, 1998; Lupien y McEwen, 1997).

A nivel cognoscitivo se observa déficit del aprendizaje y la memoria (de Kloet y cols, 1999; de Kloet, 2000; McGaugh y cols, 1995) dependientes de la intensidad y duración del estrés (Keenan y cols., 1995; Lupien y McEwen, 1997), especialmente en la memoria declarativa, espacial y contextual (McEwen y Sapolsky, 1995; McEwen, 1999; McEwen, 2000; Raber, 1998). Conductualmente se inhiben comportamientos como la agresión, conducta sexual y exploración, acompañados por ansiedad y depresión (Haller y cols., 1998).

También se observan impedimentos en el uso de claves espaciales del medio ambiente para recordar lugares particulares (Jarrad, 1993), dificultad en tareas de evitación (Bisagno y cols., 2000), y deterioro en la habilidad para explorar adecuadamente el ambiente (Raber, 1998), caracterizado por un patrón de búsqueda alterado (Oitzl y de Kloet, 1992).

Estos cambios se relacionan con alteraciones a nivel celular en el hipocampo, en general se produce atrofia selectiva de éste (McEwen, 2000), por desramificación reversible de las dendritas apicales en la zona CA3 (Brown, y cols., 1999; McEwen, 1999; McEwen y Sapolsky, 1995; Magarinos y cols., 1999), proteólisis en el citoesqueleto de células hipocampales (Gabr y cols., 1995; Smith y cols., 1995; Raber, 1998), e inhibición de la neurogénesis en las neuronas granulares del giro dentado (DG), (McEwen, 1999; Gould y cols., 2000).

El volumen del DG disminuye por efecto del estrés crónico lo cual se relaciona con incapacidad de aprendizaje y memoria espacial (Ohl y Fuchs, 1999), mientras que su incremento está asociado con un mejor desempeño en tareas de memoria espacial (Kempermann y cols., 1997). También suceden cambios dinámicos en los neurotransmisores del hipocampo, afectando la modulación de la potenciación y depresión a largo plazo (de Kloet, 1998; McEwen y Sapolsky, 1995).

Algunos neurotransmisores como dopamina, glutamato y kainato son en parte, controlados por glucocorticoides, y tienen la capacidad de desencadenar apoptosis en las neuronas hipocampales (Wang y cols., 1999; Sapolsky, 1996).

Estos daños son más pronunciados en etapas tempranas del desarrollo (Greene y cols., 2001), pues se ha observado que la pérdida neuronal es superior cuando las condiciones adversas se producen en un cerebro inmaduro (Lupien y McEwen, 1997), y estas alteraciones provocan daños cerebrales más severos relacionados con la organización y estructura del cerebro, que la exposición durante la vida adulta, alterando la capacidad del sistema para responder en la adultez (Huot y cols., 2002; Mc Ewen, 2000).

Algunas de estas alteraciones pueden ser generadas por estrés social, ya que en la naturaleza, la mayoría de los estímulos estresantes en los individuos que forman comunidades provienen de organismos de su misma especie (Henry y cols., 1993). Por lo tanto es una situación muy común en humanos (McEwen, 2001; Montgomery y cols., 1997) y puede promover déficits cognoscitivos (Meaney y cols., 1988; Uno y cols., 1989), y dificultad para enfrentar situaciones futuras de estrés (Repetti y cols., 2002) si sucede durante la infancia.

Los modelos animales de estrés social se utilizan con relativa frecuencia y parecen ser una analogía mucho más válida de la respuesta de estrés humano (Henry y cols., 1993). Entre las situaciones más utilizadas se encuentran algunas condiciones perinatales como la deprivación y negligencia maternas (Coplan y cols., 1996; Liu y cols., 1997; Suomi y cols., 1997; Lyons y cols., 2001; Huot y cols., 2002).

Para provocar estrés en ratas también se usan las jerarquías sociales y enfrentamientos (McEwen, 2001; Fokkema y cols., 1995), de lo que resultan incrementos en la corticosterona (Meerlo y cols., 1999), hiperactividad del eje HPA (Ely y cols., 1997), supresión de la conducta exploratoria (Meerlo y cols., 1999) y remodelación de la zona CA3, que consiste en el acortamiento de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de esta área (McKittrick y cols., 2000). En perros (Kovach y cols., 2001) y monos (Manuck y cols., 1991; McCabe, 2000) también se han utilizado las relaciones jerárquicas para estudiar estrés.

El ruido y las vocalizaciones ultrasónicas (USVs) se han utilizado también para generar estrés en ratas (Blanchard y cols., 1991; Commissaris y cols., 2000). También se han evaluado las condiciones de alojamiento, como la mezcla de ratas machos y hembras (Klein y cols., 1992), el aislamiento y el hacinamiento en cerdos (Hessing y cols., 1993), ratones (Aioi, 2001), y ratas (Boranic y cols., 1982; Csermely y cols., 1995). Estos dos últimos factores; hacinamiento y ruido, son muy comunes en las culturas humanas.

El ruido ha sido ampliamente utilizado para inducir estrés en los animales y estudiar su comportamiento (Mollenauer y col, 1992). Sin embargo, este agente estresor resulta de gran importancia para estudiarlo por si mismo, debido a su impacto creciente en las actividades cotidianas de los seres humanos (Cohen y

Williamson, 1991). El estrés por ruido incrementa significativamente los niveles plasmáticos de corticosterona (Arcana y Navasivayam, 1999).

El incremento de los niveles de ACTH y corticosterona demuestra que la exposición crónica al ruido en intensidades medias induce cambios en la regulación hormonal (Van Raaij y col, 1997).

Los roedores ordinariamente emiten vocalizaciones ultrasónicas (USVs) en varias situaciones sociales (Sales, 1972), por ejemplo; las llamadas de crías ante aislamiento social o frío, alrededor de los 40 kHz; los chillidos de ratas adolescentes alrededor de los 50 kHz. en situaciones como el postcoito, agresión y juego; y ante situaciones aversivas se producen llamados de distrés alrededor de los 20 kHz. (Panksepp y Burgdorf, 2000), estos últimos son interpretados como mensajes de alarma, ya que se producen en presencia de un predador, cuando son expuestas ratas en conjunto, pero no cuando lo enfrentan solas (Blanchard y cols., 1991).

Estas señales generalmente son de larga duración, y en el rango de 18 a 27 kHz., al percibirse por otras ratas generan respuestas de defensa que varían incluso con la cepa del animal (Commissaris y col, 2000), la producción artificial de USVs desencadena en los roedores el mismo tipo de comportamientos defensivos (Beckett y cols, 1996), así; estas frecuencias se utilizan como un potente estímulo estresante.

El comportamiento de defensa de ratas expuestas a sonidos artificiales de 20 kHz es muy similar al inducido por estimulación química o eléctrica en la sustancia gris periacueductal y se caracteriza por carreras, saltos y congelamiento, estas respuestas pueden variarse con la intensidad del estímulo y también pueden modularse farmacológicamente (Savvas y cols, 2000).

Una gran parte del comportamiento defensivo de roedores está controlado por el sistema auditivo, ya que es uno de los sentidos más desarrollados para la supervivencia de estas especies. Entre las regiones que, estimuladas eléctricamente generan una respuesta de defensa, se encuentra el colículo superior (Savvas y col, 2000), el cual está estrechamente relacionado con la función auditiva.

Además, en el cerebro de ratas el colículo inferior también parece estar relacionado con la conducta de defensa, ya que la estimulación eléctrica o química del núcleo central del colículo inferior origina una gama de reacciones que incluyen incrementos en la locomoción, exaltación y saltos, así como incrementos en la presión sanguínea y frecuencia cardíaca. (Commissaris y col, 2000; Brandao y cols., 1994; Maisonette y cols., 1996).

Por otra parte, el tipo y cantidad de individuos con los que se convive, parece tener un fuerte impacto sobre las reacciones de estrés. La cohabitación de ratas machos con hembras incrementó la actividad del eje HPA, incluyendo un agrandamiento de las glándulas suprarrenales e involución del timo (Klein y cols., 1992).

Por otro lado, el estrés crónico generado por condiciones de alojamiento en cerdos (hacinamiento, inmovilidad y restricción de contactos sociales) se refleja en cambios a largo plazo en la regulación del sistema HPA como hipercortisolemia, el incremento en la capacidad de generar esteroides y la sensibilidad de las glándulas adrenales a la ACTH, CRF y vasopresina (Hessing y cols., 1993).

El hacinamiento es una variable muy importante en la investigación con modelos animales, ya que se presenta con mucha frecuencia en diferentes comunidades, y en humanos ha sido incluso relacionado como factor de riesgo para la esquizofrenia (Torrey y Yolken, 1998). Provoca decrementos notables de peso, e induce el crecimiento de las glándulas adrenales en ratones (Aioi, 2001).

En ratas, durante el hacinamiento se ha observado un incremento en los niveles de los neurotransmisores serotonina y noradrenalina (Boranic y cols., 1982), y aunque se requiere de un tiempo de hacinamiento considerable para desencadenar los efectos fisiológicos más poderosos, Csermely y cols. (1995) observaron como el hacinamiento durante tres meses incrementó la concentración intracelular de calcio, que puede conducir a muerte celular. Otros investigadores han utilizado el hacinamiento como variable generadora de estrés, ya sea sólo o combinado con privación del camaje, luz continua y temperatura elevada de 30 °C (Koopman y cols., 1989).

Finalmente, en un estudio a largo plazo de 8 a 14 meses se analizó la influencia del ruido y hacinamiento sobre el aprendizaje y la memoria de ratas, la estimulación estresante incrementó estas habilidades en sujetos de 10 a 12 meses de edad, sin embargo cuando los animales envejecieron mostraron deterioro de estas habilidades (Bubna-Littitz y col, 1981). Esto sugiere que los efectos combinados de estos dos tipos de factores estresantes tienen un efecto celular y comportamental que genera cambios relativamente permanentes en los individuos.

En las comunidades humanas actuales la densidad de la población genera un factor estresante por si misma, pero adicionalmente origina condiciones ambientales como el ruido, que van sumando estímulos estresantes al contexto social. El modelo

de estrés social por hacinamiento unido al ruido solo ha sido probado en ratas adultas, como se mencionó anteriormente.

Además; especialmente los estudios de estrés de características sociales, restringen su análisis basados en la utilización de cierto tipo de técnicas, sin relacionar de manera integral los distintos factores morfológicos, bioquímicos, inmunoenzimáticos y comportamentales implicados. Este tipo de análisis multifactorial resultaría muy favorable para tratar de entender los mecanismos de respuesta celulares y comportamentales que intervienen para provocar los efectos del estrés por hacinamiento y ruido durante etapas tempranas del desarrollo, dado que una gran parte de nuestra población infantil está expuesta a estas situaciones, especialmente en las grandes ciudades.

El estrés prolongado puede generar alteraciones importantes en el sistema nervioso de la población infantil y por lo tanto, modificar permanentemente las capacidades cognoscitivas. El análisis de los efectos de estas variables permitirá justificar la necesidad de emprender las acciones necesarias para prevenir o corregir las situaciones en las cuales están inmersos los individuos. Mientras que, la comprensión de los mecanismos biológicos implicados podría sugerir los tratamientos a seguir, para atenuar o inhibir las consecuencias negativas del estrés.

En conclusión; la elevación crónica en los niveles de glucocorticoides por estrés social puede generar cambios estructurales y dinámicos en el SNC, tales como apoptosis, -especialmente en etapas tempranas de la ontogenia. Los efectos del incremento de estas hormonas adrenales parecen confluir en una vía común hacia la apoptosis, (Reagan y McEwen, 1997).

Esta muerte celular programada y sus efectos conductuales, han sido poco estudiados como resultado de los incrementos fisiológicos de corticosterona en etapas tempranas del desarrollo, en especial por la inducción de estrés crónico de características sociales. Por esta razón es importante investigar el impacto de este tipo de estrés sobre la apoptosis neuronal (particularmente en el hipocampo, por su alta densidad de receptores a esteroides adrenales), y las posibles alteraciones cognoscitivas asociadas con memoria espacial y motivación para la conducta exploratoria, -directamente relacionadas con los efectos nocivos de los glucocorticoides en el hipocampo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los vertebrados el estrés social eleva los niveles séricos de GCs y estimula el eje HPA, con repercusiones sobre el sistema nervioso, evidenciadas por remodelación, neurogénesis, neurotoxicidad, necrosis y apoptosis, en las regiones que poseen una alta densidad de receptores a glucocorticoides, como el hipocampo, -especialmente vulnerable en el cerebro inmaduro. Estas alteraciones cerebrales pueden ser permanentes o reversibles, según sucedan en cerebros inmaduros o adultos, los efectos más severos suceden durante el desarrollo cerebral temprano, en especial sobre el hipocampo y las funciones asociadas a esta estructura. El hipocampo forma parte del sistema de retroalimentación negativa hacia el eje HPA y está estrechamente relacionado con conducta exploratoria, memoria explícita, episódica y espacial, que se afectan cuando éste se daña.

La estimulación sostenida del hipocampo por glucocorticoides puede desencadenar una cascada apoptótica, o producir necrosis, de lo que resulta disminuida esta población neuronal. Se ha demostrado apoptosis en neuronas del hipocampo tras la aplicación exógena de GCs, pero no por su incremento anormal en respuesta a estímulos estresantes de corta duración.

Esta situación plantea una problemática alrededor de cuáles son los efectos de la estimulación estresante de características sociales sobre la población neuronal del hipocampo y en esta medida sobre las funciones relacionadas con dicha estructura.

Por lo anteriormente señalado, en este estudio se analizó el tipo de muerte neuronal en el hipocampo, por la exposición crónica a estímulos estresantes, así como las consecuencias cognitivas, manifestadas por conducta exploratoria y memoria espacial. Los resultados que se obtengan permitirán conocer el impacto de estos estímulos sobre el desarrollo cerebral de estos sujetos, ya que algunos sectores de la población infantil están sometidos a diferentes tipos de estrés, entre los cuales están el hacinamiento y, o el ruido; con el propósito de implementar medidas preventivas o acciones remediales.

HIPÓTESIS:

La exposición crónica a estrés por ruido ultrasónico, hacinamiento o hacinamiento y ruido, provoca muerte neuronal apoptótica en el hipocampo y alteraciones de la memoria espacial y conducta exploratoria de ratas machos recién destetadas.

OBJETIVO GENERAL.

Analizar la capacidad de memoria espacial y conducta exploratoria en ratas, expuestas a estrés por ruido, hacinamiento, o hacinamiento y ruido durante los 10 días posteriores a su destete (días 21 al 31 de edad postnatal) y determinar si los cambios en estas habilidades se relacionan con el incremento en la corticosterona y la muerte neuronal por apoptosis en el hipocampo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los efectos de las diferentes condiciones experimentales, solas o mezcladas sobre los niveles urinarios de corticosterona para determinar el nivel de estrés generado por cada una de ellas.

2. Analizar si las condiciones estresantes tienen un efecto sobre el desarrollo corporal de los sujetos expuestos a ellas.

3. Evaluar la manera en como el comportamiento exploratorio puede verse afectado por las situaciones experimentales.

4. Determinar la capacidad de adquisición y retención de memoria espacial en los sujetos expuestos a las distintas situaciones de estrés.

5. Analizar la muerte neuronal en el hipocampo en relación a las situaciones estresantes y determinar si está relacionada con los niveles de glucocorticoides observados, así como con los cambios comportamentales.

DISEÑO EXPERIMENTAL**Cronograma del estudio**

Todas las ratas fueron machos recién destetados con 21 días de edad, con el peso balanceado entre los grupos.

PN (Día Post-Natal)

C (Control)

H (Hacinamiento)

R (Ruido)

PN	C (n=13)	H (n=13)	H-R (n=13)	R (n=13)	Mediciones somatométricas y recolección de orina (7 am-9 am)
21-30	Grupos de 6 y 7 sujetos, en condiciones estándar de 244 cm ² /rata	Alojamiento de 45 cm ² /rata	Alojamiento de 45 cm ² /rata	Grupos de 6 y 7 sujetos, en condiciones estándar de 244 cm ² /rata	
Ruido	Ambiental del bioterio.	Del bioterio.	Ultrasónico nocturno (8 h totales) en Intervalos aleatorios de 30 min a 22 Khz. y 80 - 90 dB	Ultrasónico nocturno (8 h totales) en Intervalos aleatorios de 30 min a 22 Khz. y 80 - 90 dB	
31	Condiciones de alojamiento estándar. Prueba del campo de agujeros				
32-33	Condiciones de alojamiento estándar. Paradigma del Laberinto acuático de Morris				
33... Sacrificio.	-Perfusión Intracardiaca de 9 sujetos por grupo-. -Postfijación de cerebros, inclusión en parafina y cortes coronales de 10 um- -Análisis inmunohistoquímico con anexina, anti-NeuN y yoduro de propidio- -Cuantificación con Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) de corticosteroides en orina-				

Grupos de estudio

Control (C): ratas que no fueron sometidas a ninguna situación experimental, alojadas en dos jaulas en grupos de seis y siete sujetos, en condiciones habituales de bioterio con 244 cm²/rata, (n =13).

Hacinamiento (H): fueron sometidas a estrés por hacinamiento durante 10 días; 45 cm²/rata en las mismas condiciones estándar de bioterio, (n =13).

Ruido (R): fueron sometidas a estrés por ruido 8 h diarias durante 10 días, con tonos de ultrafrecuencia de 22 kHz (USVs), con intensidades entre los 80 y 90 dB y mantenidas en las mismas condiciones estándar de alojamiento, la exposición fue durante el ciclo nocturno de actividad; 19:00-7:00 h. Para evitar habituación, diariamente se modificó la alternancia de los intervalos múltiples de 30 min, (n =13).

Hacinamiento y ruido (HR): fueron expuestas a las mismas condiciones de ruido y con espacio restringido a 45 cm²/rata, (n=13).

Descripción operativa de las variables independientes.

Estrés crónico de tipo social: entendido como la estimulación aversiva prolongada de intensidad variable que desencadena en un organismo un conjunto de reacciones para enfrentarla.

Variable cualitativa, medida en una escala nominal con cuatro categorías:

1. Ausencia de estrés.
2. Estrés por hacinamiento (H) durante 10 días.
3. Estrés por ruido discontinuo (R) durante 10 días.

4. Estrés por hacinamiento y ruido discontinuo (H+R) durante 10 días.

La confirmación del nivel de estrés generado en cada condición experimental será a través de cuantificación diaria de los niveles de corticosterona por HPLC, tomando como referencia los valores resultantes del grupo de ratas controles.

Descripción operativa de las variables dependientes.

Peso corporal y tamaño: Medida de la masa y tamaño de cada sujeto. Variable cuantitativa y discreta en escala de razón, obtenida con una báscula (peso) y una regla (tamaño). Para registrar el tamaño se tomó como inicio la punta de la nariz y como fin el principio de la cola, donde termina el pelaje.

Índice de neuronas del hipocampo, en necrosis y apoptosis: la cantidad de neuronas inmunorreactivas a NeuN por campo ($739 \mu\text{m}^2$), determinará la cantidad total. Aquellas neuronas inmunorreactivas a anexina en la misma área, se registraron como subpoblación en apoptosis, y las contrateñidas con yoduro de propidio como subpoblación en necrosis. Con estos datos se obtendrá un índice de subpoblaciones al dividir el número de células en apoptosis o necrosis observadas por campo sobre el número total de neuronas observadas en el mismo campo.

Actividad exploratoria en el campo de agujeros: comportamiento locomotor grueso del organismo que consiste en recorrer cada parte de un ambiente novedoso al que es expuesto. Variable de carácter cuantitativo medida de manera discreta, según la frecuencia absoluta de agujeros visitados en el centro de la tabla, en la periferia y el número total de visitas en ambos; y medida de manera continua según el tiempo de movimiento e inmovilidad, el tiempo en zona periférica y central, y la

frecuencia relativa de agujeros visitados por min. Se registró una visita si los ojos de la rata rebasaban el nivel del agujero, y el tiempo de permanencia en una zona u otra se midió por ubicación de la cabeza del animal.

Memoria espacial en el laberinto acuático de Morris: capacidad del individuo de modificar su comportamiento a partir de la experiencia con estímulos espaciales. Variable de carácter cuantitativo y continuo medida en una escala de razón, mediante un laberinto acuático con plataforma escondida en el que se contabilizan la latencia de escape, el tiempo en el cuadrante de la plataforma, el tiempo en el cuadrante opuesto a la plataforma. Como medida continua se obtuvo el número de veces que el animal cruzó el sitio donde estuvo la plataforma, una vez ésta había sido retirada.

Criterios de inclusión:

1. Animales que cumplieron con las condiciones señaladas de sexo y edad.
2. Ratas que no mostraron signos de enfermedad al inicio del estudio.

Criterios de exclusión:

1. Animales que resultaron lesionados durante las diferentes etapas del estudio.
2. Cerebros que no se fijaron adecuadamente durante la perfusión intravascular.
3. Ratas que mostraron signos de enfermedad a través del estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS.**Animales de experimentación:**

52 ratas machos *Swiss-Wistar* de 21 días de edad, procedentes del bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (IMSS), fueron alojadas en jaulas transparentes de policarbonato, según la situación experimental para cada grupo. Los animales fueron mantenidos a 22 ± 2 °C, humedad relativa del ambiente entre 50 y 55 %, ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h y alimentados con dieta balanceada para roedores (*Ralston-Rations, USA*); *Proteína mínima 23%, grasa mínima 3%, fibra máxima 6.0%, cenizas máximas 7.0%, E.L.N. por diferencia 49%, calcio máximo 1.0%, fósforo mínimo 0.6%, humedad máxima del 12%* por cada kg y agua potable "ad libitum". Las ratas fueron elegidas aleatoriamente del bioterio en grupos balanceados por el peso de los sujetos, e igualmente divididas en grupos de 13, para distribuirse en las cuatro condiciones señaladas. Los animales fueron tratados de acuerdo a los criterios establecidos por la NIH (Institucional Animal Care and Use Guidebook).

Medidas somatométricas.

Diariamente, cada uno de los animales fue cuidadosamente colocado en una balanza electrónica que registraba su peso cuando se encontraba inmóvil. Además se midió la longitud craneo-caudal de cada sujeto, desde la punta de la nariz hasta la base de la cola donde termina el pelaje.

Exposición de los animales al estrés.

Los individuos del grupo **control (C)** fueron alojados durante 10 días en un espacio de $244 \text{ cm}^2/\text{rata}$, y en condiciones del ruido ambiental del bioterio, las ratas

del grupo de **hacinamiento (H)** fueron alojadas en un espacio de $45 \text{ cm}^2/\text{rata}$. El ruido fue el ambiental del bioterio. El grupo de **hacinamiento + ruido (HR)** fue alojado con la misma restricción espacial que el grupo **H**, sólo que adicionalmente fue expuesto a tonos de ultrafrecuencia de 22 kHz, con intensidades entre los 80 y 90 dB, emitidos por un generador de frecuencias durante el ciclo de actividad nocturna de 12 horas (de 7pm a 7 am). Con el propósito de evitar que se produjera habituación, los animales fueron expuestos a este ruido en intervalos de 30 min distribuidos aleatoriamente, de manera que; al final de cada periodo diario de estrés, las ratas estuvieron expuestas a un total de 8 h del ruido. Diariamente se modificó la alternancia de los ciclos, con el uso de un temporizador de intervalos múltiples.

Estudios analíticos.

Cuantificación de corticosterona en orina.

Desde el día 21 de vida posnatal hasta el día 33 en que fueron sacrificados los animales, se colectaron muestras de orina entre las 7 y las 9 de la mañana, para cuantificar los niveles de corticosterona mediante cromatografía de líquidos de alto desempeño HPLC (High Performance Liquid Chromatography), así se mantuvo un monitoreo constante no invasivo de las fluctuaciones de esta hormona. Para ello los sujetos fueron alojados en cajas individuales con piso de rejilla metálica, suspendidas a baja altura sobre una superficie metálica esterilizada, donde caía la orina, que fue constantemente colectada por grupos en crio-viales durante 2 h con pipetas independientes. Durante todo este tiempo la orina recolectada se mantuvo parcialmente en hielo para mantener estable la corticosterona. Las muestras completas de orina fueron almacenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, para su posterior análisis.

Cromatografía de líquidos.

La cuantificación de corticosterona se realizó a partir de los valores resultantes de una curva de estandarización con niveles conocidos de esta hormona disuelta en metanol, para determinar su tiempo de retención y el área bajo la curva en el cromatógrafo. El procedimiento de extracción de los esteroides para cuantificación de la corticosterona en orina fue de la siguiente manera: se hizo pasar 1 ml de la orina a través de un cartucho de extracción C18 (Waters Assoc., Milford, MA USA) para retener los esteroides, estos fueron eluidos con 5 ml de metanol, que se evaporó con nitrógeno gaseoso. Se añadieron 4 ml. de tampón acetato pH 4.6. Esta solución se incubó con 50 ml de la enzima β -glucoronidasa de *Helix Pomatia* (Merck KGsA, Darmstadt, Germany) a 37 °C durante 48 h. Nuevamente se realizó la extracción y elución en cartuchos C18. Se agregaron 100 ng. de hidrocortisona como estándar interno. Las muestras se concentraron por evaporación con nitrógeno hasta 100 μ l.

Se corrieron 10 μ l de las muestras en un cromatógrafo HPLC Thermo Finnigan, con muestreo automatizado y detector de ultra violeta con arreglo de diodos. Se usó una columna Alltech de fase en reversa C18 de 250 mm de largo con 4.6 mm de diámetro interno con un tamaño de partículas de 5 μ m. La fase móvil fue una combinación de metanol, agua y tetrahidrofluorano (35:55:10) con una velocidad de flujo de 0.5 ml/min, a temperatura medioambiental.

Estudios conductuales.*Campo de agujeros (Hole board).*

Una vez completado el periodo de 10 días de exposición al estrés, al día siguiente (ratas de 31 días de edad), se realizó la prueba del campo de agujeros (Hole board) para analizar conducta exploratoria. El instrumento consistió en un cubo hueco de acrílico negro de 60x60x60 cm. Cinco cm por encima del piso de la caja está una plataforma (campo de agujeros) con 36 agujeros de 2.5 cm de diámetro, repartidos en una matriz de 6x6. Este campo está dividida por una línea imaginaria en una sección periférica (la línea de agujeros del perímetro de la tabla), y una central de 4x4 agujeros.

Para iniciar la prueba, el animal se colocó en el centro de la tabla de agujeros y durante 15 min. fue video-filmado su comportamiento, para posteriormente registrar los siguientes parámetros:

- Porcentaje de tiempo que pasó el animal en las áreas central y periférica de la tabla,
- tiempo total de movimiento e inmovilidad,
- número de agujeros centrales, periféricos y totales visitados,
- frecuencia relativa de visitas (número de visitas/min.).

Se consideró visitado un agujero cuando la rata introdujo su cabeza hasta que la superficie le ocultara los ojos (Lordi y col, 2000). Todos los sujetos realizaron la prueba el mismo día entre las 9:00 y 11:00 h.

Laberinto acuático de Morris.

Es una piscina circular con 180 cm de diámetro y paredes con 42 cm de altura pintada de negro y dividida en cuatro cuadrantes imaginarios, ésta se llenó con agua (20 ± 3 °C), hasta una altura de 23 cm, en su interior fue sumergida una plataforma de escape cilíndrica de color negro con 12.5 cm de diámetro y 22 cm de altura, (invisible para la rata) y esta tuvo una ubicación fija en uno de los cuadrantes durante todo el experimento. La tarea consistió en que la rata debía nadar en el laberinto hasta localizar la plataforma, las primeras veces por accidente, sin embargo; en las sesiones posteriores debía reconocer su sitio de ubicación para poder localizarla, en este caso; con la ayuda de indicadores visuales del contexto del laboratorio, a manera de claves espaciales, las funciones cerebrales implicadas para ejecutar esta tarea dependen básicamente de la actividad hipocampal.

Para este estudio se siguió la metodología descrita por deQuervain, Roozendaal y McGaugh (1998) con ligeras modificaciones, los experimentos estuvieron basados en dos tipos de ensayos; uno de entrenamiento y otro de prueba, el de entrenamiento consistió en depositar la rata en el agua desde cualquier sitio de partida de la periferia y esperar hasta un máximo de 60 s para que encontrara la plataforma. El tiempo transcurrido desde que la rata se depositó en el agua hasta que localizó la plataforma fue considerado como latencia de escape y su duración

máxima fue de 60 s, si una vez completado este tiempo no localizaba la plataforma oculta se le guiaba hasta ella y allí se le dejaba permanecer durante 20 s.

Enseguida la rata era retirada, secada y se le dejaba permanecer en la caja con los otros animales durante 30 s, mientras empezaba el siguiente ensayo, y así sucesivamente; hasta completar 8 ensayos consecutivos para cada sujeto ese mismo día, distribuyendo de manera balanceada los sitios de partida de los primeros cuatro ensayos entre los cuatro cuadrantes, de manera que cada rata inició su navegación desde un cuadrante distinto, pero sin seguir un patrón ordenado, sin embargo, el orden aleatorio de partida fue el mismo para la segunda serie de 4 ensayos así; cada rata partió dos veces desde el mismo cuadrante. Adicionalmente; en las video-filmaciones fue registrado el tiempo que la rata navegó en el cuadrante donde se encontraba la plataforma y en el cuadrante opuesto.

Para el ensayo de prueba fue retirada la plataforma, y se introdujo a cada animal una vez en la piscina desde el mismo cuadrante que fue uno lateral, es decir ni el de la plataforma ni el opuesto. Este punto de partida fue el mismo para todos los individuos. Se le permitió nadar durante 60 s. y fue retirado del laberinto. Fue registrado el tiempo que la rata navegó en el cuadrante donde estuvo la plataforma y en el cuadrante opuesto, así como las veces que cruzó el sitio donde se encontraba la plataforma. La prueba se llevó a cabo 24 h después del último ensayo de entrenamiento, entre las 7:00-10:00 am, fue videofilmada y posteriormente calificada por un observador que desconocía la identidad de los grupos de animales.

Estudios morfológicos.*Perfusión intracardiaca para fijación del cerebro.*

Al terminar la última sesión del laberinto de Morris, es decir; 12 días después de haberse iniciado el periodo de exposición al estrés, fueron sacrificados por perfusión todos los animales mediante una inyección intraperitoneal subletal de pentobarbital sódico (50 mg/kg), a las ratas profundamente anestesiadas se les practicó toracotomía amplia para exponer el corazón y localizar la arteria aorta torácica descendente por debajo de los pulmones para pinzarla y crear un circuito vascular cerrado hacia el cerebro. A través del ventrículo izquierdo fue introducida una aguja de punta biselada calibre 12, hasta alcanzar la aorta cardiaca, fue fijada con pinzas de mosquito curvas transversales al corazón y se seccionó la aurícula derecha para permitir el drenaje de sangre y soluciones. Con una bomba peristáltica, con presión máxima de 120 cm³ de columna de agua, durante 3 min se pasaron 150 ml de una solución lavadora a temperatura corporal (0.9% NaCl, con 5.000 UI de heparina por litro y 0.1% de procaína) para eliminar la mayor cantidad de sangre, seguida de una solución fijadora compuesta por 4% de paraformaldehído amortiguado en fosfato 0.1 M a pH 7.3, de esta solución se pasaron 150 ml en 4 min.

Finalizada la perfusión, se decapitaron los sujetos y sus cabezas fueron postfijadas en paraformaldehído durante 24 h, mediante craneotomía fue extraído el cerebro, que se fijó adicionalmente por inmersión durante 8 h a temperatura ambiente en la misma solución fijadora; posteriormente se hicieron dos cambios de 12 h c/u con fosfato de sodio 0.1 M pH 7.3 en agitación suave. De cada grupo

experimental fue procesado el cerebro de las ratas para análisis morfológico de la población neuronal del hipocampo con microscopía de luz y fluorescencia.

De los cerebros fue obtenida una rebanada de 5 mm de espesor (7.0 a 3.0 mm anterior a lambda, Paxinos y Watson, 1982) comprendida en sentido antero-posterior desde delante del quiasma óptico y hasta detrás de la eminencia media, esta rebanada contenía el hipocampo y fue embebida en parafina, para ello fue deshidratada mediante cambios en una serie de concentraciones crecientes de etanol, mezclas de etanol-xileno y cambios en parafina pura. De los tejidos incluidos se obtuvieron cortes coronales de 10 μm de espesor, en un microtomo.

Inmunohistoquímica para evaluación de apoptosis o necrosis neuronal.

Durante la apoptosis sucede "endonucleolisis", se producen fragmentos del DNA del tamaño de oligonucleosomas que mediante electroforesis permiten la detección de un llamado "patrón en escalera del DNA", indicativo de fragmentación. Con esta técnica no es posible identificar la población celular en apoptosis ni su localización histológica, por lo cual se utilizó un método morfológico con los cortes rehidratados de ratas controles y experimentales, para identificar apoptosis. Durante los primeros estadios de la apoptosis, la proteína membranal con dominio intracelular -fosfatidilserina, queda expuesta hacia el lado extracelular. La anexina es un compuesto capaz de unirse a ella y marcarla con fluorescencia, por ello permite detectar apoptosis en diferentes tipos de células. El yoduro de propidio se utiliza como una contratinción que permite diferenciar estas células de las necróticas, debido a que se liga a contenido intracelular que sólo queda expuesto tras la ruptura de la membrana en la necrosis.

Por otra parte, los anticuerpos anti-NeuN permiten identificar selectivamente a las neuronas, ya sea mediante cromógenos visibles en microscopía de luz, o con fluorescencia.

Tratamiento de las muestras.

Los cortes desparafinados fueron rehidratados con una secuencia de inmersión en xileno y concentraciones decrecientes de alcoholes, hasta llegar a agua y tampón fosfato salino (PBS), a continuación fueron desenmascarados mediante un proceso de corriente eléctrica que pasa a través de una solución PBS en la cual se encontraban sumergidos, enseguida estos tejidos fueron permeabilizados mediante inmersión durante 5 min. en agitación, en una solución de PBS 0.1M, pH 7.4, con 0.1% de Tritón X-100. Los tejidos fueron incubados en una solución de PBS con 2% de suero normal de caballo durante 20 min, para facilitar el ligamiento de los anticuerpos monoclonales. Se hizo un lavado y empezó la incubación con la anexina (Annexin V-FITC Kit, ICE 33-1200) 1:100 en amortiguador 2x (incluido en el paquete) diluido 1:1 en agua desionizada durante 3 h a 37 °C y se realizaron dos lavados con PB. Se agregó el yoduro de propidio (incluido en el paquete) 20 µg/ml disueltos en agua y se le dejó actuar durante 5 min, para lograr una contratinción suave que permita el contraste entre células necróticas y apoptóticas. Las células apoptóticas se caracterizan por un color verde producto del marcaje de la anexina, mientras que las necróticas toman un color rojizo por efecto del yoduro de propidio. Finalmente los cortes fueron lavados con PB (tampón fosfato 0.1M, pH 7.4) y se continuó con la segunda secuencia de reacciones para identificación de neuronas inmunopositivas para NeuN.

Inmunohistoquímica para identificación de neuronas.

La incubación con el ac primario anti-NeuN disuelto 1:500 en PBS con 0.1% de Tritón X-100 fue durante toda la noche, a temperatura ambiente en cámara húmeda. Al día siguiente, los tejidos se lavaron mediante cambios en PB (2 x 5 min.) con agitación suave y se incubaron con el anticuerpo (ac) secundario; IgG de ratón contra Igs de caballo (Vector BA2000) disueltas 1:200 en PBS-Tritón X-100, durante 2 h a temperatura ambiente. Se hicieron lavados con PB y se adicionó el compuesto fluorescente AMCA Avidin P (Vector A-2008/1:100) disuelto 1:400 en PB, finalmente se lavaron nuevamente los tejidos y se añadieron unas gotas de Vectashield (Vecta H100 Mounting Medium Fluorescein Sigma), se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron los bordes con barniz de uñas.

Durante toda esta segunda etapa se realizaron los procedimientos con luz tenue, para evitar pérdida de fluorescencia (Gold y col., 1994).

Cuantificación de neuronas.

En un microscopio confocal Carl Zeiss LSM510 con láser de argón y neón/argón, fueron analizadas la región del giro dentado y la zona CA1. Con las fotografías obtenidas en el microscopio confocal a partir del triple marcaje fluorescente, se consideraron las células inmunorreactivas para NeuN como neuronas, visualizadas en color azul en 643 nm. Las células marcadas con Anexina en verde (488 nm) fueron registradas como células apoptóticas. Un investigador que desconocía la identidad de las muestras contabilizó el número total de neuronas de neuronas observadas por campo y la subpoblación de ellas con doble marca (anexina y NeuN) detectada por la sobreposición de imágenes en cada rango de luz. La población de células marcadas con el yoduro de propidio en rojo de 545 nm, -

consideradas como necróticas- fue tan baja que se consideró irrelevante para los propósitos de este estudio.

Es importante aclarar, que en microscopia confocal se superpone una imagen de una célula guardada en la memoria del software sobre otra imagen de la misma célula donde se evidenció la marca al utilizar un fluoróforo diferente y excitarlo con una distinta longitud de onda. La colocación de marcas de los anticuerpos, fue obtenida en este experimento a través de la colocación de imágenes realizada por el microscopio confocal, al combinar las microfotografías de los diferentes rangos de luz.

Con las microfotografías obtenidas en un solo plano de foco se analizaron tres campos a 40X de $739 \mu\text{m}^2$, de la región CA1, y un campo a 40X del DG. De cada grupo se analizaron tejidos provenientes de 4 ratas, y de cada cerebro se analizaron 20 cortes coronales consecutivos del hipocampo, de $10 \mu\text{m}$ de espesor. Fue un criterio estricto la visualización del núcleo de la célula para identificarla positivamente como neurona.

De la población neuronal analizada en los distintos campos microscópicos de ambas regiones resultó el índice de apoptosis de dividir el número de células doblemente marcadas (NeuN + Anexina), entre el número de neuronas con marca simple (NeuN), y de multiplicar el resultado por 100.

Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados con la prueba estadística de ANOVA de una sola vía para la comparación de los grupos de animales control y experimentales, seguida de la

prueba de Scheffé para la comparación post-hoc de los valores de las medias, con una $p < 0.05$ para definir como significativas las diferencias. Adicionalmente se hicieron análisis de regresión lineal, entre los índices de muerte neuronal y los niveles de corticosterona dentro de cada grupo.

RESULTADOS.

Datos somatométricos.

La comparación del peso corporal entre las ratas controles que no fueron sometidas a ningún tipo de estrés y las experimentales, mostró diferencias significativas ($p < 0.01$) en los días 29 al 32, en este periodo se manifestó un retardo en la curva normal de ganancia del peso en los animales estresados (Fig. 1). El análisis de la talla (longitud cráneo-caudal) (Fig. 2), también mostró valores inferiores en las ratas estresadas en estos mismos días (29 a 32), ($p < 0.01$). En los días previos se empezaron a observar algunas diferencias importantes entre animales controles y experimentales, sin embargo estas no fueron consistentes. Las diferencias se hicieron permanentes desde el día 29. Para comprobar si el retardo en el desarrollo posnatal sucedió como un evento metabólico global, se analizó la covariación de peso y talla. La correlación de Pearson mostró relaciones significativas con $p < 0.01$ entre el peso y la longitud en cada grupo: Control $p = 0.962$; Hacinamiento $p = 0.963$; Hacinamiento y ruido $p = 0.835$; y Ruido $p = 0.878$ (no se muestran los datos). Estos datos en conjunto, sugieren que los animales tal vez consumieron una menor cantidad de alimento debido al estrés, o que si su consumo fue normal, las alteraciones de su metabolismo pudieron modificar los procesos de digestión y absorción.

Cuantificación de corticosterona urinaria.

El análisis de los niveles urinarios de corticosterona mostró grandes diferencias entre los animales estresados, en comparación con los niveles basales de las ratas controles (Fig. 3). El grupo de ratas hacinadas tuvo un incremento durante los primeros cuatro días de haber iniciado el estrés, sin embargo; durante el resto de la exposición al estrés y la etapa de pruebas de conducta los niveles de CORT no fueron diferentes a los de animales controles, excepto el último día. Con respecto a los demás grupos experimentales, el grupo H sólo estuvo significativamente por debajo de HR el día 26, y por debajo de R en el día 32.

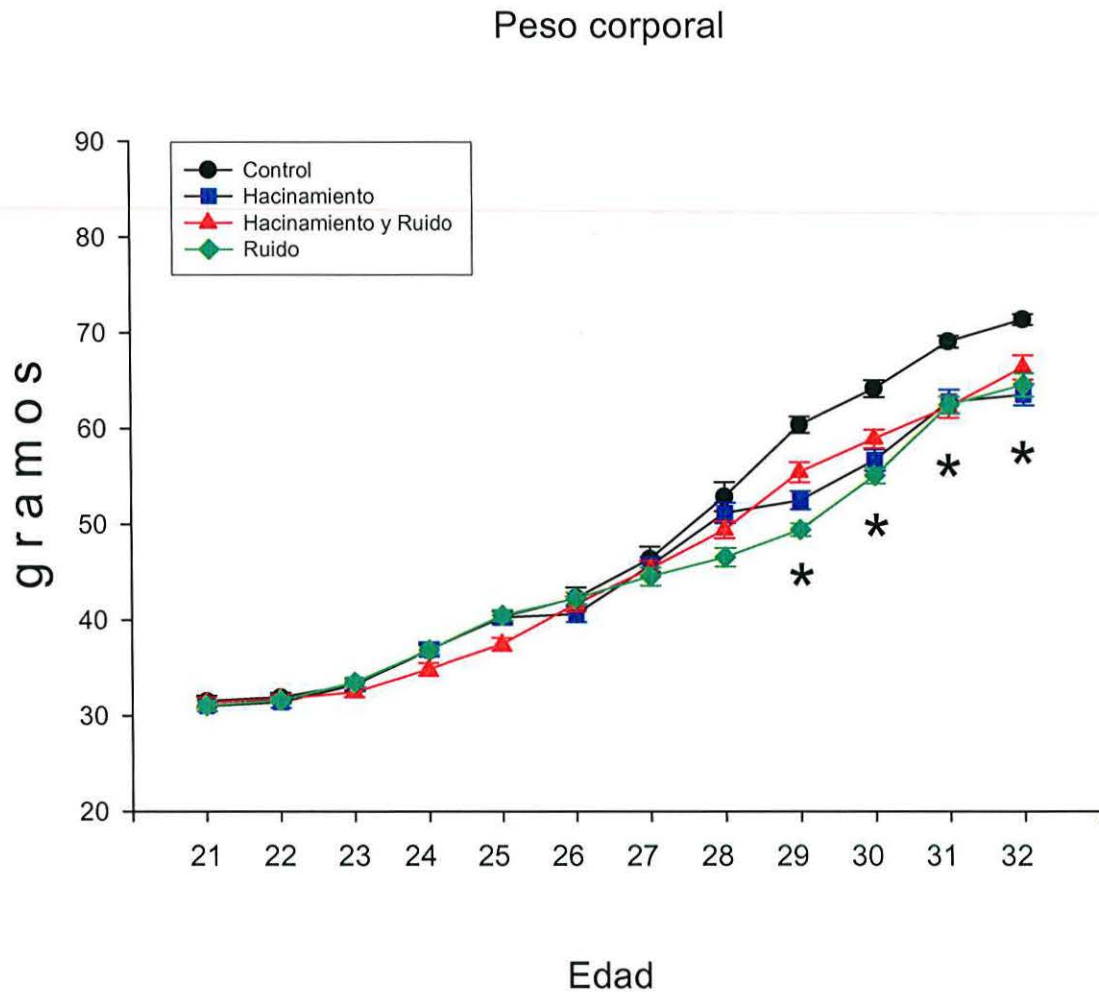


Fig. 1. Se muestran los valores de medias (\pm SE) del peso corporal de los sujetos durante los días 21-32. Desde el día 29 se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) del grupo control, con todos los experimentales. Todos los animales estresados resultaron afectados en forma semejante, independientemente de la condición estresante. * Diferencia de los grupos estresados vs control ($p < 0.01$).

Longitud craneo-caudal.

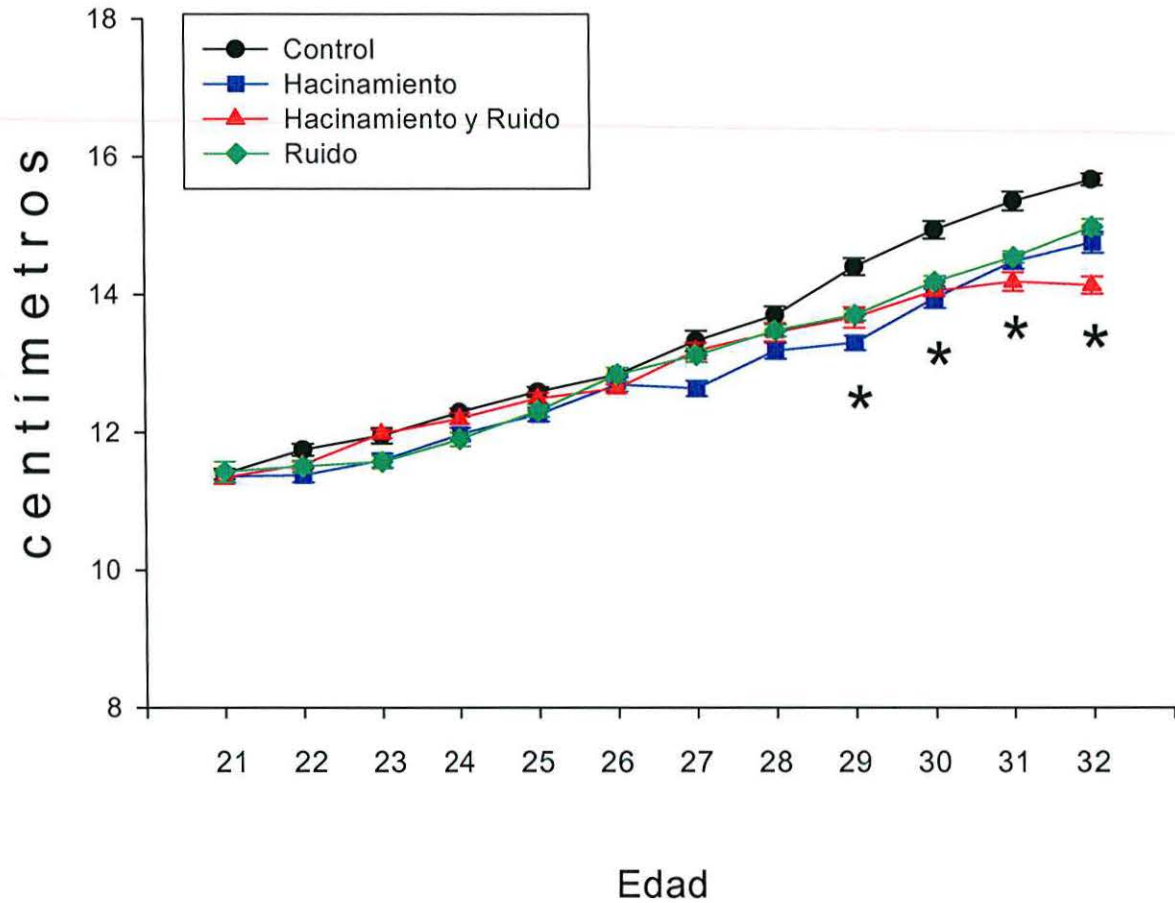


Fig. 2. Se muestran los valores de medias (\pm SE) de la talla corporal de los sujetos durante los días 21-32. Al igual que en la ganancia de peso, desde el día 29 se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) del grupo control con todos los experimentales. Todos los grupos estresados resultaron afectados en forma semejante, independientemente de la condición estresante. * Diferencia de los grupos estresados con el control ($p < 0.01$).

Durante todo el experimento los sujetos expuestos al ruido tuvieron niveles de CORT mayores que los controles, y en relación a los otros grupos estresados; estos niveles fueron más bajos que HR el día 26 y mayores que H el día 32. El grupo HR también se diferenció del control en todos los días del experimento, tuvo un incremento agudo el día 26, en el que alcanzó niveles superiores a todos los demás grupos, y hacia los días finales del experimento se observó una tendencia a la baja.

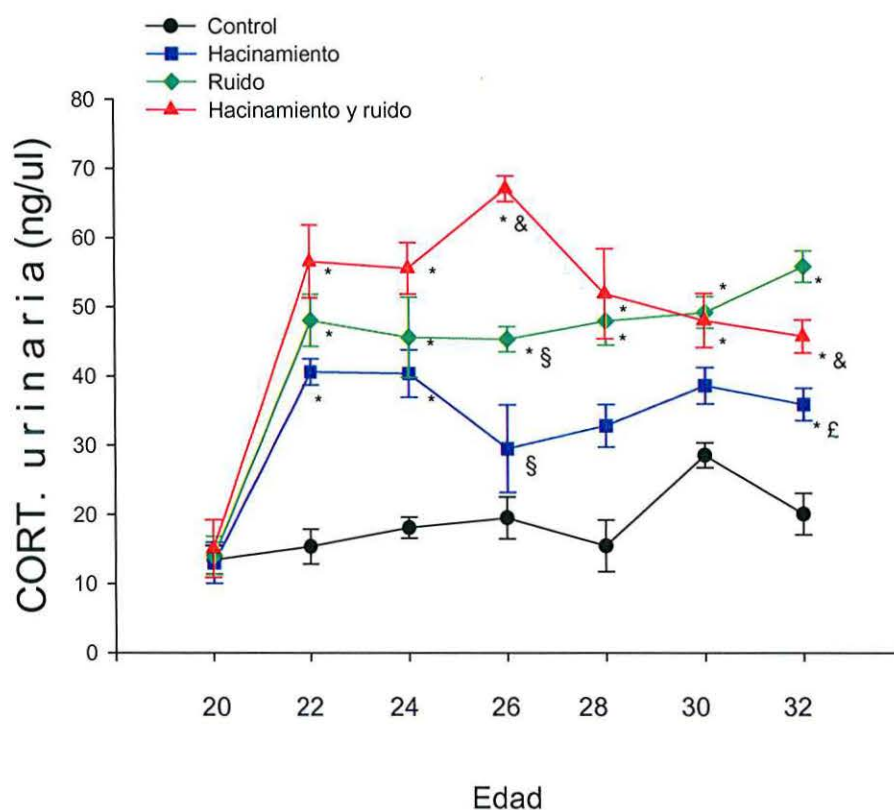


Figura 3. Se muestran los valores de medias (\pm SE) de los niveles de corticosterona urinaria en ng/ul cada dos días durante el experimento desde el día 20 (línea de base) hasta el 32. Diferencia significativa ($p < 0.05$) con el grupo control (*), con el grupo de hacinaamiento (&), con el grupo de ruido (£) y con el grupo de hacinaamiento más ruido (§).

Estudios de comportamiento.

Las videofilmaciones del campo de agujeros y el laberinto acuático fueron calificadas por tres personas que desconocían la identidad de los tres grupos de animales, los datos resultantes fueron contrastados con el usola prueba de ANOVA de una sola vía, seguida por la prueba *post hoc* de Scheffé, sin que resultaran variaciones inter-ensayo importantes entre los registros obtenidos por los diferentes analizadores, para la asignación de los parámetros mencionados.

Campo de agujeros, (Hole Board).

Los resultados para los puntajes del total de visitas, visitas periféricas, tiempo en zona central y periférica y frecuencia relativa de visitas totales, no mostraron diferencias significativas entre el grupo control y los experimentales, ni entre los animales experimentales. Sin embargo; en los valores del número de visitas centrales y tiempos de movilidad e inmovilidad, los animales experimentales si difirieron significativamente de los controles. De estas dos últimas medidas, solamente se muestran los tiempos de movilidad debido a que los de inmovilidad son complementarios, dentro de los 15 min. de duración de la prueba.

Los animales estresados mostraron un mayor tiempo de movilidad ($p < 0.01$) en comparación con el grupo control (Fig. 4). Además, entre ellos no hubo diferencias en sus valores de medias.

En las visitas periféricas no se observaron diferencias importantes entre los grupos, sin embargo, en cuanto a la frecuencia absoluta de visitas centrales, resultó un menor número significativo de visitas ($p < 0.01$) en los animales experimentales, comparados con los controles (Fig. 5). Tampoco resultaron diferencias significativas para este parámetro entre los grupos experimentales. Al parecer esta variable no resultó afectada en forma diferencial por cada situación estresante.

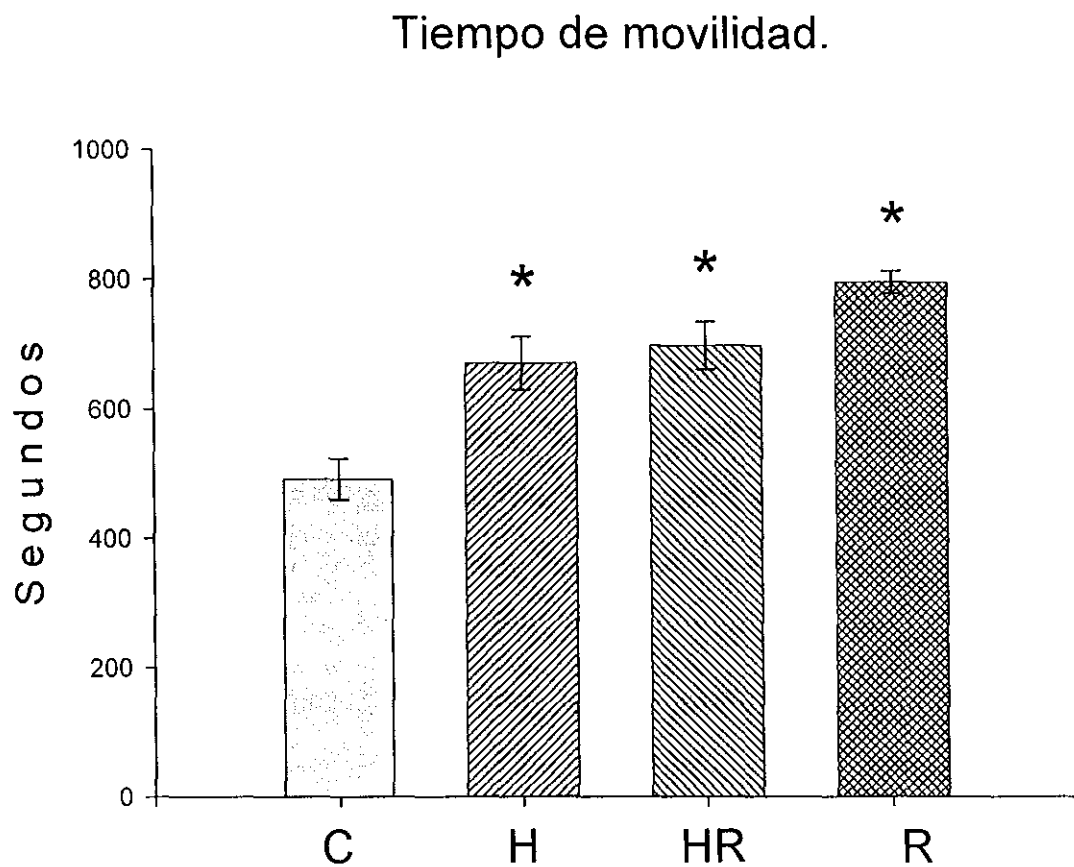


Figura 4. Medias (\pm SE) del tiempo de movilidad en el campo de agujeros. Los animales experimentales mostraron un incremento en su movilidad en comparación con los controles y no hubo diferencias significativas entre los tres grupos de ratas estresadas. * Diferencia del grupo en comparación con el control ($p < 0.01$).

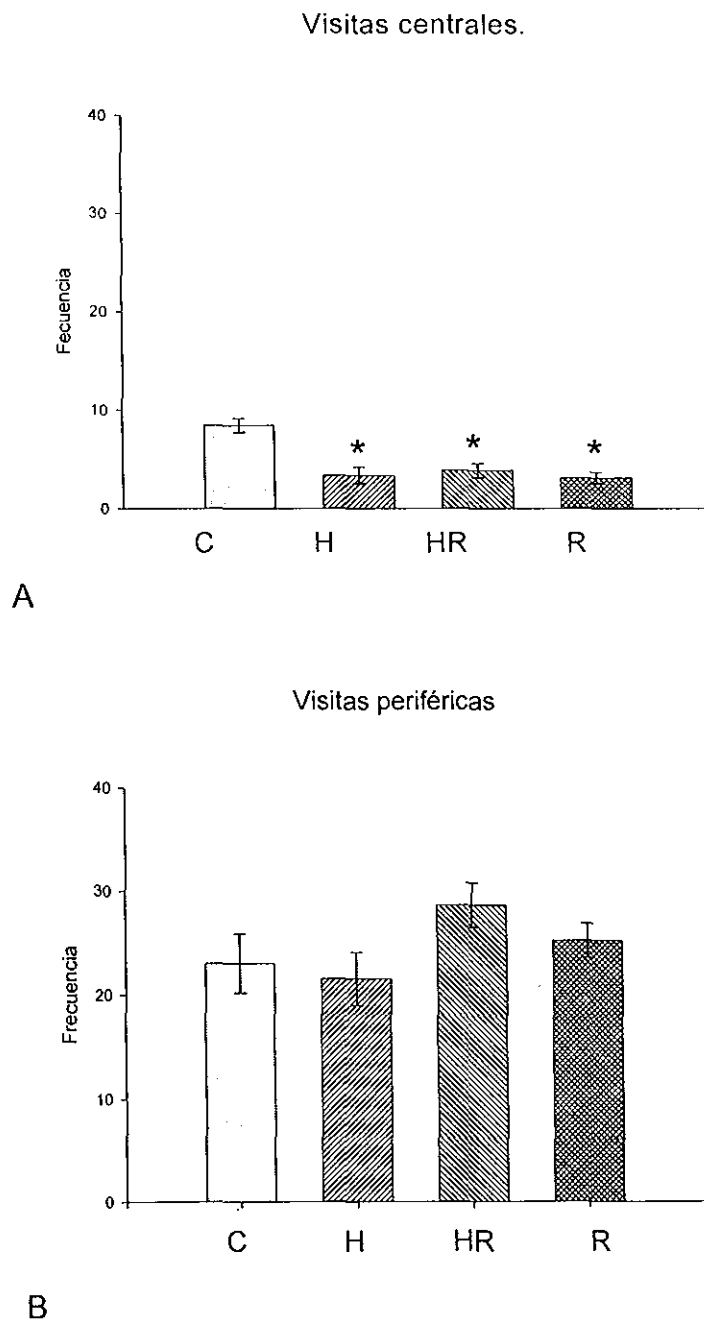


Fig. 5. Análisis de los valores promedio (\pm SE) de conducta exploratoria en el campo de agujeros. Las visitas centrales (A) fueron mucho menos frecuentes que las periféricas en todos los grupos y no tuvieron diferencias significativas entre sí (B), lo cual es un resultado esperado. A: los animales estresados tuvieron una menor frecuencia absoluta de visitas centrales, en comparación con el control. B: en contraste, las visitas periféricas no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Nuevamente no se observaron efectos diferenciales atribuibles al tipo de estrés al que fueron sometidos los animales; hacinamiento, ruido o ambos simultáneos. * Diferencias significativas en comparación con el control ($p < 0.01$).

Laberinto acuático de Morris.

Durante la fase de entrenamiento las ratas controles mostraron diferencias significativas respecto a las experimentales, pues tuvieron un menor tiempo de latencia de escape. Este parámetro refleja el aprendizaje positivo en el laberinto.

Los valores de la latencia de escape (Fig. 6) desde el quinto ensayo empezaron a mostrar diferencias entre las ratas controles y las estresadas y desde el sexto ensayo de la etapa de entrenamiento las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$). Entre los grupos experimentales, no se observaron diferencias importantes, al parecer las tres condiciones de estrés provocaron efectos comparables.

Durante la fase de prueba del laberinto acuático de Morris se registró el tiempo en el cuadrante opuesto al de la plataforma, el tiempo dentro del cuadrante en el que se encontraba la plataforma oculta y el número de cruces con el sitio exacto donde se encontraba la plataforma. Solamente el tiempo de nado en el cuadrante de la plataforma mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control (Fig. 7). El mayor tiempo correspondió a las ratas controles no estresadas, los tres grupos de animales estresados revelaron valores menores, sin diferencias entre ellos, $p < 0.05$.

Estudios morfológicos.

Evaluación del daño neuronal.

Con la sobreposición de imágenes digitales del microscopio confocal para la fluorescencia de NeuN y Anexina fue posible identificar la colocalización de estas dos marcas (Fig. 8), de manera que se obtuvo una medida de la población de neuronas registradas por campo (marcadas con NeuN) y la subpoblación por campo con doble marcaje (anexina y NeuN) la cual indica el inicio de la muerte neuronal por apoptosis. A partir de estos valores se calculó el índice de neuronas en apoptosis.

Latencia de escape.

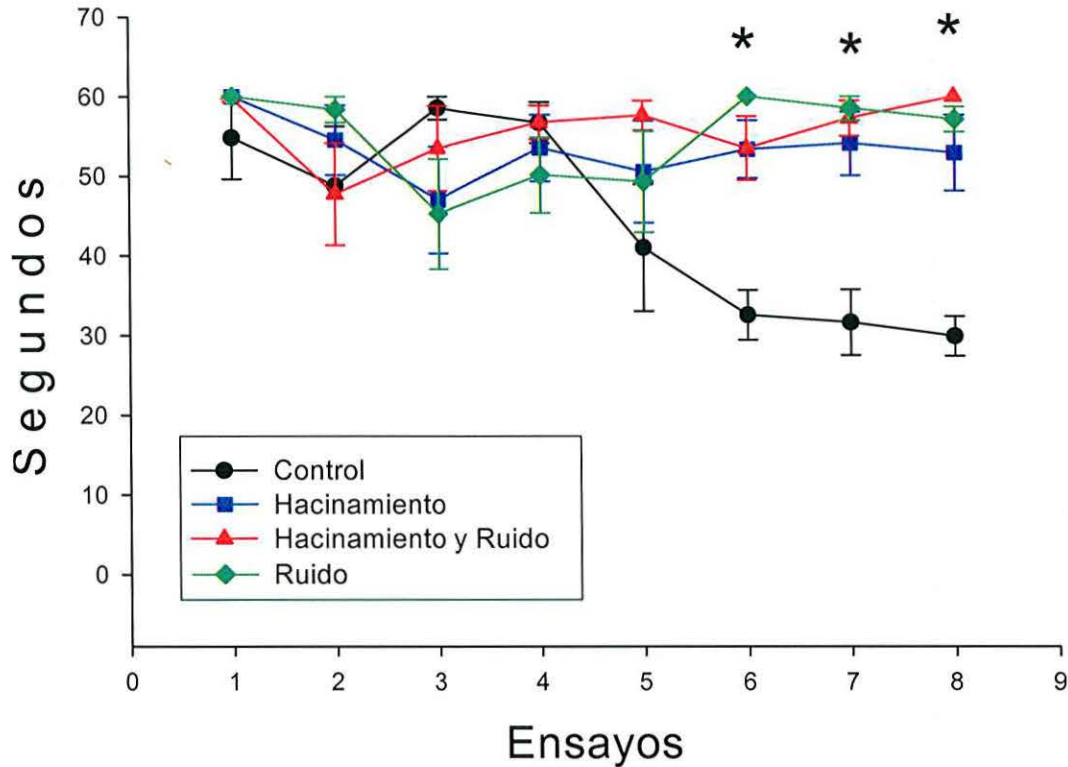


Fig. 6. Medias (\pm SE) de las latencias de escape (tiempo que la rata nada hasta que encuentra la plataforma oculta). Desde el sexto ensayo las diferencias fueron significativas entre las ratas no estresadas y las experimentales, ($p < 0.05$). Los grupos estresados no mostraron diferencias importantes entre sí. * Diferencias significativas en comparación con el control ($p < 0.05$).

Fase de prueba, tiempo en el cuadrante correcto.

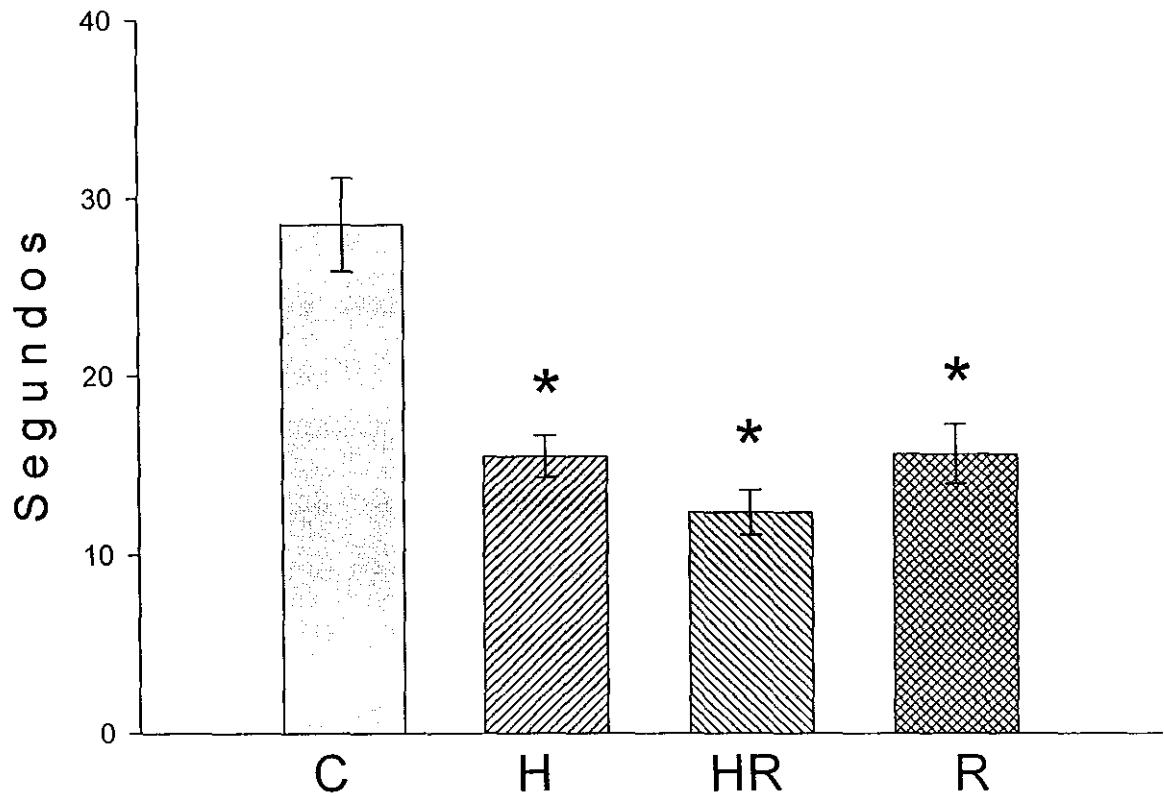


Fig. 7. Tiempo promedio (\pm SE) que las ratas nadaron en el cuadrante donde se encontraba la plataforma. Al parecer no resultaron efectos diferentes por el tipo de estrés. *Diferencias significativas en comparación con el control ($p < 0.05$).

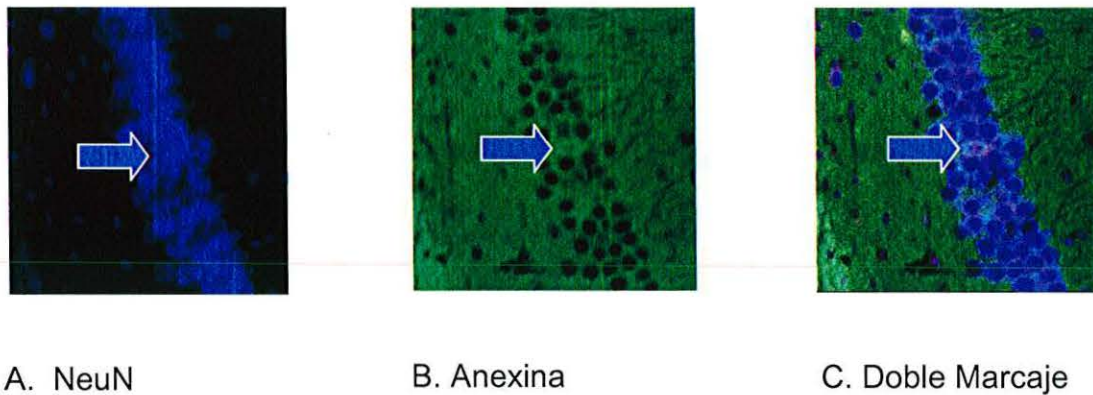


Figura 8. Imágenes confocales en los rangos de onda para anti NeuN (A) y la anexina (B). Fueron contabilizadas como neuronas en apoptosis, aquellas células que presentaban el doble marcaje (C).

De la totalidad de neuronas presentes en el área CA1, sólo HR fue significativamente menor que H y R. Sin embargo, el número de células con doble marcaje (NeuN + anexina) fue mayor en los tejidos de ratas sometidas a ruido, de manera que, en el índice de apoptosis solamente este grupo HR mostró diferencias importantes con el control.

En el DG no se observaron diferencias importantes en el número de neuronas, sin embargo; en el análisis del número de neuronas que mostraron dobles marcas, nuevamente el grupo R reveló los niveles más altos, y fue significativamente mayor a los valores de ratas controles.

En resumen; tanto en CA1 como en DG el índice de neuronas con doble marcaje, es decir; de neuronas con señales de probable apoptosis, fue superior en el grupo de ruido al compararlo con el control, pero no fue diferente de los demás grupos experimentales (Fig. 9).

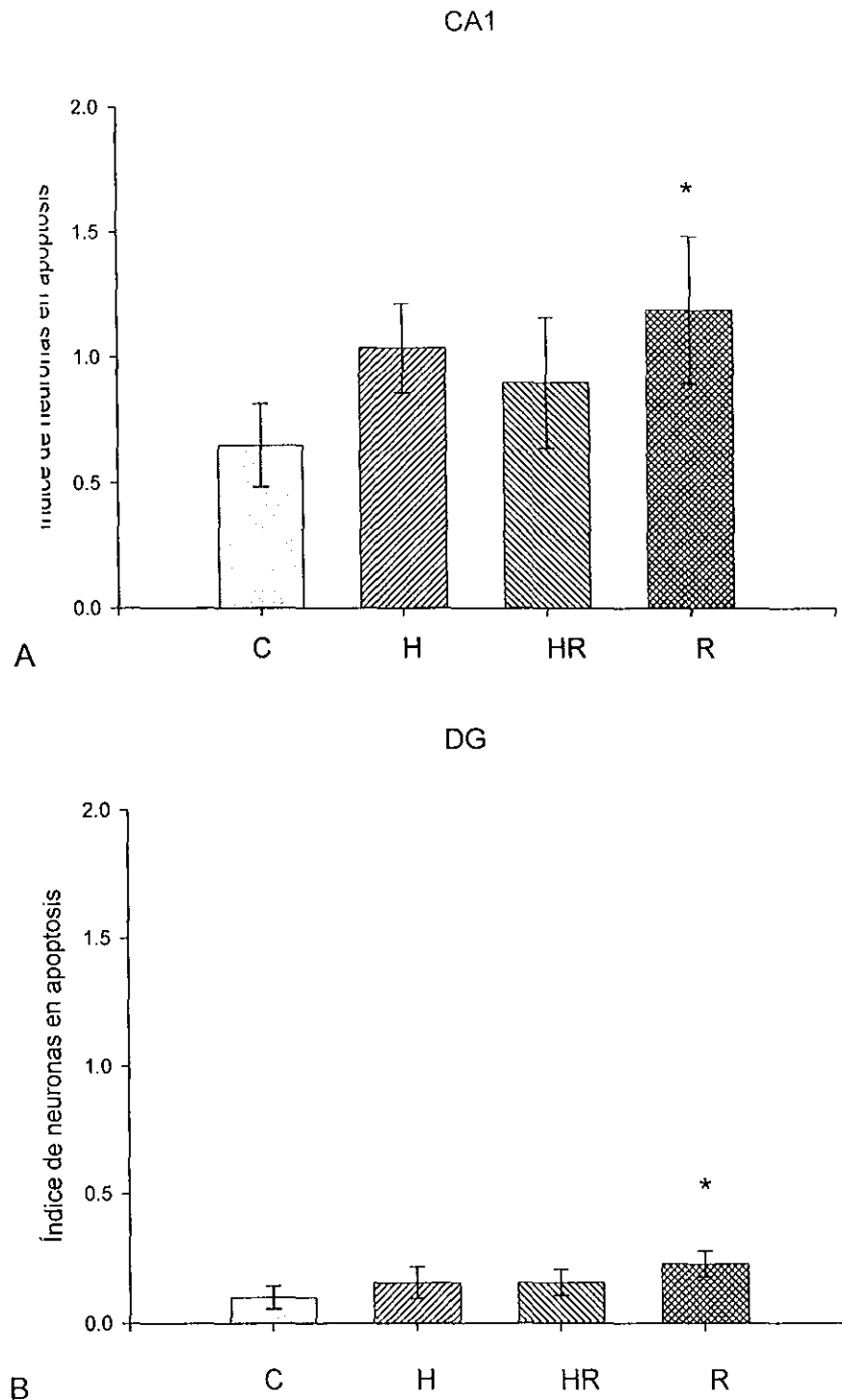


Figura 9. Índice (\pm SE) de neuronas con doble marcaje en el área CA1 (A) y en el giro dentado (B). En ambas áreas, el grupo de animales sometidos a estrés por ruido mostró un mayor índice de colocalización. Hacinamiento y hacinamiento y ruido no mostraron diferencias con el grupo control ni con el grupo de ruido. El índice de este tipo de neuronas fue mucho más bajo en DG. *Diferencias significativas en comparación con el control ($p < 0.05$).

Con el propósito de analizar la relación entre los niveles de corticosterona y el índice de neuronas con señales de apoptosis, se calculó una regresión lineal (Fig. 10), y se encontró un alto grado de asociación entre estas dos variables, lo cual sugiere que son fenómenos que pueden estar relacionados entre sí, aunque no necesariamente de manera causal.

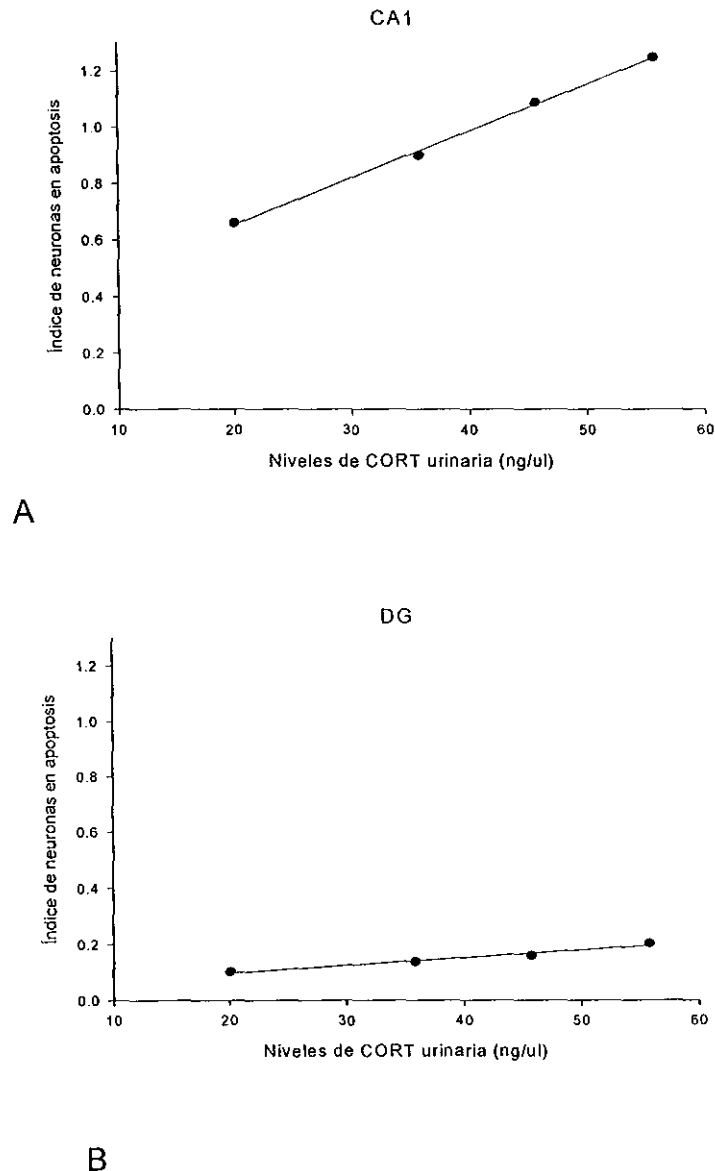


Figura 10. Análisis de regresión entre los promedios por grupo de niveles de corticosterona y el índice de células con doble marcaje en el área CA1(A) $R= 0.95$, $p= 0.001$, y en el área del DG (B) $R= 0.93$ $p= 0.014$.

DISCUSIÓN.

Elevación de los niveles de corticosterona.

Tal como se había reportado previamente en otros estudios similares con ruido por USVs (Commissaris y cols., 2000) y hacinamiento en ratas (Csermely y cols., 1995), las condiciones experimentales generaron una respuesta de estrés, aunque en este trabajo estuvo medido por una clara elevación de los niveles de CORT, y se produjo en un tiempo mucho más corto, que siguió diferente curso temporal, dependiente de cada situación experimental. Por esta razón se puede afirmar que el modelo de estrés social seleccionado para este estudio fue el adecuado para alcanzar los fines propuestos; inducir la elevación moderada, -pero sostenida de CORT, para analizar los efectos de este incremento sobre la integridad neuronal del hipocampo de animales en desarrollo y su manifestación sobre habilidades cognoscitivas. Por lo tanto, la cuantificación de este parámetro permitió comprobar la validez de las condiciones estresantes creadas artificialmente y constituyó un indicador confiable de la potencia del estrés (Black, 1995). Es posible suponer que igual como ha sucedido en otros estudios de características sociales, como la respuesta de confrontación de ratas residentes frente a otras intrusas, en este estudio también se produjo incremento en la actividad del eje HPA (Bhatnagar y Vining, 2003).

Cambios en la CORT del grupo de Hacinamiento

En los animales sometidos al hacinamiento se produjo una rápida elevación inicial de CORT que se redujo hacia la mitad del estudio hasta alcanzar niveles semejantes a los de las ratas controles mantenidas en el espacio estándar (Fig. 3). Estos resultados encuentran apoyo en el conocimiento de que el hacinamiento ha resultado un estresor efectivo en diferentes especies animales (Boranic y cols., 1982;

Hessing y cols., 1993; Csermely y cols., 1995; Aioi, 2001), sin embargo los individuos han estado sometidos a estas condiciones durante largo tiempo para provocarles cambios en la regulación del eje HPA, -entre otros efectos (Hessing y cols., 1993). Al parecer se necesita un tiempo de hacinamiento considerable para desencadenar efectos fisiológicos poderosos (Csermely y cols., 1995).

Al respecto; estudios preliminares sobre las consecuencias del estrés por hacinamiento realizados en este laboratorio, revelaron que después de 40 días se produjo disminución en la cantidad de astrocitos inmunorreactivos para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), de estos; los que proliferaron fueron identificados por inmunomarcaje del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), (Valencia-Alfonso y cols., reporte experimental), esta disminución en la población astrocitaria sugiere que el hacinamiento prolongado produjo inhibición en la expresión de GFAP y de la proliferación astrocitaria. Estos mismos efectos han sido descritos por otros autores como resultado de la elevación de corticosteroides (O'callaghan y cols., 1991; Laping y cols., 1994; Crossing y cols., 1997; Morale y cols., 2001). Sin embargo; en las ratas sometidas a estrés por hacinamiento en este estudio, se produjo una elevación importante de los niveles de CORT en los dos primeros días, semejantes a los de las otras condiciones experimentales, ruido y hacinamiento más ruido, esto demuestra que sucedió una rápida reactividad hormonal ante el hacinamiento, como la que resulta de otros estímulos aversivos como el ruido, los choques eléctricos, la inmovilización y el nado forzado.

Se ha sugerido que puede producirse regulación espontánea de los cambios endocrinos hormonales inducidos por estrés (Spehner y cols., 1996), así mismo, la exposición repetida al mismo estímulo estresante puede inducir habituación, manifestada por normalización de los niveles de CORT (Kant y cols, 1987), lo

anterior podría estar relacionado con los resultados observados para niveles de CORT en los animales sometidos a estrés por hacinamiento, ya que en estos; los niveles de CORT sufrieron un rápido incremento, e igualmente decayeron rápidamente hasta alcanzar niveles basales.

Para explicar esto es necesario tener en cuenta que durante el hacinamiento se generan otros tipos de condiciones estresantes que pueden permitirse o evitarse para intensificar o atenuar los efectos principales de esta situación experimental (Koopman y cols., 1989), entre estas está la restricción en la disponibilidad de alimento y bebida que resulta por la competencia alimenticia cuando los animales tienen acceso a una cantidad limitada de alimento que no se repone, así como las malas condiciones sanitarias que ofrece la cama de una jaula con muchos sujetos, donde se acumulan sus deyecciones que generan olores molestos y un espacio incómodo para echarse cuando no se renueva diariamente, son también importantes las confrontaciones potenciales que resultan por el establecimiento de relaciones de dominancia y sumisión, cuando se mezclan machos provenientes de diferentes camadas y edades.

En este experimento, estas condiciones de estrés adicional fueron evitadas, ya que el alimento y agua estuvieron siempre disponibles a libre acceso y en cantidad suficiente, así mismo la cama se cambió frecuentemente para que estuviera siempre en buenas condiciones, y se asume que el establecimiento de jerarquías y territorialidad fue muy bajo, debido a que por tratarse de animales pre-púberes, no se habían desarrollado completamente estas conductas sociales. Por esta razón hay una mayor certidumbre de haber evaluado específicamente las consecuencias resultantes por la restricción espacial por la competencia que generó la presencia

excesiva de otros individuos de la misma especie. Posiblemente esto fue la causa de que las ratas hayan podido habituarse en poco tiempo a esta situación estresante.

Los resultados obtenidos de este grupo de animales hacinados parecen complementar los hallazgos de de Waal y cols. (2000), en sus estudios se demuestra como las especies sociales pueden disponer de recursos, o ser capaces de adquirir capacidades para tolerar el hacinamiento crónico, especialmente si se trata de primates, pero contrariamente a lo observado en experimentos de este laboratorio, estos autores sugieren que frente al hacinamiento los roedores desarrollan conductas agresivas y puede presentarse. De nuevo, es probable que el modelo haya resultado manejable para las ratas al haber controlado las condiciones estresantes asociadas, aparte de que se trató de sujetos jóvenes, cuya capacidad adaptativa comportamental es mucho mayor que la de sujetos adultos (Rosenweig y Leinman, 1992), consecuentemente no se presentaron comportamientos antisociales o una reacción fisiológica exacerbada, - que se haya manifestado a través de los niveles urinarios de CORT.

Además, el hacinamiento provoca estímulos polimodales con la intervención de diferentes vías sensoriales inespecíficas, lo que puede facilitar su enfrentamiento a nivel fisiológico y comportamental, posiblemente la herencia filogenética haya conferido a los roedores la capacidad para desencadenar respuestas fisiológicas dirigidas a minimizar o abolir sus manifestaciones orgánicas frente al estrés por hacinamiento cuando no está comprometida su supervivencia, mientras que la respuesta será diferente cuando el hacinamiento se acompaña por restricción de agua y alimento, suciedad de la cama y los enfrentamientos para establecer jerarquías, así; en el primer caso solo resulta una alteración transitoria de la respuesta fisiológica.

Finalmente, aunque el hacinamiento es un estímulo utilizado con frecuencia, se ha visto que entre otros diferentes tipos de estrés; hacinamiento, aislamiento, inmovilización y nado forzado, los dos últimos provocaron mayores efectos adversos, lo cual cuestionó la capacidad estresante de los dos primeros (Nagaraja y Jeganathan, 1999), o al menos sugiere que los estímulos estresantes de características sociales pueden provocar efectos más sutiles y difíciles de detectar.

Cambios en la CORT del grupo de Ruido

Por otra parte, en varios experimentos se ha demostrado que el ruido es un estímulo estresante potente (Mollenauer y col, 1992; Van Raaij y col, 1997; Arcana y Navasivayam, 1999). En este caso, los animales expuestos a ruido por vocalizaciones ultrasónicas (USVs) artificiales también incrementaron rápidamente los niveles de CORT, como ha sido reportado anteriormente en otros estudios (Blanchard y cols., 1991; Commissaris y cols., 2000). La elevación de corticosterona persistió durante el periodo de exposición al estrés, contrariamente a las tendencias observadas para las demás condiciones experimentales, en las que se produjo un incremento seguido de descenso y hasta la normalización (Fig. 3).

Esta mayor potencia del estrés por ruido puede explicarse con base en el carácter unimodal de esta estimulación aversiva, ya que la vía auditiva constituye una herramienta fundamental para la supervivencia de roedores y posee una vía neuronal muy específica con niveles de habituación muy bajos, dada su importancia adaptativa. Lo anterior ha sido demostrado en experimentos con roedores, en los que las USVs artificiales pueden desencadenar comportamientos de defensa (Beckett y cols, 1996) similares a los inducidos por estimulación química o eléctrica en la sustancia gris periacueductal (carreras, saltos y congelamiento), y el colículo superior

(estrechamente relacionado con la función auditiva) (Savvas y cols, 2000). Además, en ratas el colículo inferior parece estar relacionado con la conducta de defensa, pues su estimulación genera incrementos en la locomoción, exaltación y saltos, así como incrementos en la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca. (Commissaris y col, 2000; Brandao y cols., 1994; Maisonette y cols., 1996).

Con base en lo anterior, es fácil suponer que la importancia biológica y la especificidad de esta vía, constituyen factores que hacen muy difícil la respuesta de habituación al ruido. Además, la estimulación de las USVs no fue constante, sino por periodos fijos de 30 min. que variaban aleatoriamente durante el ciclo nocturno de actividad, lo cual dificultó aun más que se haya producido habituación.

Cambios en la CORT del grupo de Hacinamiento y ruido

Otro de los objetivos principales de este estudio consistió en analizar los efectos de la exposición a hacinamiento, ruido o a ambos estímulos juntos, en el grupo de ratas mantenidas bajo estas últimas condiciones se encontraron los niveles más altos de CORT. No obstante que no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de CORT de este grupo y los de los otros grupos de animales estresados por hacinamiento o ruido, (a excepción del día 26), el curso temporal sugiere que, al inicio de los experimentos se encontraron más elevados los niveles de CORT posiblemente debido al sinergismo de las dos condiciones estresantes (Fig. 3), pero posteriormente se redujeron los niveles en la misma etapa en que se normalizaron los niveles de CORT del grupo sometido a hacinamiento. Lo anterior sugiere que se había iniciado la habituación.

Al parecer en este grupo HR la posible adaptación al hacinamiento redujo la potencia sinérgica con el ruido observada al principio, sin embargo se produjo

decremento de los niveles de CORT aun por debajo de los niveles de las ratas estresadas por exposición al ruido. Sería necesario analizar las tendencias en las fluctuaciones del nivel de esta hormona a más largo plazo, para tener una comparación más acertada de los efectos separados y combinados de las dos situaciones estresantes. Podría haber sucedido que; la habituación al hacinamiento en el grupo HR, generó herramientas fisiológicas para minimizar los efectos nocivos del ruido, ya que al final del experimento se observó una tendencia de disminución en los niveles de CORT de las ratas estresadas por hacinamiento y ruido. Esta propuesta corresponde a la hipótesis de la desesperanza aprendida; -la exposición a situaciones adversas tolerables (como el hacinamiento), puede favorecer una mejor adaptación conductual y fisiológica a situaciones intolerables o inescapables (como el ruido) (Domjan, 2000).

Es importante señalar que en este estudio se recolectó la orina de un modo distinto a como regularmente se hace en otros estudios de comportamiento o de nutrición (Página 47), en este experimento los sujetos se mantuvieron juntos todo el tiempo, -para evitar el sesgo que hubiera podido resultar por el aislamiento en jaulas metabólicas individuales que tienen un dispositivo en el fondo para recolectar las heces y la orina por separado, por lo que así puede calcularse la cantidad de alimento ingerida. Dadas las condiciones experimentales propuestas para este estudio no fue posible utilizar las referidas jaulas, el que se haya realizado la recolección conjunta de las muestras de orina podría explicar la variabilidad intraensayo observada, ya que la determinación de los niveles de CORT se hizo a partir de mezclas de orina provenientes de distintos animales.

En conclusión; la concentración de CORT urinaria se incrementó significativamente en todos los grupos de ratas estresadas, pero sólo en las ratas

sometidas a hacinamiento se produjo habituación. Esto sugiere que la restricción del espacio vital por si misma resulta sencilla de enfrentar, en ausencia de los elementos estresantes asociados.

Las ratas expuestas a ruido conservaron estable el incremento inicial de CORT, e inclusive revelaron una tendencia a elevarse hacia el final del periodo de 10 días, esto sugiere la incapacidad de estos animales para inhibir las consecuencias del ruido semejante a vocalizaciones ultrasónicas, posiblemente por la gran importancia de la vía auditiva para la supervivencia de los roedores. El curso temporal de los niveles de CORT en las ratas sometidas a los dos estímulos estresantes juntos (H + R); -un notable incremento inicial seguido de un decremento con tendencia a disminuir aun por debajo de los valores de R, podría sugerir que la probable habituación a H, de alguna manera facilitó un mejor enfrentamiento de R.

Retardo en las medidas somatométricas.

Ya ha sido descrito que los individuos estresados, -especialmente aquellos en desarrollo temprano, sufren retraso del crecimiento corporal, manifestado por menor peso y tamaño, y este retraso se relaciona con el aumento de corticosteroides (Albonetti y Farabollini, 1994; Aioi, 2001). Sin embargo, no son claros los mecanismos exactos a través de los cuales están implicadas estas hormonas ya que éste puede deberse a anorexia, absorción y metabolismo deficiente de nutrientes, o la alteración de procesos hormonales durante el desarrollo, como retraso de la pubertad o la inhibición de la hormona del crecimiento (Merkus y cols., 1993; Consten y cols., 2002).

A partir del noveno día de exposición al estrés, cuando las ratas tenían 29 días de edad, y durante las pruebas conductuales en que ya tenían 31 y 32 días de edad,

se manifestó un retardo evidente en el desarrollo postnatal, mismo que concuerda con lo reportado en otros estudios con ratas, en los que; altos niveles de estrés provocaron reducción de las dimensiones corporales generales y de algunos órganos (Aioi, 2001).

También se ha observado que el incremento en los niveles de corticosteroides circulantes de origen endógeno o exógeno en ratas retrasa el crecimiento fetal (Cliver y cols., 1992) el desarrollo posnatal (Benesova y Pavlik, 1989), y el peso del cerebro (Matthews y Challis, 1996). También el estrés social en ratas puede provocar alteraciones somatométricas (Meerlo y cols., 1999) y en humanos, los trastornos del peso corporal pueden ser indicativos de estrés social crónico, especialmente de características familiares (Montgomery y cols., 1997).

Al respecto, los factores nutricionales tienen una participación directa en el desarrollo posnatal cerebral, lo que puede resultar una menor cantidad final de neuronas. Recientemente Okado y cols., (2001) encontraron que factores ambientales como la nutrición afectan la concentración cerebral de aminas biogénicas, estrechamente relacionadas con la plasticidad neuronal y glial, durante la etapa de mielinización de las diferentes regiones del cerebro son particularmente importantes oligodendrocitos y células de Schwann. Además, la restricción alimentaria puede incrementar la neurogénesis en el DG de ratones, de tal forma que las nuevas células exhiben fenotipos de neuronas y astrocitos (Lee y cols., 2002).

En este estudio, las condiciones obligadas de alojamiento no permitieron analizar el consumo de alimento para calcular el "protein efficiency ratio", -medida estándar para conocer la eficiencia de conversión alimenticia, que permite saber si los animales no aumentaron de peso porque comían menos o porque comían lo

normal pero su eficiencia metabólica estaba disminuida. Por esta razón, debe considerarse la posibilidad de que los resultados de disminución en la población neuronal, pudieran deberse a factores nutricionales, más que al incremento de glucocorticoides.

A pesar de esto, no se ha demostrado que la corticosterona por si misma tiene relación con la sensación de hambre (Kunihara, 1984), y debe tenerse en cuenta que la mayoría de los experimentos de estrés y nutrición consistieron en restricciones temporales de la disponibilidad del alimento, lo que no sucedió en este estudio. En los animales con privación alimenticia naturalmente se incrementan los niveles de glucocorticoides circulantes de manera que, los hallazgos que relacionan la restricción de alimento con los cambios en la población celular cerebral pueden estar mediados por estas hormonas esteroides.

También es importante considerar que algunos de estos estudios de restricción nutricional se basan en la privación, o la disminución del contenido de los distintos nutrientes que conforman una dieta balanceada (proteínas, vitaminas, minerales o carbohidratos). En el presente estudio, no se modificó el contenido nutricional del alimento ni su disponibilidad, en ninguno de los grupos de ratas estresadas. Al respecto; en el manejo del alimento no se percibieron diferencias del volumen consumido entre los diferentes grupos de animales, por lo que se puede afirmar que, a través del estudio las ratas no dejaron de comer de forma evidente.

Finalmente, la alta correlación entre el peso y talla corporales en cada grupo sugiere que, las consecuencias somatométricas de retardo en el desarrollo pudieron deberse a variables fisiológicas y globales, incluyendo factores metabólicos y hormonales. No obstante que en este estudio se carece de los elementos necesarios

para explicar la detención en la curva de ganancia de peso de las ratas en desarrollo, el registro de estos parámetros corporales permitió obtener una medida indirecta del nivel de estrés en cada grupo, sin que se manifestaran diferencias entre las tres diferentes condiciones estresantes; hacinamiento solo, ruido semejante a vocalizaciones ultrasónicas y la suma de ambos, sin embargo; es evidente que los valores somatométricos no son indicadores confiables para inferir la severidad de los estímulos estresantes, ya que el análisis de los niveles de CORT reveló diferencias importantes entre los diferentes grupos de animales.

El retardo en la curva de desarrollo que resultó en las ratas jóvenes estresadas evidenció la efectividad de las situaciones estresantes provocadas artificialmente, por lo que resultó de gran utilidad para la interpretación de los diferentes tipos de resultados obtenidos de la aplicación de pruebas conductuales e inmunohistoquímicas. Para aumentar la comprensión sobre la reversibilidad y consecuencias permanentes de este fenómeno sería necesario realizar una evaluación longitudinal y diferencial de estos parámetros con mayor duración, pues probable una vez suprimido el estrés los animales sean capaces de alcanzar un alto grado de recuperación, o la recuperación completa.

En resumen; aunque la relación entre glucocorticoides y somatometría es ya bien conocida desde hace muchas décadas, todavía se desconocen los mecanismos exactos de acción. Es indudable que la nutrición desempeña un papel importante en el desarrollo cerebral y cognoscitivo, sin embargo, aunque en este estudio no fue cuantificada la cantidad de alimento consumido es evidente que la exposición a las condiciones estresantes impuestas estuvo acompañada de alteraciones endocrinas, - particularmente de los niveles de corticosteroides. De esta forma, las alteraciones somatométricas observadas sugieren la ocurrencia del estrés experimental como un

fenómeno fisiológico global, con manifestaciones distintas, mismas que no fueron analizadas en su totalidad con las técnicas utilizadas en este trabajo.

Daño neuronal.

Las acciones del estrés y los glucocorticoides (GCs) en el cerebro son paradójicas; para el desarrollo cerebral normal supervivencia neuronal y plasticidad se requieren niveles basales de GCs (Reagan y McEwen, 1997), estos controlan el balance entre neurogénesis y apoptosis que normalmente sucede en muchas especies al actuar sobre receptores nucleares, (Gould y cols., 1991; Lupien y McEwen, 1997; Sastry y Rao, 2000). Sin embargo, así como la adrenalectomía genera apoptosis en el hipocampo por ausencia de GCs (Greiner y cols., 2001; Wossink y cols., 2001), su elevación excesiva también puede resultar neurotóxica y desencadenar apoptosis en neuronas del hipocampo (Smith y col, 1995), especialmente relacionada con la concentración anormal de aminoácidos excitatorios (Lipton y Rosenberg, 1994; Reagan y McEwen, 1997; Wang y cols, 1999), para este fenómeno son especialmente sensibles las neuronas hipocampales, debido a que poseen una alta densidad de receptores a corticosteroides, (Sapolsky, 1996).

La interpretación de los resultados obtenidos en este estudio está basada en la asociación entre la respuesta de individuos en desarrollo frente a situaciones de estrés de características sociales, el incremento de glucocorticoides - específicamente de corticosterona y el índice de apoptosis neuronal en el hipocampo, para este propósito se seleccionó la técnica de anexina, que se fundamenta en el hecho de que, al inicio del proceso apoptótico, la proteína membranal fosfatidil-serina pasa de la superficie interna de la membrana celular a la cara externa de la misma. Esta expresión permite marcar células que han empezado

un proceso apoptótico temprano con el compuesto Anexina, que se fija a la fosfatidil-serina expresada en el exterior de la membrana (Barroso y cols., 2002).

Los resultados indican que, de las condiciones estresantes experimentales, el ruido por USVs tuvo un impacto significativo sobre el porcentaje de células marcadas con Anexina, indicativa de probable apoptosis. En este grupo además se produjo un incremento sostenido en los niveles de corticosterona urinaria, con tendencia a elevarse hacia el final del experimento. El hecho de que el ruido fuese la única condición en la que se indujo apoptosis neuronal sugiere que resultó el estímulo más potente, reflejado en los niveles de corticosterona (Fig. 3), posiblemente al tratarse de una vía sensorial específica.

Actualmente, los modelos de estudio que relacionan de manera más directa los glucocorticoides con la muerte neuronal por apoptosis o necrosis han sido el daño agudo isquémico, neurotoxicidad, envejecimiento y la aplicación exógena de hormonas (Gould, 1991). En la aplicación exógena de niveles suprafisiológicos del glucocorticoide la apoptosis es casi siempre aguda (Angelucci, 2000), lo mismo con corticosteroides sintéticos como la dexametasona (Haynes y cols. 2001; Haynes y cols. 2003). Sin embargo, además de este estudio, no existen otros reportes que vinculen condiciones de estrés social crónico como hacinamiento y USVs artificiales, con la muerte neuronal por apoptosis.

Estos resultados están acordes con los hallazgos de otro experimento que estableció una relación indirecta entre estrés social y apoptosis; la exposición crónica a estrés por intimidación exacerbó el daño producido por isquemia, y disminuyó notablemente la expresión del gen antiapoptótico bcl-2, lo que demuestra la participación de mecanismos moleculares de neuroprotección ante eventos

isquémicos. Sin embargo, la originalidad del diseño utilizado en este estudio consiste en que permitió vincular directamente la condición estresante –de componentes sociales- con el daño neuronal.

Hasta ahora las USVs artificiales como factor de estrés no habían sido relacionadas con procesos apoptóticos, aunque si se ha descrito que otros tipos de ruido producen apoptosis. El ruido crónico afectó las proteínas neurofilamentosas en neuronas hipocampales, incrementó la expresión de productos del gen c-Jun (importante en la iniciación de muerte neuronal) (Saljo y cols., 2001), y elevó los niveles de apoptosis (Saljo y cols., 2002). Sin embargo este ruido fue utilizado en niveles de alta intensidad entre los 198 y 202 dB, en comparación con el nivel intermedio-alto de 80-90 dB utilizado en este estudio.

Hasta el presente se puede afirmar que este es el primer experimento que vincula ruido crónico de características sociales, con indicios de apoptosis en el hipocampo, sin embargo; debido a que no fueron analizadas otras regiones cerebrales, no es posible afirmar que ellas no resulten afectadas. Al tomar en consideración que la frecuencia del ruido ultrasónico utilizada en este experimento puede conllevar un significado social, no es posible afirmar que la apoptosis se debió -al menos en parte-, a las características sociales de comunicación del estímulo auditivo, o al simple efecto perturbador del ruido, para contestar a esta pregunta sería necesario reproducir en paralelo otros experimentos con frecuencias fuera de las de posible significado social.

Por otra parte, en las ratas continúa incrementándose el número total de células granulares del hipocampo durante el primer año de vida (Bayer y cols., 1982), aunque la etapa principal de la neurogénesis sucede durante los primeros días

postnatales. Entre los días 1-21 posnatales se desarrolla la mayoría de las neuronas granulares hipocampales y extienden sus axones (las fibras musgosas) para inervar las neuronas piramidales del área CA3 (Amaral y Dent, 1981), mientras que los periodos posnatales más importantes de desarrollo dendrítico y sináptico hipocampal, tienen lugar entre los días 4-12 y 11-25 respectivamente (Fricke y Cowan, 1977).

Al considerar lo anterior, cabe la posibilidad de que la apoptosis observada haya sido producto de un retraso en el desarrollo normal de conexiones y sobrevivencia neuronal, sin que necesariamente implique daño en estructuras cerebrales parcialmente desarrolladas o maduras, tras una crisis catabólica. Es probable que este fenómeno de apoptosis sea el resultado de la combinación de ambos factores; pudo haberse alterado catabólicamente el desarrollo y la inervación, que se había completado el día 21 después del nacimiento y además puede haber ocurrido una interrupción o alteración del desarrollo sináptico y dendrítico que sucede de aquí en adelante. Sin embargo, no se estudiaron criterios morfológicos ni funcionales indicativos de maduración cerebral, como pudiera ser la evaluación de destrezas motoras (Gharbawie y Whishaw 2003), niveles de hormonas esteroideas (Terpstra y cols., 2003; Kezele y Skinner 2003), o las características de las interconexiones sinápticas y morfología de las diferentes clases de sinapsis (Amaral y Dent, 1981), ya que no fue motivo de este estudio analizar si se produjo retardo de la maduración cerebral.

Las secreciones de glucocorticoides adrenales tienen un fuerte y conocido impacto sobre el desarrollo cerebral y la plasticidad del sistema nervioso (Brunson y cols., 2003), pueden afectar el desarrollo hipocampal al influenciar de manera directa o indirecta el balance de la neurogénesis y la apoptosis en muchas especies (Gould

y cols., 1991) tanto durante la etapa prenatal (Chao y McEwen, 1994) como la postnatal ((Bayer y cols., 1982; Greene y col, 2001).

En cuanto a los resultados obtenidos de los demás grupos de ratas sometidas a estrés por hacinamiento o por hacinamiento y ruido, con el primero no se observó un número importante de neuronas que mostraran signos de apoptosis (colocalización de dos marcas) y tampoco existe ningún reporte que haya logrado relacionar este factor de estrés con apoptosis neuronal. Como sugieren los registros de corticosterona, el hacinamiento fue un estímulo con poco impacto a nivel neuronal, tal vez debido a que se produjo habituación, evidenciada por el descenso de los niveles de corticosterona urinaria (Fig. 3).

Tampoco la exposición simultánea al hacinamiento y ruido provocó apoptosis en el hipocampo, probablemente la habituación al primero favoreció una adaptación al ruido, como lo muestran los niveles de corticosterona urinaria (Fig. 3). Hacia el final de los experimentos disminuyeron los niveles del glucocorticoide en este grupo, razón por la cual es posible suponer que las señales detectadas de apoptosis no dependieron del incremento de CORT. Debido a que la anexina es un indicador de apoptosis temprana, es posible que el proceso de muerte neuronal haya apenas empezado alrededor del momento en que fueron sacrificados los animales por perfusión intracardiaca al día 32 de edad para fijar su cerebro, y que por lo tanto la apoptosis esté relacionada con los niveles de CORT registrados al final de la etapa de recolección de muestras de orina. La regresión entre los niveles de corticosterona en las últimas muestras y el porcentaje de neuronas con señales de apoptosis corrobora esta suposición, ya que resultaron altos niveles de correlación entre ambas variables. Esta relación hace suponer que el incremento en los niveles de CORT pudo haber contribuido a provocar un retardo en la maduración cerebral, -durante la

cual normalmente se produce una etapa de remodelación mediada por apoptosis, aunque también puede haber resultado afectada la población neuronal madura.

Esta suposición encuentra apoyo en el hecho de que no se observaron células necróticas en ninguna de las preparaciones analizadas, provenientes de ratas controles y sometidas a las diferentes situaciones de estrés. Una posible explicación de esta ausencia de células en necrosis es por los efectos de los corticosteroides, que se han relacionado con daño apoptótico,

El índice de apoptosis fue 10 veces menor en el DG que en la zona CA1, pero esto obedece a que el porcentaje de células con doble marcaje; anti Neu-N y anexina es una medida relativa resultante de dividir el número de neuronas inmunopositivas para anexina, entre el número total de neuronas/campo. Así, la frecuencia absoluta de neuronas en DG es mucho más alta, lo cual hace que se reduzca la frecuencia relativa de neuronas con señales de apoptosis. Sin embargo, este resultado también indica que el número de neuronas marcadas con anexina fue muy similar en las zonas CA1 y DG, independientemente de su diferente densidad de población neuronal.

Finalmente, aunque en la mayoría de los estudios de apoptosis se requiere realizar diferentes tipos de técnicas para corroborar de manera confiable la ocurrencia de un proceso apoptótico, existen bastantes reportes de la literatura (Gould y cols., 1991; Reagan y McEwen, 1997; Almeida y col, 2000) que sugieren que la muerte neuronal por apoptosis está relacionada con niveles elevados de corticosteroides, lo cual constituye una de las propuestas en este experimento.

De todo lo anteriormente señalado es posible concluir que los GCs y el índice de neuronas en apoptosis estuvieron relacionados directamente, esto sugiere que la exposición a ruido semejante a USVs influyó para incrementar la muerte neuronal apoptótica programada en las zonas CA1 y DG, como consecuencia del incremento de corticosterona. Este es el primer reporte que establece una firme vinculación entre el estrés generado por USVs, y neuronas con señales de apoptosis temprana en el hipocampo, sin poder demostrar si este efecto fue consecuencia de las connotaciones sociales de este tipo de ruido, o simplemente por el malestar causado por el mismo, -sin significancia social.

Estudios del comportamiento.

Campo de agujeros (Hole Board) y conducta exploratoria.

Este instrumento fue diseñado para medir la conducta exploratoria de ratas y ratones, la parte central del campo de agujeros funciona de manera similar al área central de la prueba de campo abierto; en ella las ratas con mayor ansiedad prefieren la zona periférica a la central, al parecer con el propósito de resguardarse, aunque este comportamiento también puede indicar un déficit de atención (Lordi y cols., 2000). Por lo tanto, para este estudio era de esperarse que los animales efectuaran una menor cantidad de visitas centrales, en comparación con las periféricas, lo cual depende de las situaciones previas a las que hayan estado expuestos.

Por otro lado, el tiempo de movilidad refleja la excitabilidad de los individuos, variable que puede verse afectada por los niveles de estrés (de Kloet y cols., 2000). En este estudio, el análisis de los valores resultantes de las visitas centrales y el tiempo de movilidad reveló diferencias entre grupos, pero no hubo diferencias entre ellos para las demás variables estudiadas. Estos resultados del campo de agujeros indican que los sujetos pertenecientes a los cuatro grupos exploraron el campo en

forma semejante, pero con patrones distintos, en cuanto a su nivel de activación y al área explorada.

Lo anterior puede interpretarse como un incremento en la ansiedad de los sujetos previamente sometidos a estrés, manifestado por un menor número de visitas centrales, este comportamiento ha sido observado en ratas expuestas al olor de gato (Zangrossi y File, 1992). Es fácil suponer que esta ansiedad se deba en gran parte al aumento de los niveles de corticosterona generados por la activación del eje HPA, puesto que ambos, hacinamiento y ruido, se encuentran relacionados con su elevación (Beckett y cols., 1996; Boranic y cols., 1982; Commissaris y cols., 2000; Neophytou y cols., 2000).

Al exponer a los animales estresados a la situación novedosa inherente a esta prueba se observó un incremento en su excitabilidad, manifestada por un incremento en el tiempo de movilidad. Este incremento de la actividad locomotriz también ha sido previamente reportado como consecuencia de la elevación de niveles de COR en roedores (de Kloet y cols., 2000).

En la mayoría de estudios sobre las consecuencias del estrés se ha reportado disminución de la conducta exploratoria (Takeda y cols., 1999; Tsuji y cols., 2000; Adamec, 2001), así mismo, puede provocarse la reacción opuesta por el uso de ansiolíticos, tras la confrontación con una situación estresante (Rowan y cols., 1990; Pokk y Zharkovsky, 1998). La mayoría de los experimentos sobre estrés y patrones de exploración se han realizado con el uso de modelos de estrés agudo de tipo no social y estos proponen que la ansiedad tiene una influencia importante sobre esta (Boranic y cols., 1982; Hessing y cols., 1993; Csermely y cols., 1995; Aioi, 2001), y ratas. Sin embargo; algunos autores sugieren que la disminución en la motivación

para la exploración no siempre está relacionada con los niveles de ansiedad (Adamec, 1990).

Los estudios que relacionan estrés social y conducta exploratoria, sugieren también que el resultado es una tendencia a la inhibición de este comportamiento, se ha observado que el contacto visual con sujetos extraños, decrementa la actividad exploratoria en primates (Habib y cols., 2000) y que la exposición de vacas no estresadas a claves sociales en la orina de vacas estresadas reduce la exploración de objetos novedosos con los que se ponen en contacto (Boissy y cols., 1998). Además; el estrés social por enfrentamiento entre residentes e intrusos inhibe la actividad exploratoria en ratas (Heinrichs y cols., 1994). Sin embargo, en otros estudios de estrés por derrota social en ratas no se observaron estos cambios (Albonetti y Farabollini, 1994). Los resultados obtenidos de este estudio para actividad exploratoria difieren de la literatura revisada en el sentido de que ésta no se redujo, pues todos los grupos tuvieron la misma cantidad de visitas totales y la misma frecuencia relativa de visitas/min, pero con diferente distribución entre las zonas central y periférica. Es probable que la diferencia en estos resultados se deba a que el campo de agujeros evalúa un rango de dimensiones más amplio que otras pruebas, como la de campo abierto para medir la conducta exploratoria, aparte de que, hasta el momento no habían sido testados los mismos estímulos estresantes y mucho menos de manera sub-crónica.

En la revisión bibliográfica realizada no fue posible identificar otro tipo de estudios que asocien el hacinamiento con estados de ansiedad o excitabilidad, a través del análisis de la conducta exploratoria. Sin embargo; en algunos estudios parecidos, el alojamiento en grupos (no necesariamente hacinamiento) provocó efectos opuestos, como decremento en la actividad general, o manifestaciones

distintas, como descenso en la exploración y tiempo dispensado en el área central (Faraday y cols., 1999), al respecto; es importante aclarar que estos resultados fueron obtenidos con el uso de la prueba de campo abierto, que ofrece un ambiente novedoso menos complejo que el campo de agujeros.

Por su parte el ruido impredecible y predecible de intensidad moderada (68dB), disminuyó por igual la actividad exploratoria (Prior, 2002), aunque previamente otros experimentos demostraron la ausencia de efectos del ruido sobre el comportamiento en el campo de agujeros (Armario y cols., 1991).

La posibilidad de que los cambios en la exploración (visitas centrales versus periféricas) y excitabilidad (tiempo de movilidad versus inmovilidad) estén relacionados con las diferencias observadas en el porcentaje de neuronas con signos de apoptosis en el hipocampo, parece poco probable; ya que, el grupo de ratas sometidas a estrés por ruido fue el único que mostró diferencias importantes en esta variable, y sin embargo, el resto de los animales estresados por hacinamiento o por hacinamiento y ruido mostraron cambios en dichos patrones de exploración.

Lo anterior sugiere que la alteración conductual dependió del incremento en los niveles de glucocorticoides y la reacción fisiológica frente a cada una de las tres diferentes situaciones estresantes, ya que a pesar de que se produjo elevación variable de los niveles de corticosterona, en todos los animales se manifestaron alteraciones conductuales. Además; existen evidencias de que el déficit cognoscitivo generado por el estrés no necesariamente está relacionado con pérdida de neuronas en el hipocampo, lo más probable es que sucedan cambios más sutiles, - evidenciados por modificaciones de la interconectividad sináptica (Sousa y cols., 2000).

En resumen; no se dispone de otros artículos que hayan estudiado alteraciones en funciones cognoscitivas como memoria espacial y conducta exploratoria en animales sometidos a estrés social, ruido por USVs, o hacinamiento. La mayoría de las investigaciones sobre estrés y conducta exploratoria se han realizado con el uso de modelos de estrés agudo de tipo no social (Oitzl y de Kloet, 1992; Lupien y McEwen, 1997; Haller y cols., 1998; McEwen y cols., 1998; Raber, 1998), y solamente unas cuantas han empleado estrés social agudo en otras especies, en individuos adultos o simplemente se ha provocado estrés social de características diferentes a las de este estudio (Manuck y cols., 1991; Meerlo y cols., 1999; McCabe, 2000; Kovach y cols., 2001)

En general; la mayor parte de los resultados obtenidos de diferentes estudios sugieren que, el estrés decrementa la actividad exploratoria y la movilidad en ambientes novedosos. Sin embargo, en este estudio el estrés social sub-crónico incrementó el tiempo de movilidad y se mantuvieron los niveles de exploración entre los tres diferentes grupos de ratas estresadas, aunque distribuidos de manera distinta, ya que aunque los grupos experimentales visitaron con menos frecuencia el centro de la tabla, pasaron el mismo tiempo en esta área que los controles (Fig. 5).

Finalmente, no parece haber una relación directa entre el índice de neuronas hipocampales con signos de apoptosis y los cambios comportamentales y cognoscitivos, es más probable que estos hayan resultado por la desestabilización del eje HPA y su sistema de retroalimentación, así como por la elevación en los niveles circulantes de corticosteroides y otras hormonas. También es posible que las pruebas seleccionadas para este estudio no poseen la sensibilidad suficiente para hacer evidentes las alteraciones neuronales.

Laberinto acuático de Morris (MWM) y memoria espacial.

El laberinto acuático de Morris es una de las pruebas más usadas para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en roedores. Este tipo de memoria, por su relación con la estructura del hipocampo, constituye una analogía del sistema de memoria declarativa tan importante para los humanos. En general, se intenta detectar alteraciones en el aprendizaje, es decir durante la *fase de entrenamiento*, para evaluar la función mnemónica de adquisición del hipocampo; y cambios en la memoria, durante la *fase de prueba*, con el fin de medir la función de consolidación.

Los hallazgos de este estudio revelaron un déficit en los procesos de adquisición; -las ratas de los grupos experimentales, independientemente de la situación estresante en las que se habían mantenido-, mostraron latencias de escape más altas que las ratas controles. Estas latencias de escape no disminuyeron a lo largo del entrenamiento, mientras que las latencias de animales controles disminuyeron progresivamente (Fig. 6).

Por otra parte, las ratas experimentales también mostraron bajos puntajes durante la etapa de prueba, del tiempo que navegaron en el cuadrante donde se encontraba la la plataforma. Este hallazgo, no indica necesariamente una falla en los procesos de consolidación que vinculan hipocampo y corteza, ya que al no haber evidencia del proceso de adquisición, hubiera sido difícil encontrar algo distinto en la consolidación, es decir; que si no hubo aprendizaje, difícilmente habrá algo que memorizar, así; -no puede recordarse con precisión lo que no fue completamente aprendido-.

En una gran variedad de estudios, el estrés crónico, los glucocorticoides y las alteraciones del hipocampo producen déficit en la memoria y el aprendizaje espacial (Keenan y cols., 1995; McEwen y Sapolsky, 1995; McGaugh y cols, 1995; Lupien y McEwen, 1997; McEwen y cols, 1998; Raber, 1998; de Kloet y cols, 1999; McEwen, 1999; de Kloet, 2000; McEwen, 2000). La estimulación aversiva social provoca resultados similares. Se ha observado un impedimento de la memoria y el aprendizaje espacial, con supresión de la LTP en el DG y decremento de la plasticidad hipocampal en ratas sometidas a estrés social crónico durante 21 días (Ma y cols., 2000).

Al respecto; los resultados obtenidos de un estudio con estrés social crónico mostraron que, en algunos casos este tipo de estrés podía tener un fuerte impacto sobre las habilidades cognoscitivas evaluadas en el MWM, mientras que la administración de glucocorticoides no produjo estos mismos impedimentos (Bodnoff y cols., 1995). Sin embargo es necesario ser cautelosos con los efectos cognoscitivos del estrés social, pues Frisone y cols., (2002) observaron déficit en la ejecución del MWM alrededor del destete en ratas sometidas a aislamiento durante su infancia, ya que éstas mostraron un aprendizaje más rápido en la adultez, lo cual sugiere probabilidades de recuperación o incluso de rebasar los niveles previos de aprendizaje y memoria.

De nuevo se hace notar que son escasos los estudios que relacionan los efectos nocivos del hacinamiento con la memoria declarativa o la memoria espacial. Existe un estudio en *Drosophila*, en el cual las condiciones de alojamiento, que incluían un exceso de individuos, disminuyeron las habilidades de memoria en pruebas para la mosca (Barth y Heisenberg, 1997). Por otro lado; en humanos, la densidad y número de personas tuvo efectos en percepción del medio ambiente,

pero no en la memoria (Leventhal y Matturro, 1980), estos resultados sugieren que en los estudios de hacinamiento debe permitirse que sucedan las condiciones nocivas asociadas (alimentación, camaje, relaciones de sumisión), sin considerarles factores independientes, lo que no sucedió en este estudio.

De manera similar; tanto el ruido como las USVs, han sido poco estudiados como estímulos adversos para afectar las funciones cognoscitivas, a este respecto se ha encontrado que el estrés agudo de intensidad media en ratas, con ruido de 105 dB afectó la memoria de referencia y memoria espacial de trabajo, ambas funciones cognitivas son principalmente dependientes de corteza prefrontal, aunque en estrecha relación con el hipocampo (Arnsten y Goldman-Rakic, 1998). Finalmente, en humanos se evaluaron los efectos del ruido grabado de tráfico sobre tareas cognitivas de memoria y razonamiento espacial, lo que resultó en un deterioro agudo de estas (Belojevic y cols., 1992).

El análisis de resultados permite inferir que el deterioro observado en el desempeño de los sujetos experimentales en el MWM (mayores tiempos de latencia de escape y menor tiempo en la zona de la plataforma) principalmente se debieron a los efectos fisiológicos del estrés, cuya potencia fue evaluada en este estudio a través de los niveles de CORT, sin relación con el índice de neuronas apoptóticas. Esta suposición encuentra apoyo en el hecho de que, todos los animales sometidos a estrés mostraron déficit del aprendizaje y la memoria espacial, mientras que sólo en los tejidos de ratas expuestas a ruido se observaron neuronas marcadas con anexina en cantidad significativa, además; como se mencionó anteriormente, el deterioro cognoscitivo por estrés y la muerte neuronal hipocampal no están necesariamente relacionados (Sousa y cols., 2000).

En resumen; en los sujetos expuestos a las tres diferentes condiciones de estrés; hacinamiento, USVs artificiales y la aplicación simultánea de ambas situaciones se observó un deterioro en su capacidad de aprendizaje y consecuentemente, en la memoria espacial. Esta dificultad ha sido previamente descrita en estudios con otros tipos de estrés, por la aplicación exógena de glucocorticoides, y en escasos estudios que utilizaron estrés social.

El presente estudio es el primero que reporta deterioro cognoscitivo resultante de los modelos utilizados para generar estrés, sin relación aparente con el mayor índice de muerte neuronal en el hipocampo. Además, constituye un análisis muy completo del fenómeno del estrés, ya que involucra variables comportamentales, morfológicas y bioquímicas, usa un modelo que no es frecuente en la literatura, y que por sus características puede ser usado como una analogía cercana a la respuesta de estrés humana. Resultaría importante en el futuro cercano evaluar los efectos a largo plazo de este tipo de estrés aplicado durante el desarrollo de las ratas, ya que en este estudio se carece de elementos para determinar si las alteraciones serán permanentes o si pueden revertirse naturalmente con el tiempo o bajo condiciones de estimulación inducida.

CONCLUSIONES.

1. En análisis de la concentración de corticosterona urinaria reveló que las tres condiciones estresantes; hacinamiento, ruido o hacinamiento más ruido produjeron una elevación inicial, sin embargo; esta solamente persistió en el grupo de animales expuestos al ruido, en estos también se observó el mayor índice de neuronas en apoptosis.
2. Las tres condiciones estresantes dificultaron la memoria espacial en el paradigma del laberinto acuático de Morris y alteraron los patrones de exploración; se produjo incremento de la excitabilidad y la ansiedad.
3. Estos cambios conductuales se relacionaron con la elevación de los niveles de corticosterona, pero no con el índice apoptótico neuronal.
4. En todos los animales recién destetados sometidos a las diferentes condiciones de estrés durante 10 días, se produjo retraso de su desarrollo corporal.
5. El modelo de estudio utilizado y la combinación de técnicas morfológicas, bioquímicas y de comportamiento resultaron adecuados para evidenciar las consecuencias de este tipo de estrés subcrónico de características sociales; el estímulo aversivo más potente fue el ruido y no se produjo un efecto sumatorio del hacinamiento más el ruido.

REFERENCIAS

Adamec, R. (2001). Does long term potentiation in periaqueductal gray (PAG) mediate lasting changes in rodent anxiety-like behavior (ALB) produced by predator stress?--Effects of low frequency stimulation (LFS) of PAG on place preference and changes in ALB produced by predator stress. *Behav Brain Res* 120: 111-35.

Adamec, R.E. (1990). Amygdala kindling and anxiety in the rat. *Neuroreport*. 1: 255-8.

Ader, R., Cohen, N., Felten, D. (1995). Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* 345: 99-103.

Agranoff, B.W., Uhler, M.D. (1994). Learning and Memory. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 5th Ed. Siegel, G. J. et al, editors. Raven Press Ltd. New York.

Aioi, A., Okuda, M., Matsui, M., Tonogaito, H., Hamada, K. (2001). Effect of high population density environment on skin barrier function in mice. *J Dermatol Sci* 25: 189-197.

Albonetti, M.E., Farabollini, F. (1994). Social stress by repeated defeat: effects on social behaviour and emotionality. *Behav Brain Res* 62: 187-93.

Almeida, O.F.X., Conde, G.L., Crochemore, C., Demeneix, B.A., Fischer, D., Asan, A.H.S., Meyer, M., Holsboer, F., Michaelidis, T.M. (2000). Subtle shifts in the ratio between pro and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J* 14: 779-790.

Amaral, D.G., Dent J. A. (1981). Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195: 51-86.

Andersen, P., Trommald, M. (1995). Possible strategies for finding the substrate for learning-induced changes in the hippocampal cortex. *J Neurobiol* 26: 396-402.

Angelucci, L. (2000). The glucocorticoid hormone: from pedestal to dust and back. *Eur J Pharmacol* 405: 139-147.

Anisman, H., Baines, M., Berezi, I., Bernstein, C., Blennerhassett, M., Gorzynski, R.M., Greenberg, A.A., Kisil, F.T., Mathison, R.D., Nagy, E., Nance, D.M., Perdue, M.H., Pomerantz, D.K., Sabbadini, E.R., Stanisz, A., Warrington, R.J. (1996). Neuroimmune mechanisms in health and disease: 1 Health. *Can Med Assoc J* 155: 867-874.

Arcana, R., Navasivayam, A. (1999). The effect of acute noise stress on neutrophil functions. *Indian J Physiol Pharmacol* 43: 491-495

Armario, A., Gil, M., Marti, J., Pol, O., Balasch, J. (1991). Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test. *Pharmacol*

Biochem Behav 39: 373-7.

Arnsten, A.F., Goldman-Rakic, P.S. (1998). Noise stress impairs prefrontal cortical cognitive function in monkeys: evidence for a hyperdopaminergic mechanism. *Arch Gen Psychiatry* 55: 362-8.

Barroso-Villa, G., Karchmer-Krivitzky, S., Castelazo-Morales, E., Carballo-Mondragon, E., Kably-Ambe, A. (2002). Changes in mitochondrial membrane potentials and its exponential relation with phosphatidylserine translocation in the plasma membrane as markers in the initial events of apoptosis: evaluation in different spermatic fractions. *Ginecol Obstet Mex* 70: 182-9.

Barth, M., Heisenberg, M. (1997). Vision affects mushroom bodies and central complex in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* 4: 219-29.

Bayer, S.A., Yackel, J.W., Puri, P.S. (1982). Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 216: 890-892.

Beckett, S.R., Aspley, S., Graham, M., Marsden, C.A. (1996). Pharmacological manipulation of ultrasound induced defence behaviour in the rat. *Psychopharmacology* 127: 4384-4390.

Belojevic, G., Ohrstrom, E., Rylander, R. (1992). Effects of noise on mental performance with regard to subjective noise sensitivity. *Int Arch Occup Environ Health* 64: 293-301.

Besedovsky, H.O., del Rey, A. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17: 64-102.

Bhatnagar, S., Vining, C. (2003). Facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. *Horm Behav* 43: 158-65.

Bisagno, V., Ferrini, M., Rios, H., Zieher, L.M., Wikinski, S.I. (2000). Chronic corticosterone impairs inhibitory avoidance in rats: possible link with atrophy of hippocampal CA3 neurons. *Pharmacol Biochem Be* 66: 235-240.

Black, P.H. (1995). Psychoneuroimmunology: Brain and Immunity. *Sci Am nov/dic*: 16-25.

Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., Agullana, R., Weiss, S.M. (1991). Twenty-two Khz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* 50: 5967-5972.

Bodnoff, S.R., Humphreys, A.G., Lehman, J.C., Diamond, D.M., Rose, G.M., Meaney, M.J. (1995). Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci* 15: 61-9.

Boissy, A., Terlouw, C., Le Neindre, P. (1998). Presence of cues from stressed conspecifics increases reactivity to aversive events in cattle: evidence for the existence of alarm

substances in urine. *Physiol Behav* 63: 489-95.

Boranic, M., Pericic, D., Radacic, M., Poljak-Blazi, M., Sverko, V., Miljenovic, G. (1982). Immunological and neuroendocrine responses of rats to prolonged or repeated stress. *Biomed Pharmacoter* 36: 23-28.

Bornstein, S.R. (2000). Cytokines and the adrenal cortex: basic research and clinical implications. *Curr Opin Endocrinol Diab* 7: 128-137.

Brandao, M. L., Cardoso, S.H., Melo, L.L., Motta, V., Coimbra, N.C. (1994). Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav R* 18: 339-346.

Brown, E.S., Rush, A.J., McEwen, B.S. (1999). Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: Implications for mood disorders. *Neuropsychopharmacol* 21: 474-484.

Brunson, K.L., Chen, Y., Avishai-Eliner, S., Baram, T.Z. (2003). Stress and the developing hippocampus: a double-edged sword? *Mol Neurobiol* 27: 121-36.

Bubna-Littitz, H., Hofecker, G., Kment, A., Niedermüller, H. (1981). Gerontological pilot study on learning ability and memory in the stressed rat. *Aktuel Gerontol* 11: 28-31.

Cameron, H.A., McKey R.D. (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 10: 894-897.

Chao, H.M., McEwen, B.S. (1994). Glucocorticoids and the expression of mRNAs for neurotrophins, their receptors and GAP-43 in the rat hippocampus. *Molec Brain Res* 26: 271-276.

Collins, M.K., Marvel, J., Malde, P., Lopez-Rivas, A. (1992). Interleukin 3 protects murine bone marrow cells from apoptosis induced by DNA damaging agents. *J. Exp. Med.* 176: 1043-1051.

Commissaris, R.L., Palmer, A., Neophytou, S., Graham, M., Beckett, S., Marsden, C. A. (2000). Acoustically elicited behaviours in Lister hooded and Wistar rats. *Physiol Behav* 68: 521-531.

Compton, M.M. (1992). A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metas Rev* 11: 105-119.

Consten, D., Keuning, E.D., Bogerd, J., Zandbergen, M.A., Lambert, J.G., Komen, J., Goos, H.J. (2002). Sex steroids and their involvement in the cortisol-induced inhibition of pubertal development in male common carp, *Cyprinus carpio* L. *Biol Reprod* 67: 465-72.

Crossing, K.L., Tai, M.H., Krushel, L.A., Mauro, V.P., Edelman, G.M. (1997). Glucocorticoid receptor pathways are involved in the inhibition of astrocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2687-92.

Csermely, P., Péntzes, I., Tóth, S. (1995). Chronic overcrowding decreases cytoplasmic free

- calcium levels in T lymphocytes of aged CBA/CA mice. *Experientia* 51: 10976-10979.
- de Kloet, E.R. (2000). Stress in the brain. *Eur J Pharmacol* 405: 187-198.
- de Kloet, E.R., Oitzl, M.S., Joëls, M., (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad boys? *Trends Neurosci* 22: 422-426.
- de Kloet, E.R., van Acker, S.A.B.E., Sibug, R.M., Oitzl, M.S., Meijer, O.C., Rahmouni, K., de Jong, W. (2000). Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int* 57: 1329-1336.
- de Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joels, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endoc Rev* 19: 269-301.
- de la Fuente, R. (1992). *Psicología Médica*. Fondo de Cultura Económica. México D.F.
- de Quervain, D.J.F., Roozendaal B., McGaugh J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394 : 787-790.
- de Waal, F.B.M., Aureli, F., Judge, P.G. (2000). Coping with Crowding. *Scientific American* May: 76-81.
- DeVries, A.C., Joh, H.D., Bernard, O., Hattori, K., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Alkayed, N.J. (2001). Social stress exacerbates stroke outcome by suppressing Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11824-8.
- Domjan, J. (2000). *Principios de Aprendizaje y Conducta*. McGraw Hill. Barcelona.
- Eichenbaum, H., Otto, T. (1992). The hippocampus—what does it do? *Behav Neural Biol* 57: 2-36
- Faraday, M.M., Scheufele, P.M., Rahman, M.A., Grunberg, N.E. (1999). Effects of chronic nicotine administration on locomotion depend on rat sex and housing condition. *Nicotine Tob Res* 1: 143-51.
- Fricke, R., Cowan, W.M. (1977). An autoradiographic study of the development of the entorhinal and commissural efferents to the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 173: 231-250.
- Frisone, D.F., Frye, C.A., Zimmerberg, B. (2002). Social isolation stress during the third week of life has age-dependent effects on spatial learning in rats. *Behav Brain Res* 128: 153-60.
- Fukuda, K., Kojiro, M., Chiu, J.F. (1993). Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: apoptosis or necrosis? *Am J Pathol* 142: 935-46.
- Gabr, R.W., Birkle, D.L., Azzaro, A.J. (1995). Stimulation of the amygdala by glutamate facilitates corticotropin-releasing factor release from the median eminence and activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in stressed rats. *Neuroendocrinology* 62: 333-339.

- Gharbawie, O.A., Whishaw, I.Q. (2003). Cholinergic and serotonergic neocortical projection lesions given singly or in combination cause only mild impairments on tests of skilled movement in rats: evaluation of a model of dementia. *Brain Res* 970: 97-109.
- Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., Breitschopf, H., Hartung, H.P., Toyka, K.V., Lassmann, H. (1994). Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* 71: 219-225.
- González-Burgos, I., Pérez-Vega, M.I., Del Angel-Meza, A.R., Feria-Velasco, A. (1998). Effect of tryptophan restriction on short-term memory. *Physiol Behav* 63: 165-169.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T.J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2: 260-265.
- Gould, E., Tanapat, P., Rydel, T., Hastings, N. (2000). Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiat* 48: 715-720.
- Gould, E., Woolley, C.S., McEwen, B.S. (1991). Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *J Comp Neurol* 313: 479-485.
- Greene, J.R., Kerkhoff, J.E., Guiver, L., Totterdell, S. (2001). Structural and functional abnormalities of the hippocampal formation in rats with environmentally induced reductions in prepulse inhibition of acoustic startle. *Neuroscience* 103: 315-323.
- Greiner, M., Cardenas, S., Parra, C., Bravo, J., Avalos, A.M., Paredes, A., Lara, H.E., Fiedler, J.L. (2001). Adrenalectomy regulates apoptotic-associated genes in rat hippocampus. *Endocrine* 15: 323-33.
- Habib, K.E., Weld, K.P., Rice, K.C., Pushkas, J., Champoux, M., Listwak, S., Webster, E.L., Atkinson, A.J., Schulkin, J., Contoreggi, C., Chrousos, G.P., McCann, S.M., Suomi, S.J., Higley, J.D., Gold, P.W. (2000). Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6079-84.
- Haller, J., Halasz, J., Makara, G.B., Kurk, M.R. (1998). Acute effects of glucocorticoids: behavioral and pharmacological perspectives. *Neurosci Biobehav R* 23: 337-344.
- Harbuz, M.S., Windle, R.J., Jessop, D.S., Renshaw, D., Ingram, C.D., Lightman, S.L. (1999). Differential effects of psychological and immunological challenge on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in adjuvant-induced arthritis. *Ann NY Acad Sci* 876: 43-52
- Harris, R.B.S., Zhou, J., Youngblood, B.D., Smagin, G.N., Ryan, D.H. (1997). Failure to change exploration or saccharin preference in rats exposed to chronic mild stress. *Physiol Behav* 63: 91-100.
- Haynes, L.E., Griffiths, M.R., Hyde, R.E., Barber, D.J., Mitchell, I.J. (2001). Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the

striatum and hippocampus: implications for mood disorders. *Neuroscience* 104: 57-69.

Haynes, L.E., Lendon, C.L., Barber, D.J., Mitchell, I.J. (2003). 17 Beta-oestradiol attenuates dexamethasone-induced lethal and sublethal neuronal damage in the striatum and hippocampus. *Neuroscience* 120: 799-806.

Heinrichs, S.C., Menzaghi, F., Pich, E.M., Baldwin, H.A., Rassnick, S., Britton, K.T., Koob, G.F. (1994). Anti-stress action of a corticotropin-releasing factor antagonist on behavioral reactivity to stressors of varying type and intensity. *Neuropsychopharmacology* 11: 179-86.

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776

Huot, R.L., Plotsky, P.M., Lenox, R.H., McNamara, R.K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans Rats. *Brain Res* 950: 52-63.

Hyde, L.A., Hoplight, B.H., Denenberg, V.H. (1998). Water version of the radial-arm maze: Learning in three inbred strains of mice. *Brain Res* 785: 236-244.

Hyde, L.A., Sherman, G.F., Denenberg, V.H. (2000). Non-spatial water radial-arm maze learning in mice. *Brain Res* 863: 151-159.

Jacobson, L., Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12: 118-134.

Jaffard, R., Meunier, M. (1993). Role of the hippocampal formation in learning and memory. *Hippocampus* 3: 203-217.

Jarrard, E.L. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60 : 9-26.

Joëls, M., Heslen, W., de Kloet, E.R. (1991). Mineralocorticoid hormones suppress serotonin-induced hyperpolarization of rat hippocampal CA1. *J Neurosci* 11: 2228-2294.

Kandel, E.R., Hawkins, R.D. (1992). The biological basis of learning and individuality. *Sci Am Sep* 267: 78-86.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2000). Principles of neural science (Fourth edition). Mc Graw-Hill, New York.

Kannan, K., Jain, S.K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7: 153-163.

Kant, G.J., Leu, J.K., Anderson, S.M., Mougey, E.H. (1987). Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and Prolactin. *Physiol Behav* 40: 775-779.

Keenan, P.A., Jacobson, M.W., Soleymani, R.M., Newcomer, J.W. (1995). Commonly used therapeutic doses of glucocorticoids impair explicit memory. *Ann NY Acad Sci* 761: 400-402.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F. H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the

senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18: 3206-3212.

Kezele, P., Skinner, M.K. (2003). Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* 144: 3329-37.

Kiess, W., Gallaher, B. (1998). Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 138: 482-491.

Koopman, J.P., van den Brink, M.E., Scholten, P.M., van der Hieden, M., van Schie, F.W., Hectors, M.P., Nagengast, F. (1989). The influence of stress and cheese-whey on intestinal parameters in mice. *Vet Quart* 11: 24-29.

Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 26: 463-471

Kubie, J.L., Muller, R.U. (1991). Multiple representations in the hippocampus. *Hippocampus* 1: 240-242.

Kudryashov, I.E., Kudryashova, I.V. (2001). Ontogeny of synaptic transmission in the rat hippocampus. *Brain Res* 892: 263-268.

Laping, N.J., Teter, B., Nichols, N.E., Rozovsky, I., Finch, C.E. (1994). Glial fibrillary acidic protein: regulations by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathol* 1: 259-75.

Leis, T., Pallage, V., Toniolo, G., Will, B. (1984). Working memory theory of hippocampal function need qualification. *Behav Neural Biol* 42: 140-157.

Leventhal, G., Matturro, M. (1980). Differential effects of spatial crowding and sex on behavior. *Percept Mot Skills* 51: 111-20.

Lipton, S.A., Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory Amino Acids In Neurologic Disorders. *New Engl J Med* 331: 274-275.

Lordi, B., Patin, V., Protais, P., Mellier, D., Caston, J. (2000). Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate anxiety and memory capabilities of the offspring. *Int J Psychophysiol* 37: 195-205.

Lupien, S.J., McEwen, B.S. (1997). The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Rev* 24: 1-27.

Ma, Q., Wang, J., Yang, Z.H., Liv, H.T., Chao, F.H. (2000). Effects of chronic stress on the learning and memory ability and hippocampal LTP in rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 16: 318-20.

Magarinos, A.M., Deslandes, A., McEwen, B.S. (1999). Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol* 371: 113-122

- Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc London Ser B* 262: 23-81.
- McConkey, D.J., Hartzell, P., Duddy, S.K., Hakansson, H., Orrenius, S. (1998). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin kills immature thymocytes by Ca²⁺-mediated endonuclease activation. *Science* 242: 256–259.
- McEwen, B.S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22: 105-122
- McEwen, B.S. (2000). Effects of adverse experiences for Brain structure and function. *Biol Psychiat* 48: 721-731.
- McEwen, B.S., Sapolsky, R.M. (1995). Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5: 205-216.
- McEwen, B.S., Weiss, J.M., Schwartz, L.S. (1968). Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220: 911-912.
- McGaugh, J.L., Cahill L., Parent, M.B., Mesches, M.H., Coleman-Mesches, K., Salinas, J.A. (1995). Involvement of the amygdala in the regulation of memory storage. McGaugh, James L. (Ed), Bermudez-Rattoni, Federico (Ed), et al. (1995). *Plasticity in the central nervous system: Learning and memory*. (pp. 17-39). Mahwah, NJ, USA: Erlbaum.
- Meerlo, P., Sgoifo, A., De Boer, S.F., Koolhaas, J.M. (1999). Long-Lasting Consequences of a Social Conflict in Rats: Behavior During the Interaction Predicts Subsequent Changes in Daily Rhythms of Heart Rate, Temperature, and Activity. *Behav Neurosci*, 113: 1283–90.
- Meier, P., Finch, A., Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407: 796-801.
- Meijer, O.C., de Kloet, E.R. (1998). Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity. *Crit Rev Neurobiol* 12: 1-20.
- Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J., Hurle, J.M. (1999). Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann NY Acad Sci* 887: 120-132.
- Merkus, P.J., van Essen-Zandvliet, E.E., Duiverman, E.J., van Houwelingen, H.C., Kerrebijn, K.F., Quanjer, P.H. (1993). Long-term effect of inhaled corticosteroids on growth rate in adolescents with asthma. *Pediatrics* 91: 1121-6.
- Merrill, J.E., Jonakait, G.M. (1995). Interactions of the nervous and immune systems in development, normal brain homeostasis and disease. *FASEB J* 9: 611-618.
- Mitchel, J.B., Iny, L.J., Meaney, M.J. (1990). The role of serotonin in the development and environmental regulation of type II corticosteroid receptor binding in rat hippocampus. *Dev Brain Res* 55: 231-235.

- Mollenauer, S., Bryson, R., Robison, M., Phillips, C. (1992). Noise avoidance in the C57BL/6J mouse. *Anim Learn Behav* 20: 25-32.
- Montgomery, S.M., Bartley, M.J., Wilkinson, R.G. (1997). Family conflict and slow growth. *Arch Dis Child*, 77: 326-30.
- Morale, M.C., Gallo, F., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Marletta, N., Spina-Ppirreññp, V., Avola, R., Caucci, F., Tomasi, P., Delitalia, G., Barden, N., Marchetti, B. (2001). Neuroendocrine-immune (NEI) circuitry from neuron-glia interactions to function: focus on gender and HPA-HPG interactions on early programming of the NEI system. *Immunol Cell Biol* 79: 400-17.
- Nagaraja, H.S., Jeganathan, P.S. (1999). Influence of different types of stress on selected cardiovascular parameters in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 43: 3296-3304.
- Nichols, N.R., Zieba, M., Bye, N. (2001). Do glucocorticoids contribute to brain aging? *Brain Res Brain Res Rev* 37: 273-86.
- O'callaghan, J.P., Brinton, R.E., McEwen, B.S. (1991). Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. *J Neurochem* 57: 860-9.
- O'keefe, J., Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34: 171-175
- Ohl F., Fuchs E. (1999). Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Cognitive Brain Res* 7: 379-387.
- Oitzl, M., de Kloet, E.R. (1992). Selective corticosteroid-antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav Neurosci* 106: 62-71.
- Oitzl, M.S., Fluttert, M., de Kloet, E.R. (1994). The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. *Eur J Neurosci* 6: 1072-1079.
- O'Keefe, J. (1990). A computational theory of the cognitive map. *Prog Brain Res* 83: 301-312.
- Olton, D.S., Samuleson, R.J. (1976). Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *J Exp Psychol Anim B* 2: 97-115.
- Olvera-Cortés, E., Pérez-Vega, M.I., Barajas-López, G., Del Angel-Meza, A.R., González-Burgos, I. (1998). Place learning impairment in chronically tryptophan-restricted rats. *Nutr Neurosci* 1: 223-235.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1982). *The rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Pérez-Vega, M. I., Barajas-López, G., Del Angel-Meza, A.R., González-Burgos, I., Feria-

- Velasco, A. (1998). Dendritic spine density of pyramidal neurons in field CA1 of the hippocampus decreases due to chronic tryptophan restriction. *Nutr Neurosci* 1: 237-242.
- Pokk, P., Zharkovsky, A. (1998). The effects of buspirone on the behaviour of control and stressed mice. *J Physiol Pharmacol* 49: 175-85.
- Prior, H. (2002). Effects of predictable and unpredictable intermittent noise on spatial learning in rats. *Behav Brain Res* 133: 117-24.
- Raber, J. (1998). Detrimental effects of chronic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. From obesity to memory deficits. *Mol Neurobiol* 18: 1-22
- Reagan, L.P., McEwen, B.S. (1997). Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat* 13: 149-167.
- Reul, J.M. de Kloet, E.R. (1986). Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro analysis. *J Steroid Biochem* 24: 269-272
- Reul, J.M.H.M., Gesing, A., Droste, S., Stec, I.S. M., Weber, A., Bachmann, C., Bilang-Bleuel, A., Holsboer A.C.E. (2000). The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur J Pharmacol* 405: 235-249.
- Rich, T., Allen, R.L., Wyllie, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407: 777-783.
- Rolls, E.T., (2000). Memory systems in the brain. *Annu Rev Psychol* 51: 599-630.
- Rosenweig, M.R., Leinman, A.I. (1992). *Psicología Fisiológica*. McGraw Hill, Madrid.
- Rothwell, N.J. (1996). Neuroimmune interactions: the role of cytokines. Sixteen gaddum memorial lecture, December 1996 at the meeting of the British Pharmacological Society.
- Rowan, M.J., Cullen, W.K., Moulton, B. (1990). Buspirone impairment of performance of passive avoidance and spatial learning tasks in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 100: 393-8.
- Sales, G.D. (1972). Ultrasound and aggressive behavior in rats and other small mammals. *Anim Behav* 20: 88-100.
- Saljo, A., Bao, F., Hamberger, A., Haglid, K.G., Hansson, H.A. (2001). Exposure to short-lasting impulse noise causes microglial and astroglial cell activation in the adult rat brain. *Pathophysiology* 8: 105-11.
- Saljo, A., Bao, F., Jingshan, S., Hamberger, A., Hansson, H.A., Haglid, K.G. (2002). Exposure to short-lasting impulse noise causes neuronal c-Jun expression and induction of apoptosis in the adult rat brain. *J Neurotrauma* 19: 985-91.
- Salvetti, F., Chelli, B., Gesi, M., Pellegrini, A., Giannaccini, G., Lucacchini, A., Martini, C. (2000). Effect of noise exposure on rat cardiac peripheral benzodiazepine receptors. *Life Sci*

66: 1165-1175.

Sapolsky, R.M. (1996). Why stress is bad for your brain. *Science* 273: 749-750

Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S. (1985). Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J Neurosci* 5: 1222-1227.

Sastry, P.S., Rao, K.S. (2000). Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74: 1-36.

Savino, W., Dardene, M. (1995). Immune-neuroendocrine interactions. *Immunol Today* 16: 318-321.

Savvas, I.N., Graham, M., Williams, J., Aspley, S., Mardsen, C.A., Beckett, S.R.G. (2000). Strain differences to the effects of aversive frequency ultrasound on behavior and brain topography of c-fos expression in the rat. *Brain Res* 854: 158-164.

Sherry, D.F., Jacobs, L.F., Gaulin, S.J. (1992). Spatial memory and adaptive specialization of the hippocampus. *Trends Neurosci* 15: 298-303

Silva, R.H., Frussa-Filho, R. (2000). The plus - maze discriminative avoidance task: a new model to study memory – anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *Journal of Neuroscience Methods* 102: 117 – 125.

Smith, M.A., Makino, S., Kventnansky, R., Post, M.R. (1995). Stress and glucocorticoids affect expression of brain derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 m RNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15: 1768-1777.

Sousa, N., Lukoyanov, N.V., Madeira, M.D., Almeida, O.F., Paula-Barbosa, M.M. (2000) Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97: 253-66.

Spehner, V., De Wazieres, B., Nicod, L., Harraga, S., Robert, J.F., Seillès, E. (1996). Auditory stress induces changes in membrane functions of mouse peritoneal macrophages. *Scand J Immunol* 44: 643-647.

Squire, L.R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychol Rev* 99: 195-231

Sutherland, R., MacDonald, R.J. (1990). Hippocampus, amygdala and memory deficits in rats. *Behav Brain Res* 37: 57-79.

Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T. (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* 350: 21-9.

Terpstra, J., Gispen-De Wied, C.C., Broekhoven, M.H., Frankhuijzen, A.C., Kahn, R.S., van Ree, J.M., Wiegant, V.M. (2003). Attenuated stress responsiveness in an animal model for neurodevelopmental psychopathological disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 13: 249-56.

Torrey, E.F., Yolken, R.H. (1998). Is household crowding a risk factor for schizophrenia?.

Schizophr Res 29: 12-13.

Tremblay, S., MacKen, W.J., Jones, D.M. (2001). The impact of broadband noise on serial memory: Changes in band-pass frequency increase disruption. *Memory* 9: 323-31.

Tsuji, M., Takeda, H., Matsumiya, T. (2000). Different effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and benzodiazepine anxiolytics on the emotional state of naive and stressed mice: a study using the hole-board test. *Psychopharmacology (Berl)* 152: 157-66.

Tulving, E., Schacter, D.L. (1990). Priming and human memory systems. *Science* 247: 301-306.

van Raaij, M.T., Dobbe, C.J., Elvers, B., Timmerman, A., Schenk, E., Oortgiesen, M., Wiegant, V.M. (1997). Hormonal status and the neuroendocrine response to a novel heterotypic stressor involving subchronic noise exposure. *Neuroendocrinology* 65: 200-209.

Walker, C.D., Perrin, M., Vale, W., Rivier, C. (1986). Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology* 118: 1445-1451.

Wang, H.G., Pathan, N., Ethel, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., Reed, J.C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284: 339-343

Windle, R. J., Wood, S., Shanks, N., Perks, P., Conde, G.L., da Costa, A.P., Ingram C.D., Lightman, S.L. (1997). Endocrine and behavioural responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non-disrupted maternal activity. *J Neuroendocrinol* 9: 6407-6414.

Wossink, J., Karst, H., Mayboroda, O., Joels, M. (2001). Morphological and functional properties of rat dentate granule cells after adrenalectomy. *Neuroscience* 108: 263-72.

Young, P.T. 1973. *Emotion in man and animal*. Robert E. Krieger Publishing Co. N.Y.

Yuan, J., Yankner, B.A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802- 809.