



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIA**

**ROL DE LOS RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES EN UN
MODELO DE DEPRESIÓN POSTPARTO EN RATAS**

MARCIA ARRIAGADA SOLIMANO

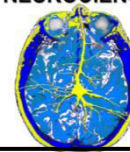
Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Tutor:
Prof. Dr. Alexies Dagnino Subiabre

2019



Programa Magister
NEUROCIENCIA



2000-2009

PROGRAMA MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MENCIÓN NEUROCIENCIAS

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Coordinación de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

MARCIA NICOLE ARRIAGADA SOLIMANO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia, en el examen de defensa de Tesis rendido el ____ de () de 20..

Director de Tesis:

Prof. Dr. Alexies Dagnino

Evaluadores:

Prof. Dr. Georgina Renard

Prof. Dr. Javier Bravo

A mi madre...

Agradecimientos

A mi madre por su gran apoyo en todas las circunstancias, por creer siempre en mí y por darme la vida. A mi hermano Valentín que siempre me alentó y con su amor me dio fuerzas para seguir. A ambos les agradezco por entenderme y apoyarme en todos los sentidos gracias a ellos pude encontrar las fuerzas para continuar.

Mis agradecimientos a mi tutor Dr. Alexies Dagnino por su apoyo y ayuda en el desarrollo de esta tesis, asimismo a mis compañeros de laboratorio. En especial a Ann Mary Iturra mi amiga, que me ayudó a comprender lo verdaderamente importante.

A mi marido Phillip Dettleff, mi compañero, mi amigo, mi gran apoyo, a quien llegué a nombrar mi co-tutor. Gracias Phillip por darme el ánimo para seguir adelante, por contestar todas mis preguntas y guiarme en el duro proceso.

Contenido

RESUMEN.....	9
SUMMARY	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
Hipótesis:	15
Objetivo general:	15
Objetivos específicos:	15
3. METODOLOGÍA	16
3.1. Bienestar animal:.....	16
3.2. Animales de experimentación:	16
3.3. Diseño Experimental:.....	16
3.4. Protocolo de estrés:.....	17
3.5. Preparación de RU 486 o Mifepristona:	18
3.6. Pruebas conductuales:	19
3.6.1. Evaluación de conducta materna	19
3.6.2. Actividad Locomotora: Prueba de Campo Abierto	21
3.6.3. Conducta ansiosa: Laberinto en Cruz Elevado.....	22
3.6.4. Conducta tipo depresiva:	22
3.6.4.1. Estimación de Anhedonia	22
3.6.4.2. Evaluación de conducta de desesperanza.....	23
3.7. Medición de niveles de Corticosterona	23
3.8. Análisis Estadístico:.....	24
4. Resultados.....	25
4.1. Conducta materna	25
4.3. Conductas similares a la ansiedad: Laberinto en Cruz Elevado.....	30
4.4. Conducta similar a la depresión.....	32
4.4.1. Preferencia en la ingesta de sacarina:	32
4.4.2. Prueba de nado forzado:.....	32
Medición de niveles de Corticosterona	34
4.5.....	34
5. Discusión.....	34
5.1. Efectos de la administración de RU486 y estrés gestacional en la conducta materna de ratas.	34

5.2. Efectos de la administración de RU486 y estrés gestacional en la actividad locomotora y en conductas similares a la ansiedad.....	36
5.3. Efectos de la administración de RU486 y estrés gestacional en la conducta similar a la depresión.	37
5.4. Efectos de la administración de RU486 y estrés gestacional en la activación del eje HPA.....	38
6. Bibliografía.....	41

ABREVIATURAS

HPA	Hipotálamo-pituitaria-adrenal
CORT	Corticosterona
CRF	Factor liberador de corticotropina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
RM	Receptor de mineralocorticoides
RG	Receptor de glucocorticoides
EG	Estrés gestacional
G15, G18, G21	Días gestacionales 15,18 y 21.
PP2, PP3, PP4, PP21, PP23	Días post-parto 2,3,4,21 y 23.
SEM	Error estándar de la media

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diseño experimental	15
Tabla 1: Descripción de puntuación en prueba de recuperación del nido	18
Figura 2: Conducta materna durante día y noche	23
Figura 3: Conducta materna agrupada	24
Figura 4: Conducta materna en la Prueba de recuperación del nido	26
Figura 5: Actividad locomotora en la Prueba de campo abierto	27
Figura 6: Conductas similares a la ansiedad en prueba de laberinto en cruz elevado ..	28
Figura 7: Preferencia de ingesta de la sacarina	29
Figura 8: Prueba de nado forzado	30
Figura 9: Niveles de CORT sérica	31
Figura 10.....	37

RESUMEN

La depresión postparto es un cuadro de alta prevalencia en Chile y el mundo, afectando a un grupo de mujeres que ven mermado su vínculo materno- infantil. La alteración de las conductas maternas es una de las particularidades que presenta este cuadro depresivo y uno de los objetivos de estudio. Estímulos negativos como el estrés gestacional pueden llevar al desarrollo de esta patología, alterando la conducta materna y afectando a la descendencia tanto en humanos como en animales. De esta manera, los glucocorticoides estarían involucrados en la manifestación de la depresión postparto. Para esclarecer cómo los glucocorticoides estarían generando este efecto se utilizaron ratas preñadas *Sprague Dawley*, con las cuales se conformaron 5 grupos: Control, Vehículo, Vehículo estrés gestacional (restricción de movimiento), RU486 (antagonista de los receptores de glucocorticoides) y RU486 más estrés gestacional.

Se realizaron pruebas para evaluar la conducta materna mediante dos pruebas distintas, conductas similares a la ansiedad y a la depresión, además, se cuantificaron los niveles de corticosterona. La administración de RU486 durante la gestación disminuyó las conductas maternas y generó conductas similares a la depresión. Además, este grupo tuvo niveles de corticosterona (CORT) mayores cuando se estimuló el eje HPA con un estresor agudo. Esto sugeriría que los receptores de glucocorticoides son importantes para el correcto desarrollo de las conductas maternas. Esto dado por el *peak* de glucocorticoides que ocurre previo al parto, el cual estimula la secreción de oxitocina, hormona mediadora de las conductas maternas. Finalmente, la administración de RU486 durante la gestación facilitó el desarrollo de conductas similares a la depresión postparto en ratas.

SUMMARY

Postpartum depression is a neuropsychiatric disorder with high prevalence in Chile, as well as worldwide. Impairment of maternal-infant relation is the core symptom of postpartum depression. The aim of this thesis was to evaluate the role of glucocorticoid receptors on depressive-like behaviors in dams during postpartum period. *Sprague-Dawley* rats were pregnant and then four experimental groups were formed: Control, Vehicle, RU-486, Vehicle gestational stress (daily restraint stress) and RU-486 gestational stress. Maternal behavior was evaluated using the Pup Retrieval Test at postnatal day 3, also was evaluated during day and night passive and active maternal behaviors. After weaning, depressive-like behaviors were determined by forced swimming test. Additionally, anxiety-like behaviors and locomotor activity were analyzed by open field and elevated plus maze tests, respectively. Additionally, plasma corticosterone levels were determined, the main biological stress marker. Animals from RU-486 group spend more time to retrieve pups back to the nest, even dams did not retrieve the entire nest in the Pup retrieval test. Furthermore, gestational stress and RU-486 administration decreased active and passive maternal behavior during day. Moreover, dams with RU-486 administration spend more time in floating during forced swimming test than other groups. Besides, corticosterone plasma levels were higher in RU 486 than vehicle group. Glucocorticoid's peak before partum is very important to oxytocin secretion, this hormone enables maternal behavior. Finally, the administration of RU 486 during pregnancy would be allowing the development of postpartum depression in dams.

1. INTRODUCCIÓN

La depresión post parto en mujeres es una patología que se manifiesta durante el primer año posterior al parto (Robertson et al., 2003; Urdaneta et al., 2010). El cuadro clínico es similar al de episodios depresivos mayores observados en otras etapas de la vida, cursando con baja de ánimo, la incapacidad de sentir placer o anhedonia, alteración del sueño y del apetito. Sin embargo, la depresión postparto posee características particulares que justifican su consideración como entidad específica, siendo de importancia el cambio en la conducta materna dirigida al recién nacido (Robertson et al., 2003; Urdaneta et al., 2010; MINSAL, 2014).

Estudios sobre sintomatología ansiosa y/o depresiva en mujeres chilenas durante el embarazo, revelan prevalencias entre un 16,7% y un 35,2% (MINSAL, 2014; Podestá et al., 2014). A su vez, en el postparto, alrededor del 40,5% de las mujeres chilenas presenta síntomas de ansiedad o depresión (MINSAL, 2014). Asimismo, a nivel mundial las cifras de depresión postparto indican prevalencias entre un 10 y un 15% (Robertson et al., 2003; Fisher et al., 2012). Los valores tanto nacionales como internacionales son de preocupación, dado al impacto que tiene la depresión postparto en la madre y en el hijo. Existen un sin número de estudios que han evidenciado como la depresión postparto afecta a la descendencia tanto en humanos (Kersten-Alvarez et al., 2012; Drury et al., 2016; Myers and Johns, 2018) como en animales de laboratorio (Smith et al., 2004; Bosch et al., 2007; Duarte et al., 2017). Sin embargo, existe escasa información sobre cómo se desarrolla este cuadro en la madre y para ello es necesario entender que el cuerpo de la madre gestante y su hijo funcionan como un solo sistema.

El cuerpo de la madre presenta mecanismos para evitar noxas que afecten a este particular sistema. Dentro de las diferentes noxas, a las cuales se puede ver sometida una madre durante la gestación, se debe considerar al estrés.

Los principales componentes de la respuesta adaptativa al estrés son el sistema simpático-adrenérgico-noradrenérgico y el eje Hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA). La activación de este eje HPA frente a un estresor, estimula la liberación del cortisol en humanos y la corticosterona (CORT) en roedores (Strohle and Holsboer, 2003). Cuando un animal percibe algún tipo de amenaza, el complejo amigdaloides activa al núcleo paraventricular del hipotálamo a través de eferentes glutamatérgicos. Este núcleo libera a su vez el factor liberador de corticotropina (CRF) hacia el sistema porta, lo que resulta en la liberación de la hormona adenocorticotropa (ACTH) hacia el torrente sanguíneo. Esta hormona, al llegar a la corteza de las glándulas adrenales, estimula la síntesis y la liberación de glucocorticoides, los que pueden atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer su efecto a través de los receptores de glucocorticoides (de Kloet et al., 2005).

La respuesta fisiológica al estrés de las madres durante la gestación y la lactancia es limitada, esto se debe a que el eje HPA en estas etapas se encuentra atenuado, a través varios mecanismos tanto a nivel hipofisario como local, éstos buscan minimizar la exposición del feto y neonato a los glucocorticoides (Neumann et al., 1998; Douglas et al., 2003; Brunton et al., 2008). Específicamente, se demostró que existe una hiporreactividad a distintos estresores, reflejado en una secreción reducida de la hormona ACTH por la adenohipófisis y una reducción en la secreción de CORT en la glándula adrenal en ratas preñadas (Neumann et al., 1998; Brunton et al., 2008). No obstante, la atenuación del eje HPA no siempre es suficiente para proteger frente a estímulos negativos, esto se ha visto en ratas de laboratorio en donde la aplicación de un protocolo de estrés crónico por

restricción de movimiento durante la preñez produce conductas similares a la depresión (Smith et al., 2004; Haim et al., 2014).

La depresión postparto en roedores está caracterizada según la literatura por un aumento en la inmovilidad en la prueba de nado forzado y la disminución en las conductas maternas de las ratas madres (Smith et al., 2004; Fernandez et al., 2014; Haim et al., 2014). Punto a tener en consideración es que las pruebas tradicionales han sido estandarizadas en machos adultos por ende es importante tener en mente esto, ya que si bien en la actualidad existe cuestionamiento en la prueba de nado forzado en machos adultos, esto no ocurre en ratas madres, siendo importante esta prueba para la caracterización del cuadro.

Se ha observado que ratas preñadas sometidas a un estrés crónico presentan una disminución en la frecuencia de conductas dirigidas a la camada (arqueamiento para amamantar y postura de cuidado de las crías) (Smith et al., 2004). En particular, la conducta de lamer a las crías es muy importante en el desarrollo de los recién nacidos, siendo el número de lamidos capaz de cambiar el fenotipo de la descendencia independiente del estado anímico de la madre (Brummelte and Galea, 2010a).

Con el fin de entender el mecanismo por el cual el estrés afecta a las madres, se ha estudiado la administración de CORT durante la gestación tardía en ratas. en dosis altas afectó las conductas maternas, pasando las hembras más tiempo fuera del nido en comparación con el grupo control. En cuanto a las conductas dirigidas a la camada, específicamente conductas de cuidado fueron menos frecuentes en las ratas madres que se les administró CORT (Brummelte and Galea, 2010a).

Como se ha descrito los glucocorticoides estarían relacionados con el desarrollo de la depresión postparto, evidenciado en su participación en la respuesta al estrés y mediante

su administración directa. Los glucocorticoides en el sistema nervioso central actúan uniéndose a dos tipos de receptores, los receptores de mineralocorticoides (RM) y glucocorticoides (RG) (Srinivasan et al., 2013; Vyas and Maatouk, 2013; Reul et al., 2015). EL RM tiene una mayor afinidad a los glucocorticoides que el RG, sin embargo, el RM es saturado a niveles basales mientras que el RG es solamente activado cuando los glucocorticoides se elevan en determinados momentos del día, según el ciclo circadiano o durante el estrés (De Kloet et al., 1998). Para ayudar a comprender la participación del RG en la respuesta del estrés se han desarrollado antagonistas de este receptor. Uno de los antagonistas usados en investigación es RU486 o mifepristona, el cual tiene la misma afinidad que agonistas sintéticos para el receptor, como Triamcinolona. Su actividad antiglucocorticoides ocurre en dos niveles: previniendo la completa transformación del RG y el paso siguiente de translocación al núcleo (Baulieu, 1991).

Se ha observado que una dosis de RU486 administrado durante la gestación en ratonas preñadas es capaz de alterar su conducta materna, presentando un mayor porcentaje de rechazo que las hembras del grupo control y latencias mayores en recuperar el nido (Wang et al., 1995). Sin embargo, no se midieron otras conductas similares a la depresión para complementar y caracterizar el cuadro. Este estudio es el único que describe efectos en la conducta materna del antagonista del RG, no existiendo estudios en ratas de laboratorio. Dejando abierta la pregunta ***¿Qué sucede con conductas similares a la depresión?*** Adicionalmente, es importante saber si el efecto se mantiene más allá de los primeros dos días de lactancia, ***¿Puede RU486 generar efectos en la conducta posterior al destete?*** Finalmente, es necesario conocer que ocurre en la situación de estrés durante la preñez y el desempeño de RU486. Actualmente, se desconocen estas respuestas, dado que la acción descrita para RU486 es en animales en condiciones como la lactancia (Bosc et al., 1987; Fang et al., 1997) y no preñadas (Li et al., 2013; Eshkevari

et al., 2015). El desarrollo de esta tesis pretende esclarecer algunas de estas preguntas, con el fin de aportar en el estudio de los efectos del estrés gestacional y la interacción con el RG en la depresión postparto.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hipótesis:

La administración sistémica de RU486 durante la gestación induce conductas similares a la depresión en ratas *Sprague Dawley*.

Objetivo general:

- ✓ Evaluar el rol de los receptores de glucocorticoides en la depresión postparto.

Objetivos específicos:

- ✓ Evaluar el efecto de la administración de RU486 durante la gestación en la manifestación de la conducta materna.
- ✓ Determinar el efecto del antagonista (RU486) en la actividad locomotora de ratas madres durante el postdestete.
- ✓ Determinar el efecto del antagonista (RU486) en conductas similares a la ansiedad y a la depresión durante el post-destete.
- ✓ Cuantificar el efecto en los niveles de corticosterona antes y después de la estimulación del eje HPA, en el post-destete en ratas madres.

3. METODOLOGÍA

3.1. Bienestar animal:

Los experimentos y la manipulación de los animales se realizaron de acuerdo al protocolo ético establecido por el “National Institutes of Health” (NIH) y aprobado por el comité de ética de la Universidad de Valparaíso.

3.2. Animales de experimentación:

Se trabajó con 25 ratas hembra adultas vírgenes Sprague *Dawley* de 90 días pertenecientes al Laboratorio de Neurobiología del Estrés del Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Estos animales fueron mantenidos en jaulas de acrílico transparente en grupos de 2 a 3 animales, bajo el ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, comenzando el ciclo de luz a las 8:00 hrs. en una sala con condiciones de temperatura controlada ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), al igual que la humedad ambiental (50%-60%). La alimentación y agua se entregó a voluntad, el alimento extruido empleado fue RMH 3000 LabDiet® adquirido de la empresa ACWS, Santiago de Chile.

3.3. Diseño Experimental:

Cada hembra se dispuso con un macho reproductor en jaulas separadas durante todo el ciclo estral, es decir, de 5 a 6 días (Morley-Fletcher et al., 2003) . La mañana siguiente las hembras se examinaron para detectar la presencia de tapones seminales, este procedimiento se repitió los días siguientes hasta ser detectados. El día de detección del tapón seminal, se consideró como el “día gestacional 0” y las hembras fueron separadas de los machos (Brummelte et al., 2006; Pawluski et al., 2015). A las hembras preñadas se les realizó *handling* 4 días antes de comenzar los tratamientos (Brummelte and Galea, 2010b).

El día 14 de gestación las ratas se asignaron de forma aleatoria a los distintos grupos experimentales:

- Grupo control: hembras que se preñaron y parieron sin ninguna manipulación.
- Grupo vehículo: recibieron una inyección subcutánea de etanol al 1% + 500 µl de aceite de oliva p (Wei et al., 2013) los días 15, 18 y 21 de gestación a las 11:00 a.m.
- Grupo vehículo + EG: recibieron una inyección subcutánea de vehículo a las 11:00 a.m. y se les aplicó el protocolo de EG.
- Grupo RU 486: recibieron una inyección subcutánea de 1 mg/kg de RU 486 los días 15, 18 y 21 de gestación a las 11:00 a.m.
- Grupo RU 486 + EG: recibieron una inyección subcutánea de RU 486 al igual que el grupo anterior. Adicionalmente, se les aplicó el protocolo de EG.

A todas las ratas de los distintos grupos se les evaluó la conducta materna en el postparto temprano (PP2, PP3-4). Las crías fueron destetadas al PP21 y se comenzó el periodo de habituación y aplicación de pruebas conductuales durante los PP21-PP23. El proceso de habituación previo a la aplicación de las pruebas conductuales consistió en ubicar a las ratas durante 15 minutos dentro de sus respectivas jaulas, en la misma sala en la cual se realizaron las pruebas conductuales.

3.4. Protocolo de estrés:

En el día gestacional 14 (G14) comenzó el protocolo de estrés por restricción de movimiento hasta el día gestacional 21 (G21). Se introdujo a cada una de las ratas preñadas en un cilindro de acrílico de 9 cm de diámetro y 20 cm de largo, bajo luz brillante, durante 45 minutos, 3 veces al día (09:00, 12:00 y 17:00 h) (Morley-Fletcher et al., 2003). Los restrictores de movimiento tenían perforaciones para permitir la ventilación

y evitar el sobrecalentamiento de los animales. El tamaño de estos cilindros era suficiente para que los animales pudieran respirar sin dificultad, así como orinar y defecar.

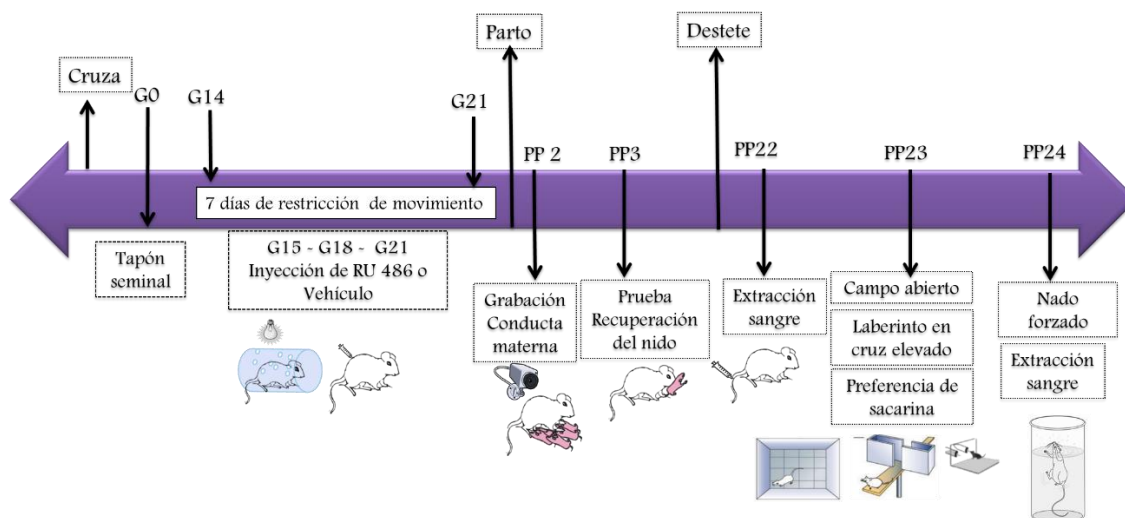


Figura 1: Diseño experimental. La línea morada corresponde a los días gestacionales y postparto, representados con un G y PP, respectivamente.

3.5. Preparación de RU 486 o Mifepristona:

El antagonista del receptor de glucocorticoides RU 486 se disolvió en 1% de etanol basado en lo encontrado en la literatura (Catheline et al., 2006) y 500 µl de aceite de oliva (Wei et al., 2013) escogido por su alto contenido de omega 9, debido a que existen efectos descritos en dietas altas en omegas 3 (Arbabi et al., 2014) y en omega 6 (da Rocha and Kac, 2012) no así en omega 9. La dosis de 1 mg/kg subcutáneo y el ritmo horario de 72 horas, fueron establecidos mediante un experimento en cual se probaron diferentes esquemas terapéuticos. Los esquemas de aplicación del fármaco fueron recogidos de la literatura de estudios en ratones (Wang et al., 1995) o en los cuales se medían otros efectos del fármaco (Catheline et al., 2006). Esto dado a que no existían artículos en donde se probara el efecto de RU 486 en ratas hembra preñadas que llegaran a término, en el momento en que se estructuró el diseño experimental de esta

tesis. Las dosis testeadas fueron de 2 mg/kg, 1,5 mg/kg y 1 mg/kg. a ritmos de 24 horas y 72 horas. Las hembras preñadas a las cuales se les inyectó cada 24 horas dosis de 2 mg/kg presentaron desprendimiento de placenta y aborto en la tercera dosis, siendo eutanasiadas. Hembras con dosis de 1.5 mg/kg cada 24 horas, abortaron al día 19 de gestación, siendo eutanasiadas. Las hembras de dosis 1 mg/ kg cada 24 horas, presentaron desprendimiento de placenta y mortinatos, siendo eutanasiadas. Finalmente, las hembras que recibieron 1mg/kg cada 72 horas llegaron a término, con tamaños de camada dentro del promedio para la especie, estas hembras fueron incorporadas al grupo RU486. De esta manera, se determinó la dosis y ritmo horario para el desarrollo del experimento.

3.6. Pruebas conductuales:

3.6.1. Evaluación de conducta materna

La conducta materna fue evaluada por medio de dos metodologías distintas. La primera consistió en el análisis de las conductas en la jaula, una prueba no invasiva. El segundo método de evaluación fue la prueba de recuperación del nido que estimula a las madres a realizar las principales conductas maternas, la cual es una prueba invasiva. (Chourbaji et al., 2011).

La conducta materna fue monitoreada mediante las cámaras Vivotek modelo n°: IP7134, con las cuales, se realizaron grabaciones de 24 horas en el día 2 post-parto. Para la grabación en la fase oscura se utilizaron luces LED rojas con una intensidad 10 ± 1 LUX este tipo de luces es ampliamente utilizada en este tipo de estudios, no describiéndose alteraciones en las hembras (Melniczek and Ward, 1994; Bosch et al., 2007). Las distintas conductas maternas se evaluaron en 7 sesiones de 60 minutos cada una. Las sesiones se realizaron durante la fase de día en las siguientes horas 08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00 y 18:00 y una hora en la fase oscura (20:00) (Bosch et al., 2007). Esta distribución se

escogió dado que son las horas en que la madre realiza con mayor frecuencia las conductas de cuidado de los cachorros (Pisu et al., 2017). Siendo escogidas más horas durante el día, dado que el cuidado de las crías en roedores muestra un ritmo circadiano con una mayor cantidad de tiempo de cuidados durante la fase de luz (Hoshino et al., 2006). Dentro de cada sesión de observaciones, se completó una lista de verificación de actividades cada 4 minutos, 16 veces por hora. Siendo cada madre observada 112 veces al día (16 veces x 7 sesiones) (Bosch et al., 2007). Las conductas anotadas en la lista de verificación fueron las siguientes: **Conductas auto-dirigidas:** (1) Madre fuera del nido (2) Madre comiendo (3) Madre bebiendo agua (4) Auto-acicalamiento. **Cuidado pasivo:** (5) Tendida al lado del nido y (6) Madre en postura de manta (madre sobre los cachorros no arqueada). **Cuidado activo:** (7) Postura de arqueamiento (madre se arquea sobre las crías con las piernas extendidas). (8) Madre acicalando o lamiendo a los cachorros (Bosch et al., 2007).

Además se agruparon las conductas en auto-dirigidas y dirigidas a los cachorros durante el día y la noche (Fernandez et al., 2014). Cuando las madres estuvieron en una postura poco clara, las observaciones se tomaron según el gasto energético asociado. Siendo las conductas de arqueamiento de mayor requerimiento energético que la posición de manta (Myers et al., 1989).

Adicionalmente, se evaluaron las principales conductas maternas con la prueba de recuperación del nido realizada los días 3-4 post-parto. Esta prueba consiste en separar a la madre del nido por no más de 3 minutos para posteriormente dispersar la camada. Luego la madre es devuelta a la caja y se evalúan las siguientes conductas: Recuperación del nido: (1) Tiempo en recuperar el nido

$$\text{Tiempo en recuperar cada cría: } \frac{\text{Tiempo total en recuperar el nido}}{\text{Tamaño de la camada}}$$

(2) Porcentaje de cachorros recuperados exitosamente.

$$\text{Porcentaje de cachorros recuperados: } \frac{\text{Cachorros recuperados}}{\text{Tamaño de la camada}} \times 100$$

(3) latencia al primer contacto (tiempo que demora en olfatear uno de sus cachorros) (4) conductas auto-dirigidas (acicalamiento) y Construcción del nido: (5) Calidad de recuperación del nido otorgando una puntuación según lo descrito en la Tabla 1:

Puntuación	Definición
0	No recupera el nido
1	Recupera en otro lugar o no recuperó todos los cachorros
2	Recupera el nido en el mismo lugar

Tabla 1: Descripción de puntuación en prueba de recuperación del nido. Fuente: Elaboración propia.

La prueba duró 10 minutos, si al finalizar el tiempo los cachorros que no se reagruparon, manualmente fueron devueltos al nido con el fin de evitar segregación por parte de la madre (Aguggia et al., 2013).

3.6.2. Actividad Locomotora: Prueba de Campo Abierto

Para evaluar la actividad locomotora se realizó la prueba de campo abierto, realizada en una sala con sonido y temperatura controlada (21 ± 1 °C). Cada rata se colocó en el centro de una caja de acrílico negro (70 x 70 x 40 cm). La iluminación en el centro de la caja se fijó en 300 ± 10 lux (medidor digital de Lux, modelo # LX-1010B, Weafo Instrument Co., Shanghai, China). La conducta se analizó por 5 minutos durante los cuales se midió

el total de distancia recorrida y la velocidad promedio (Dagnino-Subiabre et al., 2012) a través del programa *AnyMaze* (Stoelting Co., Illinois, EE.UU.).

3.6.3. Conducta ansiosa: Laberinto en Cruz Elevado

La conducta ansiosa fue evaluada con la prueba de laberinto en cruz elevado la cual consiste en dos brazos abiertos (60 cms de largo x 15 cms de ancho) y dos brazos cerrados (60 cms de largo x 15 cms de ancho x 30 cms de alto) ubicados de forma opuesta uno de otro y una plataforma central (15 x 15 cms). El laberinto se encuentra elevado a 100 cm sobre el piso, la iluminación se estableció en 300 ± 10 lux en los brazos abiertos y $210 \text{ lux} \pm 10$ en brazos cerrados. La prueba tuvo una duración de 5 minutos en donde se registró el número de entradas a los brazos abiertos y cerrados, el número total de entradas y la relación entre las entradas al brazo abierto y las entradas totales (Dagnino-Subiabre et al., 2012) calculada de la siguiente forma:

$$\text{Razón de entradas a los brazos abiertos: } \frac{\text{Número de entradas a los brazos abiertos}}{\text{Número de entradas totales (abiertos y cerrados)}} \times 100$$

La entrada del animal a cada uno de los brazos se contabilizó cuando éste ingresaba con sus cuatro extremidades (Dagnino-Subiabre et al., 2012). Los datos obtenidos fueron analizados con el programa ANY-maze.

3.6.4. Conducta tipo depresiva:

3.6.4.1. Estimación de Anhedonia

La medición de la preferencia natural de los animales por los fluidos dulces, tales como soluciones de sacarina, se utilizó para determinar la anhedonia (Pucilowski et al., 1993). Se les otorgó a las ratas en evaluación la posibilidad de elegir entre dos botellas, una que contenía agua normal, y otra con agua con sacarina al 0.02 %. Estas botellas se dejaron a su disposición durante 12 horas, entre las 20:00 y 8:00. La preferencia de sacarina fue calculada de la siguiente forma (Larsen et al., 2010).

$$\text{Porcentaje de preferencia de consumo de sacarina} = \frac{\text{Ingesta total solución de sacarina}}{\text{Ingesta total de líquido (agua y sacarina)}} \times 100$$

3.6.4.2. Evaluación de conducta de desesperanza

El paradigma para evaluar la conducta de desesperanza es el de Nado Forzado, ampliamente utilizado para estudiar la respuesta a los antidepresivos (Porsolt et al., 1977). En esta prueba la conducta de inmovilidad se asocia al síntoma de desesperanza, característico de la depresión en humanos (Porsolt et al., 1977). En este caso se decidió utilizar una variación del paradigma clásico y aplicar la prueba en una sesión de 5 minutos. Lo anterior debido a que se describe que en la prueba clásica que consta de dos sesiones, las ratas aprenden a enfrentarse a la prueba, lo que se denomina desesperanza aprendida (Craft et al., 2010; Fernandez et al., 2014), pudiendo enmascarar los resultados. La prueba consistió en colocar a las ratas en un recipiente de plástico transparente (25 cm de diámetro, 46 cm de profundidad) que contiene 30 cm de agua (25 ± 1.0 °C), las ratas no deben tocar el fondo del recipiente con su cola. La prueba duró 5 minutos de los cuales se analizó con el programa *AnyMaze*, cuantificando el tiempo de las distintas conductas: nado (*swimming*), escalada (*climbing*) e inmovilidad (*floating*), contabilizando como inmovilidad solo los movimientos necesario para mantenerse flotando (Craft et al., 2010; Fernandez et al., 2014).

3.7. Medición de niveles de Corticosterona

Para determinar la funcionalidad del eje HPA luego de la administración de RU 486 y de la aplicación del protocolo de estrés por 7 días, se midieron los niveles de corticosterona basales y posterior a un estrés agudo. El procedimiento se realizó en dos días, en el primero se les extrajo a partir de la vena caudal 1ml de sangre recolectada en tubos heparinizados como condición previa a la estimulación. Al día siguiente fueron sometidas a un estrés agudo que consistió en colocarlas durante 60 segundos en un recipiente de plástico transparente (25 cm de diámetro, 46 cm de profundidad) que contiene 30 cm de

agua a 19°C. Después los animales se mantuvieron en una caja calefaccionada durante 10 min., para luego ser transportados a otra habitación. Se anestesiaron con isoflurano e inmediatamente fueron eutanasiados luego de obtenidas las muestras de sangre. Las extracciones se realizaron durante la mañana a la misma hora, debido a la secreción circadiana de la hormona corticosterona. Las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas a 10.000 rpm (Modelo MiniSpin Plus; Eppendorf AG, Hamburg, Germany) por 20 minutos para obtener plasma (Perez et al., 2013). Los niveles de CORT fueron cuantificados con un kit de inmunoensayo enzimático (CorticosteroneBioAssay™, Catálogo C7903-30) adquirido de US Biological (Swampscott, MA), dichos valores son expresado en ng/ml. Los valores de densidad óptica se midieron a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Modelo Anthos 2010 Lector de Microplacas, Biochrom Ltd, Reino Unido) Los niveles de CORT obtenidos son expresados en ng/ml.

3.8. Análisis Estadístico:

Se realizó la prueba de Shapiro- Wilk y una prueba de homogeneidad de varianza para evaluar los datos obtenidos con el fin de aplicar las pruebas correspondientes para cada uno de los paradigmas. Las pruebas de campo abierto, laberinto en cruz elevado y nado forzado presentaron una distribución normal, por esta razón los datos se analizaron con ANOVA de 1 vía y el *test a posteriori* de Tukey. Para el caso de las pruebas de conducta materna, recuperación del nido, anhedonia y cuantificación de CORT se utilizó estadística no paramétrica. En específico para la evaluación de la conducta materna en la jaula se utilizó ANOVA de dos vías y para la recuperación del nido se usó el *test* de Kruskal-Wallis. Los análisis a *posteriori* para determinar las diferencias entre los grupos experimentales se realizaron con las pruebas de Bonferroni y Dunn. Se utilizó el software GraphPad Prism 7 para realizar los análisis descritos, los datos se presentarán como promedios y el

error estándar de la media (SEM). El nivel de probabilidad menor o igual a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

4. Resultados

4.1. Conducta materna

El estrés gestacional y la aplicación del RU486 no afectó en las conductas auto-dirigidas de las madres ($F_{(4,175)} = 3,528$; $p=0,0085$), sin embargo, entre las 14:00- 15:00 horas, se observó una diferencia significativa entre los grupos vehículo +EG y RU 486 ($F_{(6,175)} = 14,77$; $p < 0,001$). La interacción entre el tiempo y los diferentes grupos no presentó diferencias significativas ($F_{(24,175)} = 1,391$; $p = 0,1170$) (Fig.2A).

Las conductas agrupadas como conductas maternas pasivas en las madres de los diferentes grupos no presentaron diferencias significativas ($F_{(4,175)} = 2,317$; $p=0,059$) tampoco hubo diferencias significativas atribuidas al factor tiempo ($F_{(6,175)} = 0,8246$; $p=0,5523$) ni un efecto de interacción entre ambos ($F_{(24,175)} = 0,7537$; $p = 0,7896$) (Fig. 2B).

Con respecto a la conducta activa materna evaluada durante el post-parto temprano no se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos ($F_{(4,175)} = 0,2272$; $p=0,9229$). Asimismo, durante las horas en que se evaluaron estas conductas (08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00 y 18:00) ($F_{(6,175)} = 3,222$; $p=0,005$) ni tampoco al analizar la interacción entre los diferentes grupos y el tiempo ($F_{(24,175)} = 1,096$; $p = 0,3529$) (Fig.2C).

El lamido de los cachorros por sus madres fue mayor en el grupo vehículo en comparación con los grupos RU486, RU486+EG y control. De la misma forma, el grupo vehículo+EG tuvo un mayor número de eventos de lamido que los grupos RU486+EG y control. Además, el grupo RU486+EG también presentó mayor número de eventos que el grupo RU486 ($F_{(4,175)} = 7,548$; $p < 0,001$). Estas diferencias entre grupos se observaron solamente entre las 8:00-9:00 horas ($F_{(6,175)} = 3,387$; $p=0,0035$). La interacción entre los

diferentes grupos y el tiempo presentó una diferencia significativa ($F_{(24,175)} = 2,381$; $p=0,0007$) (Fig.2D).

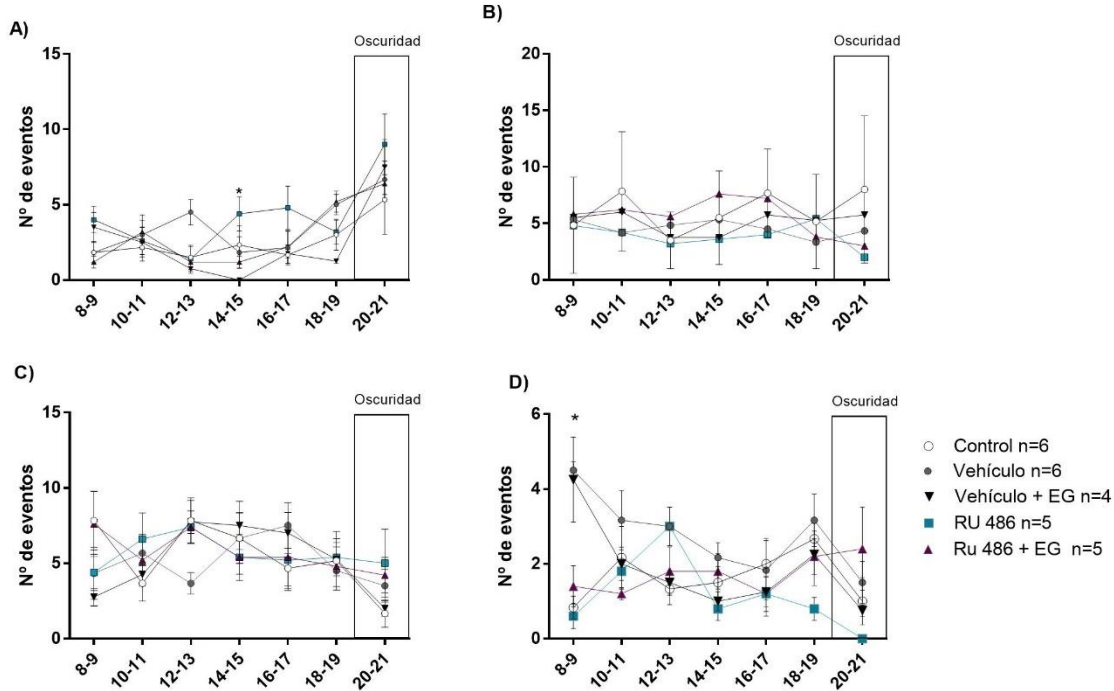


Figura 2: Conducta materna durante el día y la noche. A) Conductas auto-dirigidas B) Cuidado pasivo de las crías C) Cuidado activo de las crías D) Madre acicalando o lamiendo a los cachorros. Los datos están representados como media \pm SEM. * $p < 0,05$.

Para determinar el efecto durante el día y la noche de las conductas evaluadas, estas se agruparon en conductas dirigidas a las crías y auto-dirigidas. Siendo las conductas auto-dirigidas significativamente menores que las conductas dirigidas a las crías durante el día en todos los grupos ($F_{(1,50)} = 266$; $p=0,0001$). Adicionalmente, se observó que el estrés gestacional aplicado en el último tercio de gestación y la aplicación de RU486 disminuyó significativamente las conductas dirigidas a la cría durante el día ($F_{(4,50)} = 7,685$; $p < 0,0001$).

Las mediciones realizadas entre las 20:00- 21:00 horas no fueron significativamente diferentes entre las conductas auto-dirigidas y las conductas dirigidas a las crías ($F_{(1,42)}$

=0,07629; p=0,7837). Asimismo, no se observaron diferencias entre los grupos en ambas situaciones ($F_{(4,42)}=0,5668$; p=0,6881).

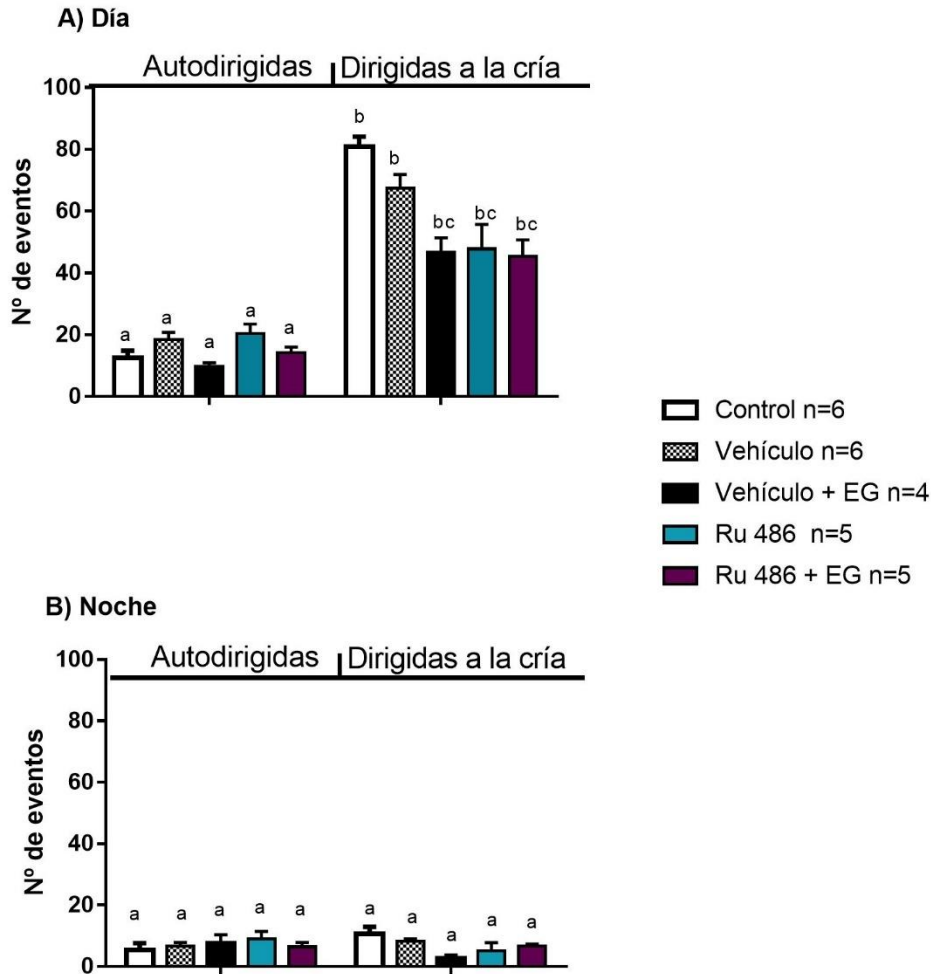


Figura 3: Conductas maternas agrupadas. A) Conductas realizadas durante el día. B) Conductas realizadas durante la noche. Los datos están representados como media \pm SEM. Las distintas letras en el gráfico indican diferencias significativas entre los grupos.

Adicionalmente, se realizó la prueba de recuperación del nido para evaluar la conducta materna en una situación diferente. El tiempo de recuperación del nido aumentó con la administración de RU 486 (Control: $21,56 \pm 5,054$ segundos; Vehículo: $20,03 \pm 3,08$ segundos; Vehículo+EG: $21,05 \pm 4,091$ segundos; RU486: $41,68 \pm 1,651$ segundos;

RU486+EG: $25,03 \pm 4,083$ segundos; $p=0,006$) (Fig.4A). Asimismo, el porcentaje de cachorros recuperados exitosamente, el grupo RU486 ($35,19 \pm 12,56$ %) tuvo un menor porcentaje que los grupos Control (100 ± 0 %) y Vehículo (100 ± 0 %) $p= 0,0007$. Los grupos Vehículo+EG ($92,86 \pm 4,927$ %) y RU486+EG ($97,78 \pm 1,533$ %) no presentaron diferencias significativas entre si (Fig. 4B).

La latencia al primer contacto aumentó con la administración de RU 486 (Control: $7,58 \pm 0,9862$ segundos; Vehículo: $31 \pm 9,41$ segundos; Vehículo+EG: $41,71 \pm 18,04$ segundos; RU486: $72,48 \pm 18,04$ segundos; RU486+EG: $20,38 \pm 2,652$ segundos; $p=0,0012$) (Fig.4C).

El tiempo que las ratas madres, durante la prueba, realizaban conductas auto-dirigidas antes de recuperar el nido, fueron evaluadas con el porcentaje de acicalamiento. El tiempo total de estas conductas no presentó diferencias significativas entre los grupos (Control: $17,58 \pm 2,162$ segundos; Vehículo: $18,33 \pm 6,029$ segundos; Vehículo+EG: $8,7 \pm 3,964$ segundos; RU486: $26,3 \pm 12,77$ segundos; RU486+EG: $3,914 \pm 1,199$ segundos; $p=0,0317$) Sin embargo, a pesar del valor de p , el *test a posteriori* no indicó diferencias entre los grupos (Fig.4D).

La aplicación de RU 486 en las ratas madres alteró también la calidad del nido recuperado, siendo de menor puntuación que el resto de los grupos, encontrándose diferencias entre los grupos Control, Vehículo y RU486+ EG (Control: $1,8 \pm 0,138$; Vehículo: $1,857 \pm 0,1429$; Vehículo+EG: $1,6 \pm 0,169$; RU486: $0,4 \pm 0,169$; RU486+EG: $1,8 \pm 0,138$; $p=0,001$) (Fig.4E)

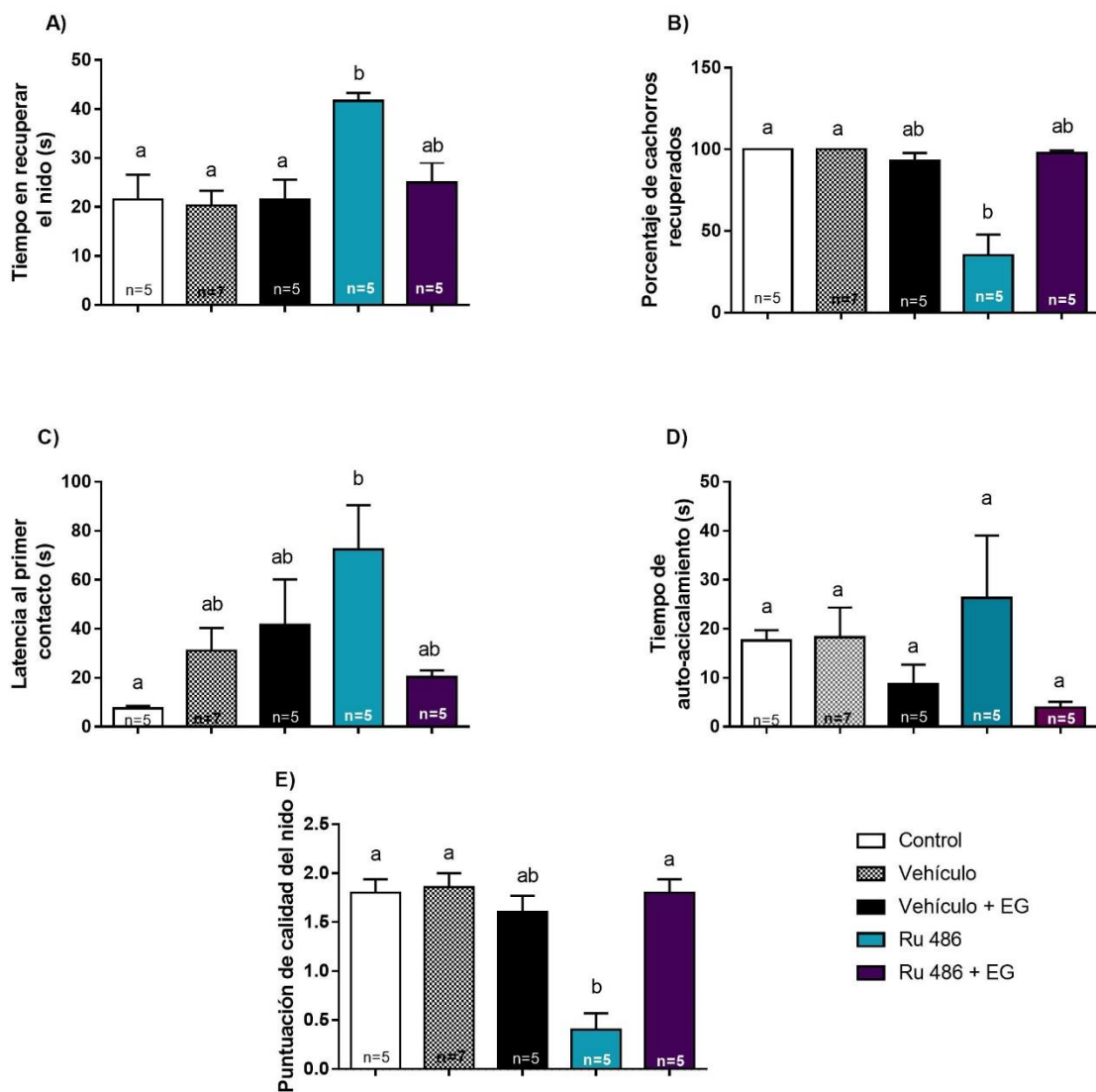


Figura 4: Conductas maternas en la prueba de recuperación del nido. A) Tiempo en recuperar el nido corregido por el tamaño de la camada. B) Porcentaje de cachorros recuperados exitosamente. C) Latencia al primer contacto. D) Porcentaje de tiempo de conductas autodirigidas. E) Puntuación de calidad del nido recuperado. Los datos están representados como media \pm SEM. Las distintas letras en el gráfico indican diferencias significativas entre los grupos.

4.2. Actividad locomotora en la prueba de campo abierto

El estrés gestacional y la aplicación de RU486 no alteraron la distancia recorrida en la prueba de campo abierto ($F_{(4,35)} = 0,4977$; $p=0,8596$) (Fig. 5A). Tampoco se observó un efecto en la velocidad media $F_{(4,35)} = 0,9186$; $p=0,4641$) (Fig. 5B).

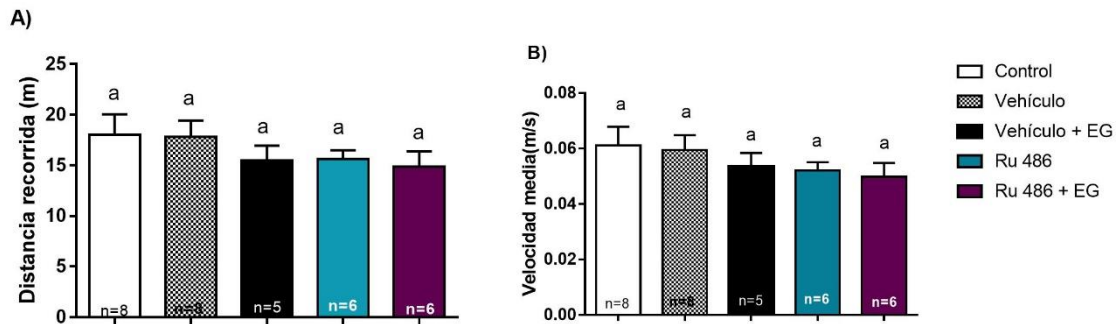


Figura 5 Actividad locomotora en la prueba de campo abierto A) Distancia recorrida. B) velocidad media. Los datos están representados como media \pm SEM. Las distintas letras en el gráfico indican diferencias significativas entre los grupos.

4.3. Conductas similares a la ansiedad: Laberinto en Cruz Elevado

Con respecto a las conductas similares a la ansiedad de las ratas en el laberinto en cruz elevado, no se observó diferencias significativas producto del estrés gestacional ni de la administración de RU 486, en ninguno de los parámetros evaluados en esta prueba: tiempo en el brazo abierto ($F_{(4,35)} = 0,694$; $p = 0,6012$) (Fig. 6A), número de entradas al brazo abierto ($F_{(4,35)} = 0,5917$; $p = 0,6709$) (Fig. 6B) ni en la razón entre las entradas al brazo abierto y las entradas totales ($p=0,0857$) (Fig. 6C).

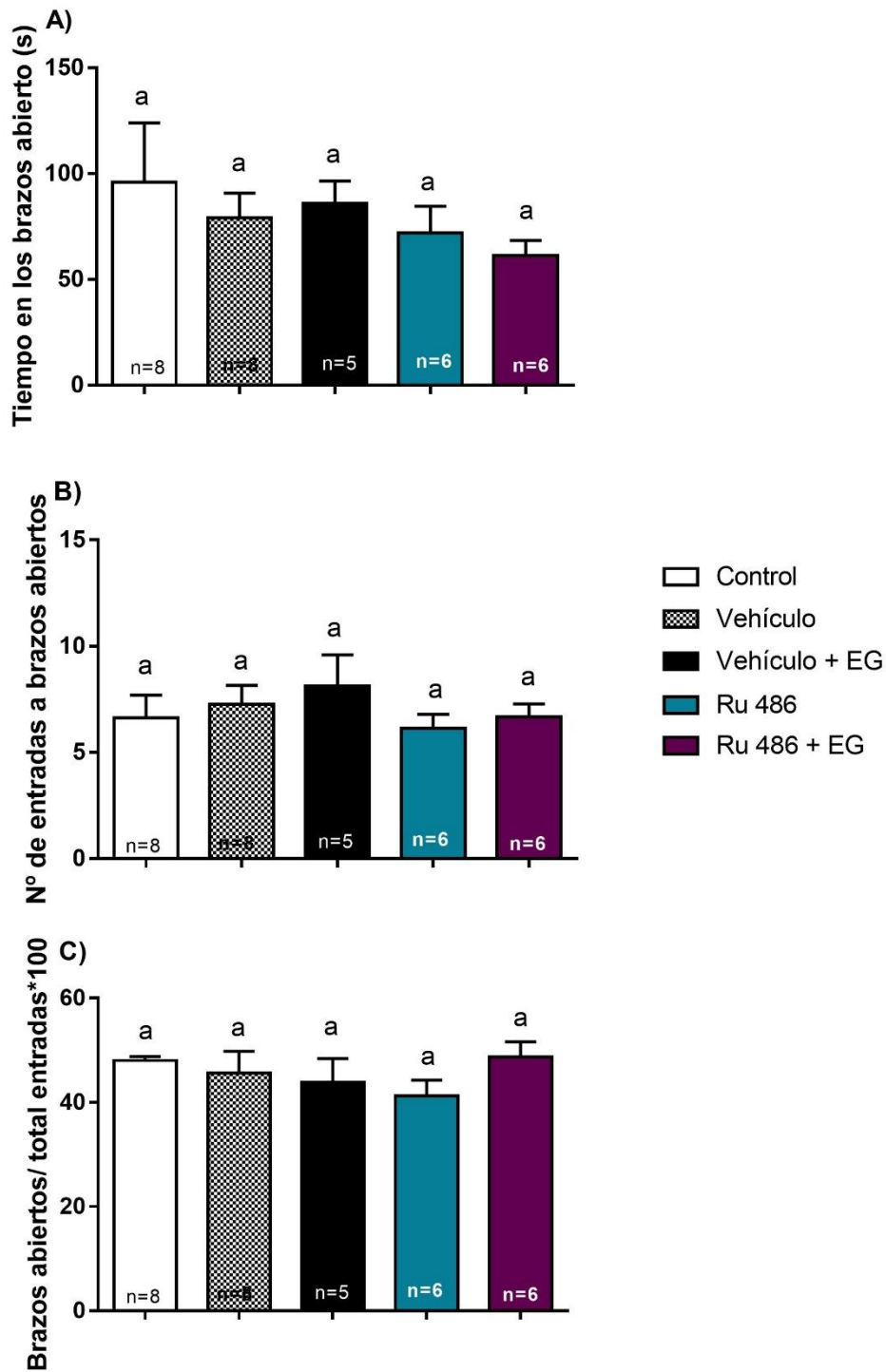


Figura 6 Conductas similares a la ansiedad en la prueba de Laberinto en cruz elevado A) Tiempo de permanencia en los brazos abiertos. B) Número de entrada a los brazos abiertos. C) Razón de número de entradas a los brazos abierto con respecto al total de entrada. Los datos están representados como media \pm SEM. Las distintas letras en el gráfico indican diferencias significativas entre los grupos.

4.4. Conducta similar a la depresión.

4.4.1. Preferencia en la ingesta de sacarina:

La preferencia en la ingesta de sacarina fue cuantificada mediante el porcentaje de preferencia, está no presentó diferencias significativas entre los grupos experimentales (Control: $69,53 \pm 11,63$ %; Vehículo: $61,57 \pm 9,734$ %; Vehículo+EG: $80,89 \pm 3,242$ %; RU486: $56 \pm 9,212$ %; RU486+EG: $69,78 \pm 7,002$ %; $p=0,2173$) (Fig.7).

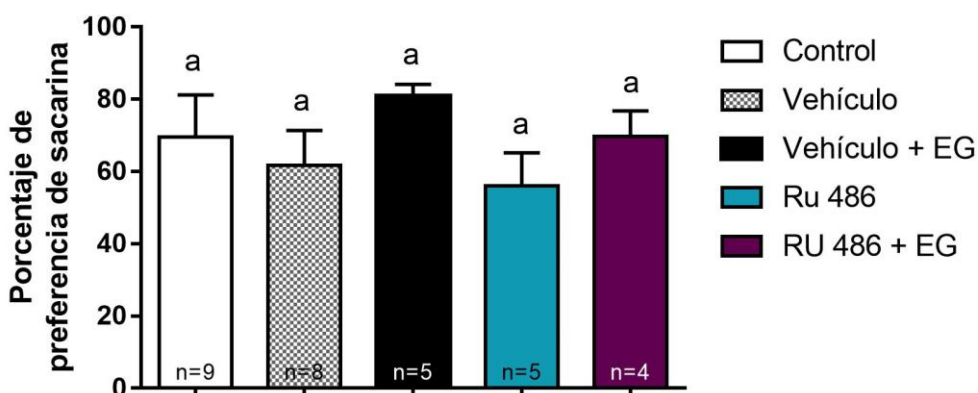


Figura 7: Preferencia en la ingesta de sacarina. Los datos están representados como media \pm SEM. Las distintas letras en el gráfico indican diferencias significativas entre los grupos.

4.4.2. Prueba de nado forzado:

En la prueba de nado forzado, se observó que la administración de RU486 produjo un aumento significativo del tiempo de inmovilidad en comparación con los grupos Control, Vehículo y Vehículo + EG. Con respecto al grupo RU 486 + EG presentó mayor tiempo de inmovilidad con respecto a los grupos Control y Vehículo. En el caso del grupo Vehículo+EG se encontraron diferencias significativas con el grupo Control ($F_{(4,35)} = 23,87$; $p < 0,0001$) (Fig. 8A). Por el contrario, el tiempo de escalada no presentó diferencias significativas entre los grupos ($F_{(4,35)} = 1,585$; $p = 0,2$) (Fig. 8B). En el caso del tiempo de

nado el grupo RU486 + EG fue el grupo con menor tiempo respecto al grupo Vehículo ($F_{(4,35)}=2,496$; $p = 0,0626$) (Fig. 8C).

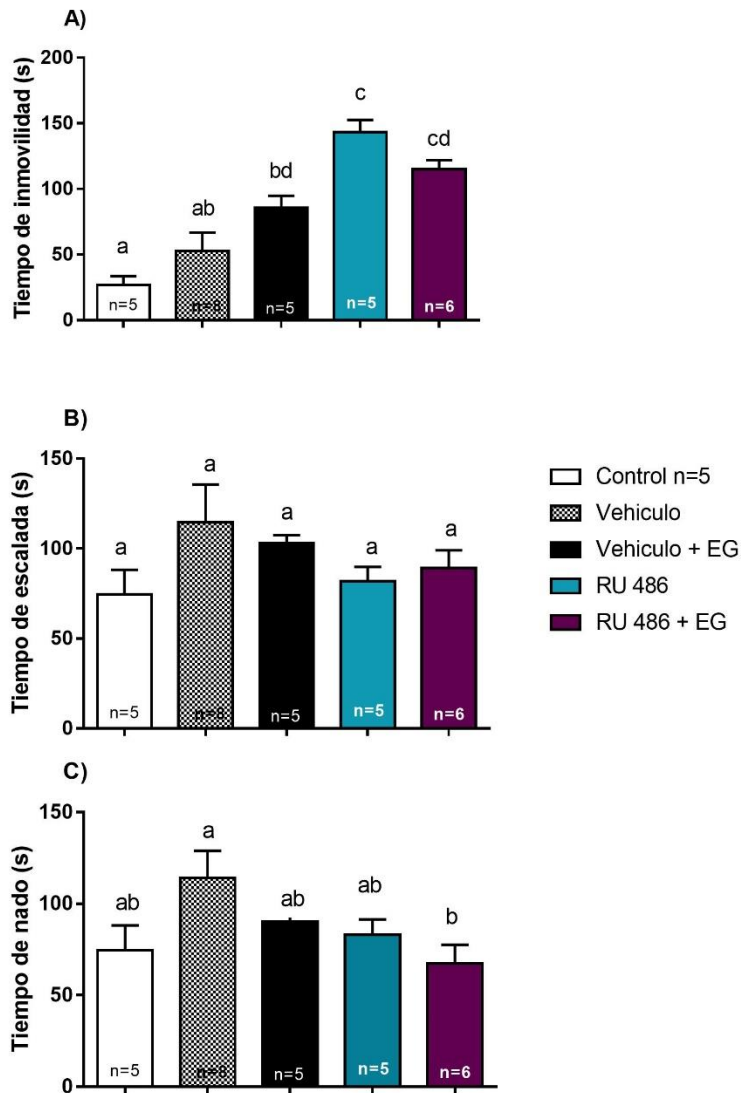


Figura 8: Prueba de nado forzado: A) Tiempo de inmovilidad B) Tiempo de escalada C) Tiempo de nado. Los datos están representados como media \pm SEM. Las distintas letras en el gráfico indican diferencias significativas entre los grupos.

4.5. Medición de niveles de Corticosterona

Se realizaron dos mediciones de CORT, antes y después de la estimulación del eje HPA. Los niveles obtenidos en ambos tiempos fueron estadísticamente significativos ($F_{1,15} = 66,83$; $p < 0,0001$). En la condición después de la estimulación el grupo RU486 tuvo niveles de CORT mayores que el grupo Vehículo ($F_{1,15} = 2,363$; $p = 0,0127$) (Fig. 9).

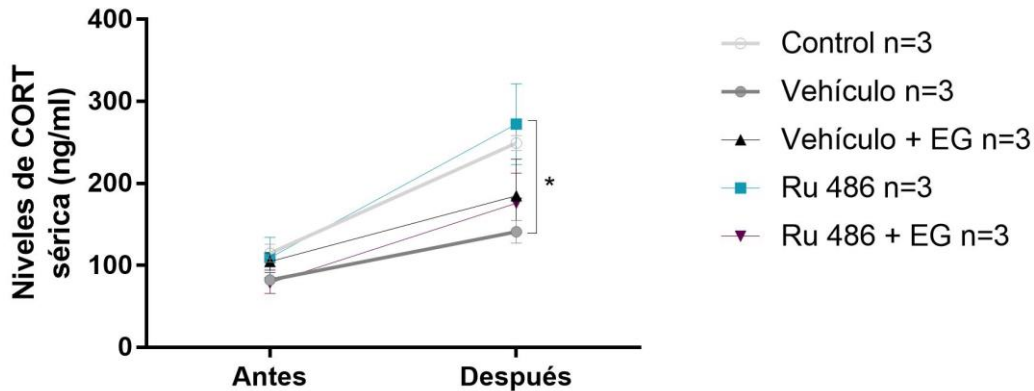


Fig.9: Niveles de CORT sérica antes y después de la estimulación del eje HPA. El * indica diferencias significativas.

5. Discusión

5.1. Efectos de la administración de RU486 y estrés gestacional en la conducta materna de ratas.

La conducta materna evaluada en la misma jaula tuvo diferencias significativas en dos conductas, autoacicalamiento y lamido a las crías en un solo rango de hora. Sin embargo, las conductas activas y pasivas no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Las diferencias encontradas en la conducta de autoacicalamiento, dadas por la mayor frecuencia de eventos del grupo RU486, nos podría indicar como las hembras de ese grupo pasan menos tiempo en el cuidado de sus crías. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los resultados significativos están solo en un rango de hora, pudiendo ser también explicados por la posibilidad de que esas ratas madres hayan concentrado esa

conducta durante esa hora de forma aleatoria. Para el caso de los resultados encontrados en la conducta de lamido, esto pueden deberse a que durante los primeros días de lactancia las hembras tienen una frecuencia de lamido variable según las necesidades de cada cría (Melniczek and Ward, 1994).

Para poder visualizar de mejor manera el efecto de la administración de RU486 y del estrés gestacional, las conductas maternas fueron agrupadas y se analizó la sumatoria de las conductas autodirigidas y dirigidas a la cría durante el día y la noche. Encontrándose diferencias significativas entre las conductas, siendo mayor las conductas dirigidas a las crías que las autodirigidas, esto era algo esperado dado que las conductas maternas son actividades motivantes en las hembras lactantes (Stern and Keer, 1999; Pereira and Ferreira, 2006; Pereira and Morrell, 2011). Esto se pudo ver durante la fase de día, ya que las conductas maternas tiene regulación circadiana, siendo más frecuentes durante esta fase (Hoshino et al., 2006) y no así en la fase nocturna (Fernandez et al., 2014).

El estrés gestacional redujo las conductas dirigidas a las crías durante la fase de día, efecto ya descrito por la literatura (Patin et al., 2002; Smith et al., 2004; Bosch et al., 2007). Esto se explicaría porque los niveles de CORT aumentan durante la gestación y se mantienen altos.

La administración de RU 486 en los grupos con y sin estrés gestacional también presentaron menores eventos de cuidado materno (conductas pasivas, activas y lamido). En este sentido, se ha descrito una conexión del receptor de glucocorticoides con el desarrollo de conductas maternas (Wang et al., 1995). Esto se puede ver en los resultados de la prueba de recuperación del nido. Una prueba más invasiva que la evaluación en la jaula, en donde la hembra no es perturbada, siendo esta conducta más robusta (Chourbaji et al., 2011). Esto explicaría porque los grupos estrés no presentan diferencias significativas en la prueba de recuperación del nido. No obstante, la

administración de RU486 deteriora la conducta materna en esta prueba, ya que hembras que recibieron el fármaco presentaron mayores tiempos en recuperar el nido, menor porcentaje de cachorros recuperados y un puntaje menor en la calidad del nido. La evaluación de la latencia al primer contacto si bien no es significativa, muestra una tendencia en donde el grupo RU486 tienen mayores tiempos. Los resultados obtenidos son concordantes con estudios en donde se relacionó la función del RG con las conductas maternas obtenidas de la prueba de recuperación del nido (Chourbaji et al., 2011)

La conexión entre los niveles de CORT y la conducta materna podrían deberse al alza descrita de CORT al momento del parto (Neumann et al., 1998; Douglas et al., 2003; Brunton et al., 2008). Este aumento de glucocorticoides previo al parto prepara a la hembra para el parto y para la lactancia, mediante el aumento de los niveles de oxitocina (Tops et al., 2012). La oxitocina es la principal hormona reguladora de las conductas maternas. Se ha visto que la disminución en la liberación de CORT, genera una disminución en la liberación de oxitocina (Neumann et al., 1998). Esto podría explicar que la alteración de la conducta materna fuera más potente en el grupo en que se antagonizaron los receptores de glucocorticoides, al afectar de forma indirecta la conducta vía oxitocina. Este posible mecanismo de afectación la conducta materna a través de la relación CORT-oxitocina-conducta materna es un área interesante a evaluar en futuros estudios.

5.2. Efectos de la administración de RU486 y estrés gestacional en la actividad locomotora y en conductas similares a la ansiedad

En la prueba de campo abierto no se encontraron diferencias significativas en los análisis de la actividad locomotora, podemos concluir que ni el estrés ni administración de vehículo y RU486 deterioró la actividad locomotora (Lonstein, 2005; Perez et al., 2013).

Respecto a las medidas similares a la ansiedad no se vieron diferencias entre los grupos, esto se podría explicar ya que las hembras que mantienen contacto con sus crías durante la lactancia (hecho que estuvo presente en todos los grupos experimentales) presentan una disminución en las pruebas que miden conductas similares a la ansiedad (Lonstein, 2007). Esto último podría haberse visto en caso de tener un grupo de hembras vírgenes, sin embargo, todas las hembras tuvieron contacto con sus crías durante la lactancia y las evaluaciones fueron posteriores al destete. De esta forma es posible decir que el estrés gestacional y la administración de RU486 durante la gestación no afectan las conductas similares a la ansiedad.

5.3. Efectos de la administración de RU486 y estrés gestacional en la conducta similar a la depresión.

Dentro de las conductas similares a la depresión se midió la anhedonia mediante la prueba de preferencia de consumo de sacarina. Los resultados no indican diferencias significativas entre los grupos. Un posible factor que podría estar explicando estos resultados se relaciona al uso de sacarina y no sacarosa en la prueba realizada. Esto debido a que aunque la sacarina ha sido una herramienta útil en el estudio de la anhedonia por su sabor dulce, es un sustituto pobre del azúcar para las ratas, por su bajo aporte calórico (Kurt, 2015). Siendo, mucho más atractiva las soluciones con sacarosa (Katz, 1982; Harris et al., 1997; Sclafani et al., 1998; Strekalova et al., 2004). La ausencia de resultados significativos entre los grupos control y vehículo versus los grupos que recibieron el protocolo de estrés, no es algo nuevo (Katz, 1982). Se sugiere que la reducción en la ingesta de solución con sacarina es secundaria en lugar de primaria en su manifestación (Matthews et al., 1995). Debido a su bajo aporte calórico y nutritivo, siendo poco atractiva (Harris et al., 1997). Adicionalmente, pueden existir diferencias en las pruebas que miden las conductas similares a la depresión, como las encontradas en esta

tesis. Ya que en la prueba de nado forzado las hembras del grupo RU486 y RU 486 + EG tuvieron mayores tiempos de inmovilidad y RU486 + EG menor tiempo en la conducta de nado. Esta diferencia en ambas pruebas no invalida lo encontrado, puesto que no es imperativo encontrar ambos síntomas en un cuadro depresivo (Strekalova et al., 2004; Fernandez et al., 2014).

Respecto a los mayores tiempos de inmovilidad en ambos grupos podrían estar explicados por una afectación de procesos motivacionales, visto también en la conducta materna en donde los mismos grupos disminuyeron sus comportamientos. Asimismo, ambos síntomas como el aumento de la inmovilidad y la conducta materna disminuida son clásicas en la caracterización de la depresión postparto descrita en ratas (Smith et al., 2004; Fernandez et al., 2014).

En base a lo discutido sería recomendable como trabajo complementario posterior realizar otras pruebas que midan conductas del tipo depresivas y poder correlacionarlas. Una propuesta es realizar la prueba de interacción social que permite evaluar la motivación, lo cual complementaría los resultados obtenidos. El tener un conjunto de pruebas podría permitir agrupar a los animales según su fenotipo, lo cual aportaría a entender mejor el fenómeno.

5.4. Efectos de la administración de RU486 y estrés gestacional en la activación del eje HPA.

La administración del antagonista de los receptores de glucocorticoides generaría un desequilibrio entre los receptores de mineralocorticoides y glucocorticoides, produciendo que los receptores de mineralocorticoides tengan un rol más importante en la regulación de CORT, en donde estarían involucrados circuitos extrahipotalámicos (Dalm et al., 2019).

Esto explicaría porque el grupo RU486 tiene mayores niveles de CORT posterior a la estimulación del eje HPA.

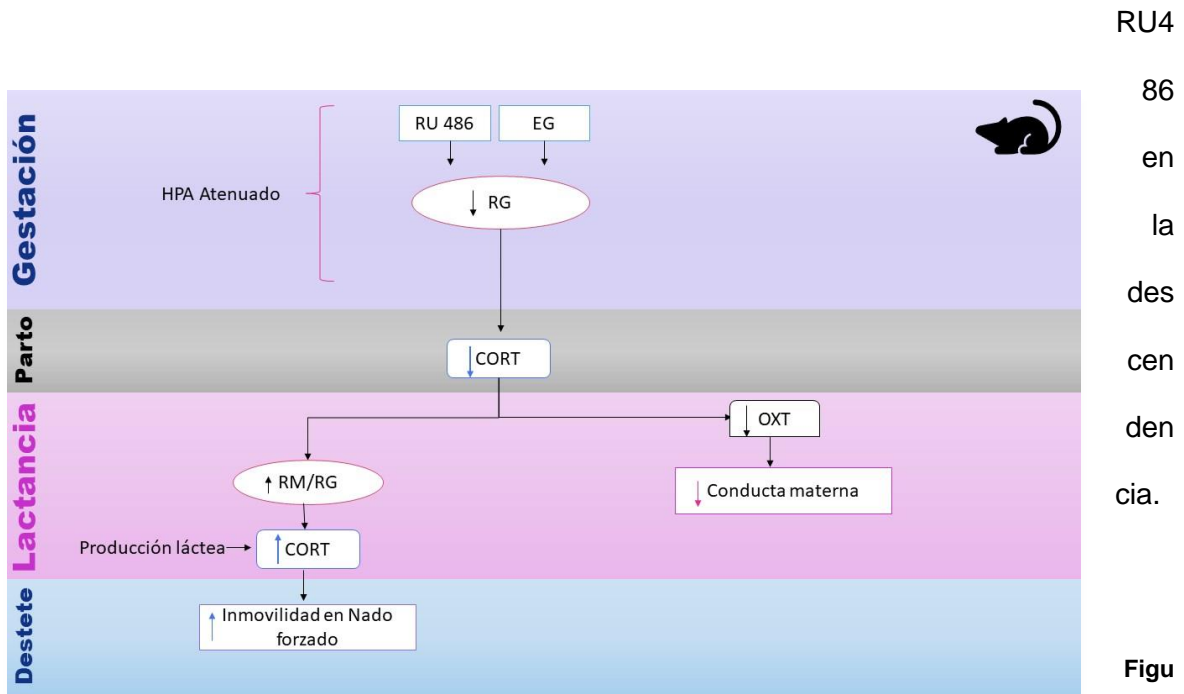
El bloqueo de los receptores de glucocorticoides durante la gestación, dado por la administración de RU486, evitaría el *peak* de glucocorticoides previos al parto. Se conoce que este aumento de glucocorticoides estimula la secreción de oxitocina hormona fundamental para el desarrollo de la conducta materna (Neumann et al., 1998; Douglas et al., 2003; Brunton et al., 2008). Por lo tanto, si ocurre una disminución del efecto de los glucocorticoides previo al parto no existirían los niveles necesarios de oxitocina para el desarrollo de las distintas conductas maternas durante la gestación, lo cual podría estar explicando lo observado en esta investigación.

Adicionalmente, para la producción de leche se requiere un aumento en la movilización de glucosa, esto estaría conducido por los glucocorticoides, por lo tanto, éstos son necesarios durante la lactancia para mantenerla (Brunton et al., 2008). El reflejo de succión de los cachorros genera una estimulación del eje HPA para mantener los niveles de glucocorticoides necesarios estimulándolo (Casey and Plaut, 2007).

El bloqueo de receptores de glucocorticoides genera desequilibrio entre los receptores de mineralocorticoides y glucocorticoides involucrando circuitos extrahipotalámicos (Dalm et al., 2019). Lo anterior, estaría ocurriendo en hembras del grupo RU486 durante la lactancia, este mecanismo generaría un aumento de la CORT, alterando el eje HPA, el cual se mantendría durante la lactancia produciendo conductas similares a la depresión en el periodo post destete y una respuesta con mayores niveles de CORT, posterior a la estimulación del eje HPA (Fig.10).

Si un antagonista de los receptores de glucocorticoides como RU486 está generando lo descrito, un experimento futuro sería intentar rescatar el fenotipo con la aplicación de un agonista del receptor durante la gestación en hembras expuestas a estrés gestacional.

Finalmente, la administración del RU486 durante la gestación estaría permitiendo o facilitando el desarrollo de conductas similares a la depresión en ratas hembra. Siendo este estudio un aporte para el entendimiento del desarrollo de este cuadro prevalente en Chile y el mundo Incorporando un factor adicional al estudio de la depresión postparto poco explorado, esto podría abrir líneas de investigación, como, por ejemplo, el efecto de



RU486 en la descendencia.

Figura
ra

10:

6. Bibliografía

- Aguggia, J.P., Suarez, M.M., Rivarola, M.A., 2013. Early maternal separation: neurobehavioral consequences in mother rats. *Behavioural brain research* 248, 25-31.
- Arbabi, L., Baharuldin, M.T., Moklas, M.A., Fakurazi, S., Muhammad, S.I., 2014. Antidepressant-like effects of omega-3 fatty acids in postpartum model of depression in rats. *Behavioural brain research* 271, 65-71.
- Baulieu, E.E., 1991. On the mechanism of action of RU486. *Annals of the New York Academy of Sciences* 626, 545-560.
- Bosc, M.J., Germain, G., Nicolle, A., Mouren, M., Philibert, D., Baulieu, E.E., 1987. Control of birth in rats by RU 486, an antiprogestosterone compound. *Journal of reproduction and fertility* 79, 1-8.
- Bosch, O.J., Musch, W., Bredewold, R., Slattery, D.A., Neumann, I.D., 2007. Prenatal stress increases HPA axis activity and impairs maternal care in lactating female offspring: implications for postpartum mood disorder. *Psychoneuroendocrinology* 32, 267-278.
- Brummelte, S., Galea, L.A., 2010a. Depression during pregnancy and postpartum: contribution of stress and ovarian hormones. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 34, 766-776.
- Brummelte, S., Galea, L.A.M., 2010b. Chronic corticosterone during pregnancy and postpartum affects maternal care, cell proliferation and depressive-like behavior in the dam. *Hormones and behavior* 58, 769-779.

- Brummelte, S., Pawuski, J.L., Galea, L.A.M., 2006. High post-partum levels of corticosterone given to dams influence postnatal hippocampal cell proliferation and behavior of offspring: A model of post-partum stress and possible depression. *Hormones and behavior* 50, 370-382.
- Brunton, P.J., Russell, J.A., Douglas, A.J., 2008. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *Journal of neuroendocrinology* 20, 764-776.
- Casey, T.M., Plaut, K., 2007. The role of glucocorticoids in secretory activation and milk secretion, a historical perspective. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 12, 293-304.
- Catheline, G., Touquet, B., Besson, J.M., Lombard, M.C., 2006. Parturition in the rat: a physiological pain model. *Anesthesiology* 104, 1257-1265.
- Craft, R.M., Kostick, M.L., Rogers, J.A., White, C.L., Tsutsui, K.T., 2010. Forced swim test behavior in postpartum rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 96, 402-412.
- Chourbaji, S., Hoyer, C., Richter, S.H., Brandwein, C., Pfeiffer, N., Vogt, M.A., Vollmayr, B., Gass, P., 2011. Differences in mouse maternal care behavior - is there a genetic impact of the glucocorticoid receptor? *PloS one* 6, e19218.
- da Rocha, C.M., Kac, G., 2012. High dietary ratio of omega-6 to omega-3 polyunsaturated acids during pregnancy and prevalence of post-partum depression. *Maternal & child nutrition* 8, 36-48.
- Dagnino-Subiabre, A., Perez, M.A., Terreros, G., Cheng, M.Y., House, P., Sapolsky, R., 2012. Corticosterone treatment impairs auditory fear learning and the dendritic morphology of the rat inferior colliculus. *Hearing research* 294, 104-113.

- Dalm, S., Karszen, A.M., Meijer, O.C., Belanoff, J.K., de Kloet, E.R., 2019. Resetting the Stress System with a Mifepristone Challenge. *Cellular and molecular neurobiology* 39, 503-522.
- de Kloet, E.R., Joels, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature reviews. Neuroscience* 6, 463-475.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joels, M., 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine reviews* 19, 269-301.
- Douglas, A.J., Brunton, P.J., Bosch, O.J., Russell, J.A., Neumann, I.D., 2003. Neuroendocrine responses to stress in mice: hyporesponsiveness in pregnancy and parturition. *Endocrinology* 144, 5268-5276.
- Drury, S.S., Scaramella, L., Zeanah, C.H., 2016. The Neurobiological Impact of Postpartum Maternal Depression: Prevention and Intervention Approaches. *Child and adolescent psychiatric clinics of North America* 25, 179-200.
- Duarte, E.C., de Azevedo, M.S., Pereira, G.A., Fernandes, M.D., Lucion, A.B., 2017. Intervention with the mother-infant relationship reduces cell proliferation in the Locus Coeruleus of female rat pups. *Behavioral neuroscience* 131, 83-91.
- Eshkevari, L., Mulroney, S.E., Egan, R., Lao, L., 2015. Effects of Acupuncture, RU-486 on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Chronically Stressed Adult Male Rats. *Endocrinology* 156, 3649-3660.
- Fang, X., Wong, S., Mitchell, B.F., 1997. Effects of RU486 on estrogen, progesterone, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation. *Endocrinology* 138, 2763-2768.
- Fernandez, J.W., Grizzell, J.A., Philpot, R.M., Wecker, L., 2014. Postpartum depression in rats: differences in swim test immobility, sucrose preference and nurturing behaviors. *Behavioural brain research* 272, 75-82.

- Fisher, J., Cabral de Mello, M., Patel, V., Rahman, A., Tran, T., Holton, S., Holmes, W., 2012. Prevalence and determinants of common perinatal mental disorders in women in low- and lower-middle-income countries: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization* 90, 139G-149G.
- Haim, A., Sherer, M., Leuner, B., 2014. Gestational stress induces persistent depressive-like behavior and structural modifications within the postpartum nucleus accumbens. *The European journal of neuroscience* 40, 3766-3773.
- Harris, R.B., 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. *Physiology & behavior* 63, 91-100.
- Hoshino, K., Wakatsuki, Y., Iigo, M., Shibata, S., 2006. Circadian Clock mutation in dams disrupts nursing behavior and growth of pups. *Endocrinology* 147, 1916-1923.
- Katz, R.J., 1982. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 16, 965-968.
- Kersten-Alvarez, L.E., Hosman, C.M., Riksen-Walraven, J.M., van Doesum, K.T., Smeekens, S., Hoefnagels, C., 2012. Early school outcomes for children of postpartum depressed mothers: comparison with a community sample. *Child psychiatry and human development* 43, 201-218.
- Kurt, H., 2015. *What can animal models tell us about depressive disorders?* 1° ed. Woodhead Publishing.
- Larsen, M.H., Mikkelsen, J.D., Hay-Schmidt, A., Sandi, C., 2010. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *Journal of psychiatric research* 44, 808-816.

- Li, J., Sun, J.D., Liu, Y., Yuan, Y.H., Chen, N.H., 2013. [Mifepristone repairs alteration of learning and memory abilities in rat model of depression]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 48, 1221-1226.
- Lonstein, J.S., 2005. Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. *Hormones and behavior* 47, 241-255.
- Lonstein, J.S., 2007. Regulation of anxiety during the postpartum period. *Frontiers in neuroendocrinology* 28, 115-141.
- Matthews, K., Forbes, N., Reid, I.C., 1995. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. *Physiology & behavior* 57, 241-248.
- Melniczek, J.R., Ward, I.L., 1994. Patterns of ano-genital licking mother rats exhibit toward prenatally stressed neonates. *Physiology & behavior* 56, 457-461.
- MINSAL, 2014. Protocolo de detección de la depresión durante el Embarazo y posparto y apoyo al tratamiento.
- Morley-Fletcher, S., Darnaudery, M., Koehl, M., Casolini, P., Van Reeth, O., Maccari, S., 2003. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test - Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Research* 989, 246-251.
- Myers, M.M., Brunelli, S.A., Squire, J.M., Shindeldecker, R.D., Hofer, M.A., 1989. Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. *Developmental psychobiology* 22, 29-53.
- Myers, S., Johns, S.E., 2018. Postnatal depression is associated with detrimental life-long and multi-generational impacts on relationship quality. *PeerJ* 6, e4305.
- Neumann, I.D., Johnstone, H.A., Hatzinger, M., Liebsch, G., Shipston, M., Russell, J.A., Landgraf, R., Douglas, A.J., 1998. Attenuated neuroendocrine responses to

emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *The Journal of physiology* 508 (Pt 1), 289-300.

- Patin, V., Lordi, B., Vincent, A., Thoumas, J.L., Vaudry, H., Caston, J., 2002. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. *Brain research. Developmental brain research* 139, 1-8.
- Pawluski, J.L., Csaszar, E., Savage, E., Martinez-Claros, M., Steinbusch, H.W.M., van den Hove, D., 2015. Effects of Stress Early in Gestation on Hippocampal Neurogenesis and Glucocorticoid Receptor Density in Pregnant Rats. *Neuroscience* 290, 379-388.
- Pereira, M., Ferreira, A., 2006. Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behavioural brain research* 175, 139-148.
- Pereira, M., Morrell, J.I., 2011. Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation. *Journal of neuroendocrinology* 23, 1020-1035.
- Perez, M.A., Terreros, G., Dagnino-Subiabre, A., 2013. Long-term omega-3 fatty acid supplementation induces anti-stress effects and improves learning in rats. *Behavioral and brain functions : BBF* 9, 25.
- Pisu, M.G., Boero, G., Biggio, F., Garau, A., Corda, D., Congiu, M., Concas, A., Porcu, P., Serra, M., 2017. Juvenile social isolation affects maternal care in rats: involvement of allopregnanolone. *Psychopharmacology* 234, 2587-2596.
- Podestá, L., Alarcón, A., Muñoz, S., Legüe, M., Bustos, L., Barría, M., 2014. Alteración del desarrollo psicomotor en hijos de mujeres con depresión posparto de la ciudad de Valdivia-Chile. . *Revista médica Chilena* 141, 464-470.

- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 229, 327-336.
- Pucilowski, O., Overstreet, D.H., Rezvani, A.H., Janowsky, D.S., 1993. Chronic mild stress-induced anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. *Physiology & behavior* 54, 1215-1220.
- Reul, J.M., Collins, A., Saliba, R.S., Mifsud, K.R., Carter, S.D., Gutierrez-Mecinas, M., Qian, X., Linthorst, A.C., 2015. Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. *Neurobiology of stress* 1, 44-59.
- Robertson, E., Celasun, N., Stewart, D., 2003. Risk factors for postpartum depression, in: Stewart, D., Robertson, E., Dennis, C.-L., Grace, S., Wallington, T. (Eds.), *Postpartum depression: Literature review of risk factors and interventions.*, Toronto Public Health pp. 9-71.
- Sclafani, A., Thompson, B., Smith, J.C., 1998. The rat's acceptance and preference for sucrose, maltodextrin, and saccharin solutions and mixtures. *Physiology & behavior* 63, 499-503.
- Smith, J.W., Seckl, J.R., Evans, A.T., Costall, B., Smythe, J.W., 2004. Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. *Psychoneuroendocrinology* 29, 227-244.
- Srinivasan, S., Shariff, M., Bartlett, S.E., 2013. The role of the glucocorticoids in developing resilience to stress and addiction. *Frontiers in psychiatry* 4, 68.
- Stern, J.M., Keer, S.E., 1999. Maternal motivation of lactating rats is disrupted by low dosages of haloperidol. *Behavioural brain research* 99, 231-239.
- Strekalova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, F.A., Gass, P., 2004. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and

exploration. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 29, 2007-2017.

- Strohle, A., Holsboer, F., 2003. Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 3, S207-214.
- Tops, M., Buisman-Pijlman, F.T., Boksem, M.A., Wijers, A.A., Korf, J., 2012. Cortisol-induced increases of plasma oxytocin levels predict decreased immediate free recall of unpleasant words. *Frontiers in psychiatry* 3, 43.
- Urdaneta, Rivera, García, Guerra, Baabel, Contreras, 2010. Prevalencia de depresión posparto en primigestas y múltiparas valoradas por la escala de Edimburgo. *Revista Chilena Obstetricia y Ginecología* 75, 312-320.
- Vyas, S., Maatouk, L., 2013. Contribution of glucocorticoids and glucocorticoid receptors to the regulation of neurodegenerative processes. *CNS & neurological disorders drug targets* 12, 1175-1193.
- Wang, M.W., Crombie, D.L., Hayes, J.S., Heap, R.B., 1995. Aberrant maternal behaviour in mice treated with a progesterone receptor antagonist during pregnancy. *The Journal of endocrinology* 145, 371-377.
- Wei, N., Yu, Y., Schmidt, T., Stanford, C., Hong, L., 2013. Effects of glucocorticoid receptor antagonist, RU486, on the proliferative and differentiation capabilities of bone marrow mesenchymal stromal cells in ovariectomized rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 31, 760-767.