



**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA O QUÍMICA**

**“EFECTO ANTIESTRÉS DE UN ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE  
ENDOCANABINOIDE TIPO 1”**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN CIENCIAS MENCIÓN  
BIOLOGÍA**

**MACARENA FRANCISCA GÁRATE PÉREZ**

**DIRECTOR:  
Prof. Dr. ALEXIES DAGNINO SUBIABRE**

**VALPARAÍSO, CHILE  
2013**

## **AGRDECIMIENTOS FAMILIARES.**

Primero que todo quiero agradecer a mi mamá y a mi papá por ser los mejores. Por el apoyo incondicional que siempre me han dado, estando siempre presentes en todos los niveles de mi educación formal e informal, también quisiera agradecerles por todo el amor que nos han entregado a mis hermanos y a mí.

Segundo quisiera agradecer a toda mi familia, a mis abuelos, que ya partieron, a mis abuelas, tíos, tías, primos y primas, que de alguna forma contribuyeron con un granito de arena durante periodos de vacas flacas, comprando alguna parte del uniforme, cuidándonos mientras mis padres trabajaban o simplemente ayudándonos con las tareas, muchas gracias.

Como escribió un poeta por ahí “Todo pasa y todo queda, pero lo nuestro es pasar, pasar haciendo caminos, caminos sobre la mar” (Antonio Machado, 1912), que luego musicalizó un grande de la música, Joan Manuel Serrat.

También quisiera agradecer a todas mis amigas y amigos por su apoyo incondicional durante este año, en el cual he estado algo ausente, por siempre darme una palabra de apoyo, algún consejo y por sobre todo su incondicional amistad.

Y no puedo dejar de nombrar a un pequeño grupo de amigas, que sobre todo durante este año hemos afeitado, congeniando como nadie pensó que alguna vez lo haríamos, muchas gracias por su incondicional apoyo, por sus palabras de aliento cuando ya estaba literalmente agotada, por distraer mi mente con sus shows y cuentitos, por tomarnos esa chela conversada cuando nadie más podía, por esos té cantados en los laboratorios cuando nadie más estaba en la U, por todo esos buenos y malos momentos y por sobre todas las cosas ser buenas personas.

**GRACIAS TOTALES !!!.**

## **AGRADECIMIENTOS AL LABORATORIO.**

Me gustaría darles las gracias a todos los compañeros del laboratorio por su apoyo y ayuda con los experimentos, por siempre estar dispuestos a trabajar en equipo y a colaborar.

También quisiera dar las gracias por el excelente ambiente de trabajo que se ha formado, y eso hay que cuidarlo y valorarlo, porque no en todos los lugares es así.

Este ha sido un año agotador, hicimos muchos experimentos y éramos muchos, así que muchas gracias por su paciencia y respeto.

A sí mismo, quisiera agradecer al profesor Alexies, por abrir las puertas de su laboratorio para incorporarme al mundo de la ciencia, por su incondicional apoyo, por darme el trabajo de enseñarnos cada detalle de lo que hacemos hasta que lo entendamos, por enseñarnos las cosas, no por instrucciones, sino que haciendo las cosas con nosotros, por enseñarme que la verdad nunca es absoluta, y que hay que respetar el punto de vista de otros, por pedir siempre la opinión de todos y hacernos trabajar en equipo. Muchas gracias por la vocación de profesor y por enseñarnos. Muchas gracias.

Por último quisiera agradecer a todos los profesores que alguna vez durante los años en los que estuve en la carrera me hicieron clases. Ya que sin ellos no habría entendido nada de lo que realmente significa ser científico.

Muchas gracias.

## Índice

Resumen.....	4
Marco teórico.....	5
Planteamiento del Problema.....	9
Hipótesis y Objetivos.....	9
Materiales y Métodos.....	10
Resultados.....	17
Discusión.....	27
Conclusiones.....	32
Financiamiento.....	33
Referencias.....	33

## Resumen

El estrés es un concepto relacionado con las respuestas biológicas asociadas a la capacidad de adaptación que tiene el organismo frente a cambios ambientales llamados estresores. El principal sistema neuroendocrino de la respuesta al estrés es el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA), en situaciones estresantes este sistema se activa. Por otro lado, cuando los animales se adaptan al estresor, el sistema endocanabinoide (eCB) suscita una disminución de la actividad del eje HPA.

El estrés crónico es ansiogénico y deteriora la memoria de las ratas. Estas alteraciones conductuales se correlacionan con un aumento de la síntesis de eCBs respecto a animales controles. En esta tesis se plantea la hipótesis de que el tratamiento con un inhibidor del receptor tipo 1 de eCB ( $CB_1$ ) tiene un efecto antiestrés en las ratas estresadas. Los animales fueron estresados crónicamente usando un modelo de restricción de movimiento, y se evaluaron los dos principales marcadores fisiológicos del estrés, el nivel plasmático de corticosterona y la ganancia en peso. En este sentido, a nivel conductual se cuantificó la ansiedad, el aprendizaje y la memoria en el paradigma conductual laberinto acuático de Morris (MWM). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con AM251, un antagonista de receptor  $CB_1$ , disminuyó la ansiedad y la concentración plasmática de corticosterona en las ratas estresadas. Además, AM251 mejoró el deterioro que induce el estrés crónico en el aprendizaje y la memoria. Estos resultados muestran que un antagonista de receptor  $CB_1$  tiene un potente efecto antiestrés en las ratas estresadas crónicamente. Este estudio preclínico entrega información muy relevante sobre la neurobiología de la interacción entre el estrés y el sistema endocanabinoide, la cual podría servir de base para desarrollar mejores tratamientos para los trastornos de ansiedad y depresivos.

## **Marco teórico.**

### ***Estrés.***

El estrés es una reacción biológica compleja que favorece la adaptación en todos los animales cuando son amenazados por estímulos del medio ambiente llamadas estresores (Selye, H, 1936, 1956). Las respuestas al estrés son de tipo neuroendocrina y conductual. Ambas están mediadas por la activación del eje HPA y el aumento de los niveles plasmáticos de glucocorticoides (Dagnino-Subiabre, 2013). En el caso de las ratas *Sprague Dawley* el principal glucocorticoide es la corticosterona y en primates es el cortisol.

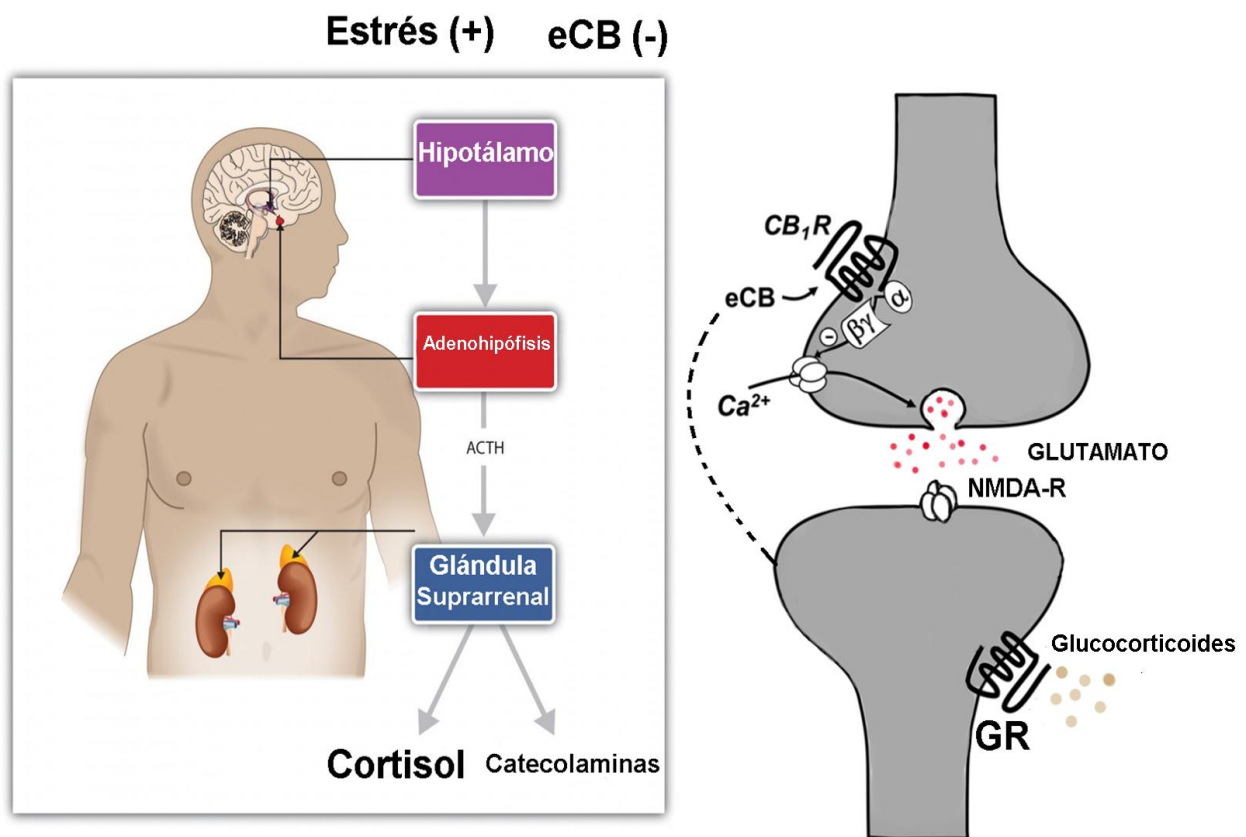
El eje HPA es capaz de coordinar la actividad de varios sistemas fisiológicos periféricos a través de la liberación de corticosterona y de catecolaminas desde las glándulas adrenales (Pérez MÁ et al., 2013). Ante la presencia de un estresor los animales responden aumentando la actividad neuronal en el complejo amigdaloides. Las aferencias glutamatérgicas que llegan al núcleo paraventricular (NPV) del en el hipotálamo inducen la liberación del factor liberador de corticotropina desde el NPV hacia la adenohipófisis. Esto estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrópica hacia la circulación sistémica, la cual estimula la síntesis de glucocorticoides desde la corteza de las glándulas suprarrenales y de catecolaminas desde la médula adrenal (Smith SM et al., 2006; Herman JP et al., 2013), (Esquema 1). Los glucocorticoides activan la glucogenolisis aumentando la glicemia, mientras que las catecolaminas aumentan la frecuencia cardíaca ayudando a movilizar la glucosa hacia los músculos estriados para desarrollar las respuestas conductuales al estrés, la lucha y el escape (Esquema 1). Esta respuesta adaptativa a los estresores es conocida como eustrés o estrés positivo (McEwen BS et al., 1992). Sin embargo, cuando el estrés se prolonga en el tiempo y se vuelve incontrolable se convierte en un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades crónicas con alto impacto social y económico en el mundo, tales como los trastornos depresivos y ansiosos (Tafet GE et al., 2003). Este tipo de estrés es conocido como distrés o estrés crónico.

### ***Interacciones entre el Sistema Endocannabinoides y el eje HPA.***

Los endocannabinoides (eCBs) son moléculas de naturaleza lipídica las cuales tienen funciones esenciales en el sistema nervioso central (DiPatrizio NV et al., 2012). En este sentido, los eCBs más abundantes en el sistema nervioso son el N-araquidonoiletanolamina (anandamida) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Kano M et al., 2009). Puesto que la actividad neuronal es un potente estímulo para la liberación de los eCBs, se ha demostrado que los eCBs actúan como mensajeros retrógrados, regulando la transmisión sináptica a través del receptor tipo 1 de eCB (CB<sub>1</sub>) (Heifets BD y Castillo PE, 2009). A nivel postsináptico la activación del receptor metabotrópico tipo I de glutamato (mGlu<sub>1</sub>) genera una cascada intracelular que promueve la formación de 2-AG mediado por la enzima lipasa diacilglicerol (DGL) a partir de fosfatidilinositol (PI) (Heifets BD y Castillo PE, 2009). Por otro lado, el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular contribuye a la movilización de eCBs, este aumento puede depender de la entrada de Ca<sup>2+</sup> de canales dependientes de voltaje o receptores NMDA (NMDA-R) o desde la liberación del retículo endoplasmático (RE), activando cascadas intracelulares que permiten la liberación de 2-AG (Heifets BD y Castillo PE, 2009). El 2-AG viaja retrógradamente al terminal presináptico y se une al receptor CB<sub>1</sub> (Heifets BD y Castillo PE, 2009). La activación de este receptor induce una cascada de transducción de señales que termina con la inhibición de la liberación del neurotransmisor (Gorzalka BB et al., 2008), (Esquema 1). El receptor CB<sub>1</sub> se expresa en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas dependiendo del área del cerebro, por ejemplo, en el hipocampo y la amígdala se expresa mayoritariamente en neuronas GABAérgicas mientras que en la neocorteza se expresa en ambos tipos neuronales (Hill EL et al., 2007; Di S et al 2003; Ziegler CG et al., 2010).

En el hipotálamo los eCBs funcionan como un sistema de retroalimentación negativo del eje HPA (Ishac EJ et al., 1996). El estrés aumenta la actividad del eje HPA, luego de la lucha o el escape los eCBs disminuyen la actividad del eje HPA, favoreciendo el retorno a la homeostasis y la adaptación al medio. Durante las respuestas al estrés, a nivel molecular, el aumento de actividad en las neuronas glutamatérgicas ubicadas en el NPV aumenta la formación de 2-AG (Ishac EJ et

al., 1996). Los receptores CB1 se expresan en las neuronas glutamatérgicas del NPV y al activarse disminuyen la actividad neuronal en el hipotálamo favoreciendo la disminución de la actividad del eje HPA. En este sentido, se plantea la hipótesis de que al activarse los receptores de glucocorticoides (GR) ubicados en la membrana plasmática mediado por la corticosterona aumenta la liberación de 2-AG lo cual favorece la disminución de la actividad del eje HPA (Keller-Wood ME et al., 1984; Tasker JG et al., 2006; Rademacher DJ et al., 2008).



**Esquema 1.** Interacción entre el eje HPA y el sistema eCBs en condiciones no patológicas. Los estresores activan el eje HPA mientras que los eCBs lo disminuyen a través del GR.

### ***Efecto del Estrés Crónico y el Sistema Endocanabinoide.***

El estrés crónico afecta la interacción del sistema eCBs y el eje HPA, en consecuencia genera una menor adaptación a los estresores. En la amígdala las ratas estresadas presentan bajas concentraciones de anandamida y altos niveles de 2-AG (Wamsteeker JI et al., 2010; Hill MN et al., 2008). Esta evidencia sugiere que el estrés crónico induce una disminución de la inhibición en la amígdala, lo que favorece el aumento de la actividad excitatoria en ratas estresadas. Como resultado de estas alteraciones aumentaría la actividad neuronal en la amígdala extendida o *bed nucleus of the stria terminalis* (BNST) y en el NPV, favoreciendo un aumento de la ansiedad y un aumento de la actividad del eje HPA respectivamente. En concordancia con estos argumentos, es posible que el uso de un antagonista del receptor CB<sub>1</sub>, como AM251, pueda tener un efecto terapéutico en los animales estresados.

### ***Conducta Ansiosa.***

La ansiedad es una reacción adaptativa inducida en todos los animales cuando se enfrentan a un potencial peligro o demanda. Así, la ansiedad tiene un papel biológico-adaptativo y es muy conservada en la evolución (Ohl F et al., 2008). Niveles excesivos o patológicos de ansiedad inducen respuestas no adaptativas (Ohl F et al., 2008). El complejo amigdaloides y el BNST regulan la conducta ansiosa (Davis M et al., 2010). El estrés crónico induce hipertrofia dendrítica en la amígdala lo cual se asocia a un aumento de la ansiedad en las ratas estresadas (Vyas A et al., 2002, 2003, 2004).

### ***Memoria y Estrés crónico.***

La memoria es la capacidad que tiene el cerebro de almacenar y evocar información contextual y emocional. Las memorias tienen 3 etapas: adquisición o aprendizaje, consolidación y reconsolidación, cada una de estas etapas está asociada a diferentes procesos celulares, por ejemplo, las memorias adquiridas y que son de corto plazo involucran la activación de receptores NMDA, mientras que cuando la memoria se consolida involucra la síntesis de proteínas (Phelps y

Leroux, 2005). Una memoria consolidada puede evocarse y volverse lábil y susceptible a ser modificada por el ambiente, este proceso es conocido como reconsolidación (Phelps y Leroux, 2005).

Las memorias de tipo contextuales son reguladas por el hipocampo (Shafe et al., 2001). El estrés crónico induce retracción dendrítica en el hipocampo y deteriora la memoria contextual en los roedores (Conrad DC, 2010).

### **Planteamiento del problema.**

El estrés crónico afecta la ansiedad, el aprendizaje y la memoria de los animales. Estas alteraciones se relacionan con el desarrollo de los trastornos depresivos y ansiosos. Por esta razón se han desarrollado modelos animales de experimentación para desarrollar tratamientos que prevengan y/o mejoren los trastornos que puede producir el estrés crónico. En este contexto, es muy importante estudiar si el tratamiento con AM251 puede prevenir las alteraciones que induce el estrés crónico.

### **Hipótesis.**

“El tratamiento con AM251, un antagonista de receptor CB<sub>1</sub>, tiene un efecto antiestrés en ratas *Sprague Dawley* sometidas a estrés crónico”.

### **Objetivo general.**

- Determinar el efecto antiestrés de AM251 en ratas *Sprague Dawley* estresadas.

### **Objetivos específicos.**

Cuantificar en los grupos experimentales (Control, Vehículo, AM251, Estrés, Vehículo + Estrés y AM251 + Estrés):

1. Actividad locomotora.
2. Marcadores fisiológicos del estrés: ganancia de peso y niveles séricos de corticosterona.
3. Marcadores conductuales: ansiedad, aprendizaje y consolidación de la

memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.

4. Analizar la expresión del RNA de CB<sub>1</sub> en el hipocampo de ratas estresadas a través de PCR.

## **Materiales y Métodos.**

### **1.- Animales de experimentación.**

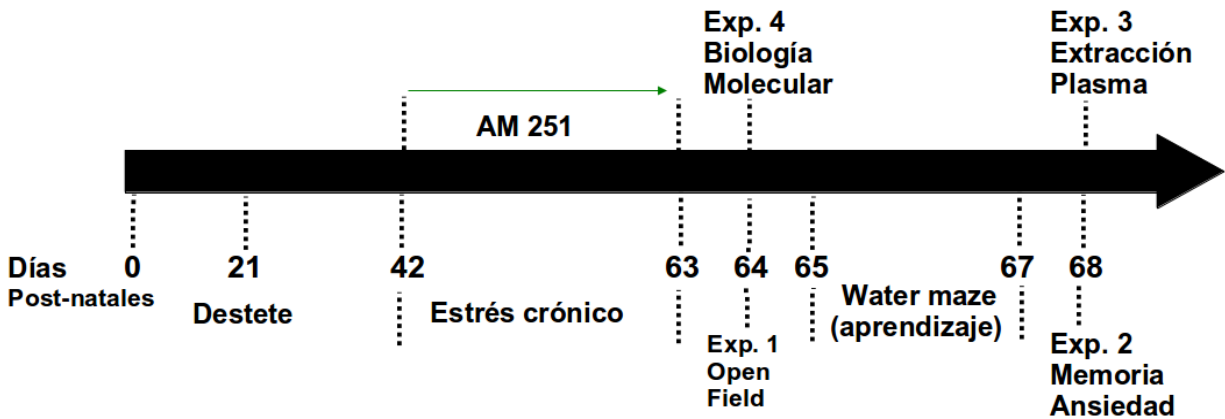
Se usarán ratas *Sprague Dawley* machos de 21 días y de aproximadamente 200 (g) al inicio de los experimentos. Estos animales se mantendrán en grupos de tres en cajas de acrílico transparente de 20 x 20 x 40 cm, con un ciclo circadiano de 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad (luz encendida a las 08:00 AM), en una habitación con temperatura y humedad controlada (20 ± 1 °C, 55 %). El laboratorio donde se llevarán a cabo los experimentos estará aislado de ruidos ambientales externos. Los animales tendrán libre acceso a comida y agua, estos serán pesados diariamente con una balanza digital (modelo WLC2/A1, Radwag, Polonia). Todos los animales serán alimentados *ad libitum* con un alimento comercial de la marca LabDiet® (Prolab RMH 3000, MO, USA).

Todos los experimentos y la manipulación de los animales se realizaron de acuerdo al protocolo ético establecido por el “National Institutes of Health” (USA) y aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Se realizaron los máximos esfuerzos para minimizar el número de animales que se usaron en cada grupo experimental y su sufrimiento durante el proceso. Proyectos Fondecyt N° 1100413 y 1141276 (Prof. Dr. Alexies Dagnino Subiabre).

### **2.- Diseño Experimental**

Se utilizaron dos grupos experimentales, no estresados (*unstressed*) y estresados (*stressed*). Cada uno de estos grupos fue subdividido en 3 subgrupos: control, vehículo (los animales fueron inyectados (i.p.) diariamente durante el protocolo de estrés con suero fisiológico más etanol 25 mM en un volumen final de 800 µL), AM251 (los animales fueron inyectados con 0.3 mg/kg/día de AM251). Se

utilizaron diferentes grupos de ratas para los experimentos conductuales, ELISA y de biología molecular. En cada uno de estos se usaron 6 animales.



**Esquema 1.** Diseño experimental.

En el día 21 post natal ocurrirá el destete, aquí las crías pueden alimentarse independientemente y serán separadas de la madre para formar los grupos experimentales. Todos los animales serán pesados diariamente hasta finalizar cada uno de los experimentos.

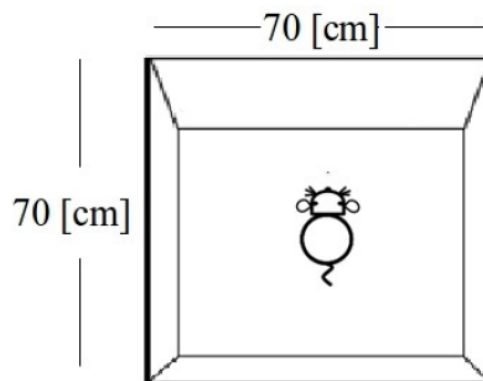
En el día 42 las ratas pesaron aproximadamente 200 g, aquellos animales que formaron los grupos estrés fueron estresados por restricción de movimiento durante 21 días consecutivos (6 horas/día). Los animales que se usaron en los experimentos N° 3 y 4 fueron eutanasiados en el día post natal 64 y 68 bajo anestesia profunda usando isofluorano. Los experimentos N° 1 (Open Field) y 2 (MWM) se realizaron entre los días 64 y 67. Posteriormente fueron eutanasiadas bajo el mismo protocolo que los experimentos N° 3 y 4.

### **3.- Experimento N° 1.**

#### **Actividad Locomotora (Campo abierto u Open Field).**

Veinticuatro horas después de la última sesión de estrés se midió la actividad locomotora en los grupos experimentales. Es muy importante medir la actividad locomotora antes de aplicar otros paradigmas conductuales ya que si la rata presenta alteraciones locomotoras, estas pueden inducir la aparición de falsos positivos o negativos en el análisis de otras pruebas. La actividad locomotora fue

medida a través de la distancia recorrida y la velocidad media que presentan los animales en el paradigma open field. Esta prueba fue realizada ubicando cada rata en el centro de una caja de acrílico negro (70x70x40 cm) dividida virtualmente en 16 grillas iguales usando el programa ANY-Maze (Stoelting Co., Illinois, USA). La rata pudo explorar durante 5 minutos el laberinto y fue grabada usando una cámara IP (VIVOTEK, Sunnyvale CA, USA). Los videos fueron obtenidos con el programa Nuuo (Nuuo, Taipei, Taiwan). La iluminación fue de  $300 \pm 20$  lux en el centro. Los siguientes parámetros fueron medidos con el programa ANY-Maze: locomoción distancia total recorrida, velocidad media (m/s) y tiempo en el centro (s). El laberinto será limpiado cada vez con una solución de etanol al 5 %.



**Esquema 3.** Esquema del paradigma conductual para medir actividad locomotora.

#### **4.- Experimento N° 2.**

##### ***El paradigma conductual Laberinto Acuático de Morris.***

Consiste en un contexto formado por una piscina circular de 180 cm de diámetro y 51 cm de alto, el agua fue opacada con tempera negra no tóxica y llena hasta los 31 cm de alto y a una temperatura de  $19^{\circ}$  C. En su interior se ubicó una plataforma de 13 cm de diámetro que se encuentra sumergida 2 cm bajo el nivel del agua. Esta plataforma fue la única vía de escape de la rata. En las paredes que rodearon la piscina se ubicaron figuras geométricas de alto contraste (cuadrado, círculo, triángulo, líneas verticales) que funcionaron como claves espaciales que facilitaron la ubicación del animal durante el nado hacia la

plataforma. La piscina fue iluminada entre 90 y 100 lux en el centro y 125 lux en las figuras geométricas. Cada ensayo fue grabado con una webcam (Genius, WideCam 1050) adosada al techo de la habitación.

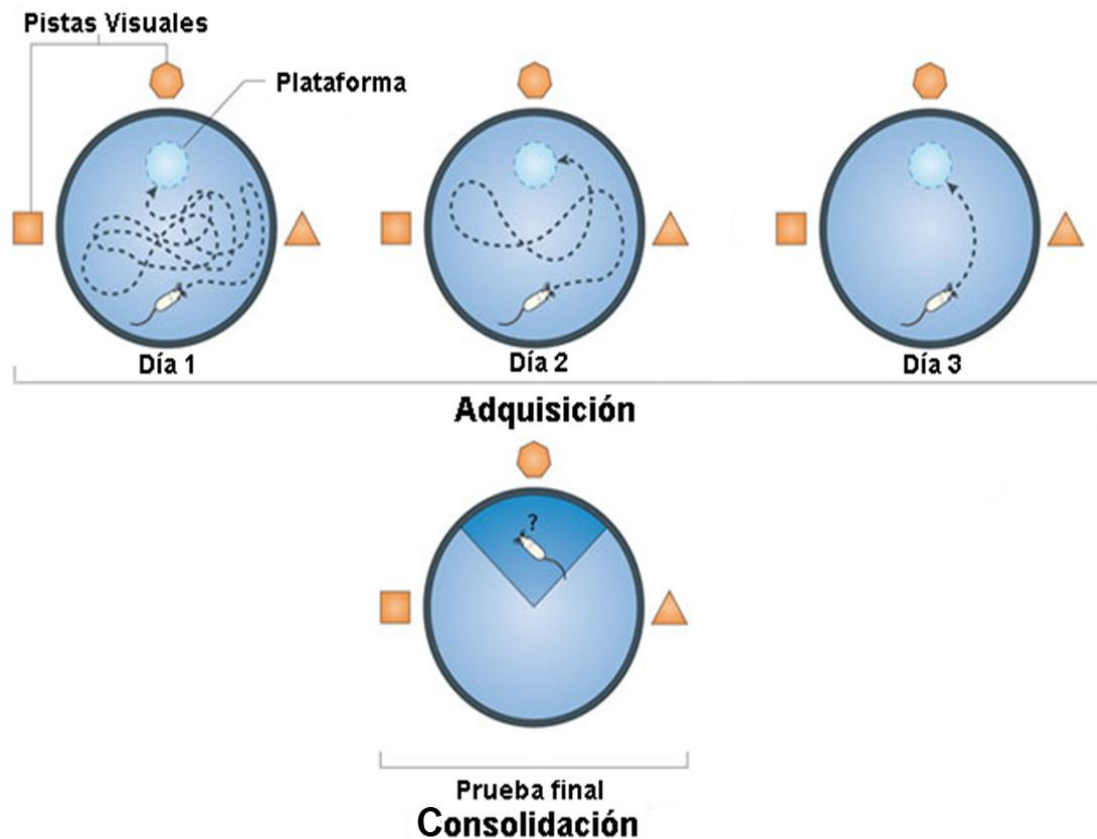
En la fase de adquisición o aprendizaje el animal tuvo que asociar las pistas espaciales con la ubicación de la plataforma sumergida para lograr llegar a un lugar más seguro (Morris, Garrud et al. 1982). El animal a medida que aprendió es capaz de realizar la prueba en un menor tiempo, incluso si es colocado en diferentes puntos de partida. Para evaluar consolidación de la memoria se realizó una prueba en la que se introdujo al animal en la piscina, pero esta vez sin plataforma (*Probe Trial* o prueba final). En este caso, se espera que si la memoria se consolidó, entonces el animal pasó más tiempo explorando la zona en la que estuvo la plataforma. El protocolo de aprendizaje y consolidación utilizado consta de cuatro partes fundamentales:

**Habitación:** Las ratas fueron llevadas en sus jaulas a la habitación en las que se realizó el entrenamiento en el Laberinto Acuático de Morris. Luego de 10 minutos, los animales fueron devueltos al bioterio.

**Entrenamiento:** Se realizó en 3 días, en cada día se realizaron 4 ensayos de entrenamiento. En cada ensayo el animal fue introducido suavemente en el agua, en algún punto de la piscina previamente determinado. Se utilizaron los puntos cardinales norte, noroeste, noreste, y sureste, estando fija la plataforma en el centro del cuadrante sur. A la rata se le permitió explorar la piscina durante 60 segundos, durante este tiempo el animal debió encontrar la plataforma. Si la rata no encuentra la plataforma en este tiempo, se le guió hasta la plataforma y permaneció en ella durante 15 segundos. Si la rata encuentra la plataforma en un tiempo menor a 60 segundos, se la dejó permanecer allí por 45 segundos. Luego la rata fue retirada de la piscina, secada y puesta en una caja calefaccionada (22° C aproximadamente) donde permaneció 10 minutos hasta el siguiente ensayo. Una vez terminados los 4 ensayos del día, la rata fue devuelta al bioterio.

**Consolidación de la Memoria:** Un día después de finalizado el entrenamiento se aplicó un ensayo pero sin la plataforma (*Probe Trial*). Cada rata fue depositada en el cuadrante opuesto al cuadrante donde estuvo originalmente

la plataforma. La ansiedad fue evaluada a través de la conducta de tigmotaxis en la piscina durante el *probe trial*.



**Esquema 4.** Esquema del paradigma conductual Laberinto acuático de Morris (Jonathan Kipnis, et al., 2012).

### 6.- Experimento N° 3.

Se usó un nuevo set de animales, cada grupo experimental tuvo 6 ratas. Los animales fueron sometidos a un estrés agudo nuevo (nadar en un MWM a 19 ° C) para estimular el eje HPA, Después de 60 segundos de nado estos fueron anestesiados con isoflurano (Pérez et al., 2013). Luego se obtuvo 1 mL de sangre desde la aurícula izquierda y se recolectó en tubos heparinizados. Las muestras fueron centrifugadas (Modelo: # MiniSpin Plus: Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 10.000 rpm por 20 minutos a 4° C. El plasma fue congelado a -80° C y después analizado. La corticosterona se determinó usando un Kit de inmunoensayo (BioAssay corticosterona, Catalog. #C7903-30,

Swampscott, MA, USA). Los valores de densidad óptica se midieron a una longitud de onda de 450 nm utilizando un lector de microplaca (Tecan GENios, Tecan Group Ltd., Suiza). Las muestras se diluyeron 01:10 y los valores finales se represaron en ng/mL. Límite de detección: 340 to 399 nm: 0 a 3.0 OD, 400 a 750 nm: 0 a 4.0 OD. Precisión: 0.0 a 2.0 OD/492 nm: mejor que  $\pm$  (0.5% + 0.005 OD); 2.0 a 3.0 OD/492 nm: mejor que  $\pm$  (1.0% + 0.005 OD).

#### **Experimento Nº 4.**

Se usó un nuevo set de animales para el experimento de biología molecular (6 ratas en cada grupo experimental).

**Microdissección:** Los animales fueron anestesiados con isoflurano y luego eutanasiados. Luego los animales fueron perfundidos con suero fisiológico estéril (NaCl al 0,9 %) y decapitados. El cerebro se extrajo y se realizó una microdissección para extraer el hipocampo.

**Protocolo Extracción Total de RNA:** el tejido se lisó con 175  $\mu$ L de *buffer* de lisis proveniente del *kit* de extracción de RNA de Promega®. Luego se agregó 350  $\mu$ L de *buffer* de dilución a los 175  $\mu$ L de lisado. Se mezcló por inversión y se pipeteó cuidadosamente. A continuación se incubó en un baño termorregulado a 70° C por tres minutos. Después se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos, para luego transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1500  $\mu$ L.

**Protocolo Purificación del RNA:** Al sobrenadante anterior se agregaron 200  $\mu$ L de etanol al 95 %, luego se mezcló por pipeteo y después se transfirió la mezcla a una columna de elución y se centrifugó a 14.000 rpm por 1 minuto. El eluato se eliminó. Después se puso la columna dentro de un tubo eppendorf nuevo de 1500  $\mu$ L y se agregaron 600  $\mu$ L de RNA *Wash Solution*. Luego se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm por 1 minuto.

Preparación del DNA I. Se mezcló en cada columna:

- 40  $\mu$ L de *Yellow Core Buffer*.
- 5  $\mu$ L 0,09 M  $MnCl_2$
- 5  $\mu$ L DNA I

La mezcla se mantuvo en hielo. Luego se agregaron 50  $\mu$ L de esta mezcla

a la membrana de la columna y se encubó por 15 minutos a 20 -25° C. Después se agregaron 200 µL de *DNase Stop Solution* a la columna y se centrifugó a 14.000 rpm por 1 minuto. Después se agregó a la columna 600 µL de *RNA Wash Solution* y centrifugó a 14.000 rpm por 1 minuto. El eluato fue eliminado y se agregó a la columna 250 µL de *RNA Wash Solution* y centrifugó a 14.000 rpm por dos minutos.

Por último se transfirió la columna a un tubo de elución y se agregaron 50 µL de Agua *Nuclease Free* y se centrifugó a 14.000 rpm por 1 minuto. Luego se repitió tres veces este proceso.

**Protocolo Transcripción Reversa PCR:** Por cada reacción se debe mezclar en un tubo, el volumen necesario de RNA para agregar 2 µg, luego se agregan 2 µL de *Oligo dT* y se completó con volumen necesario de agua DEPC hasta completar los 14 µL.

Luego incubar 5 minutos a 70° C y por cada tubo mezclar:

- 5 µL *Buffer M-MLV 5x*
- 5 µL *dNTPS 10 mM*
- 1 µL *M-MLV*

Luego someter a las muestras a ciclos de temperatura, por medio de un termociclador, marca My Gene™ modelo MG25+, con la siguiente programación; 1 ciclo de 60 minutos a 42° C.

**Protocolo de PCR:** Por cada reacción de PCR agregar a un tubo 5 µL de *Buffer Green Go Taq 5x*, luego agregar 1,5 µL de Solución de  $MgCl_2$  25 mM, después agregar 0,5 µL de *dNTPS 10 mM*, a continuación agregar cantidad de *Primers 10 mM* necesaria para que ocurra la reacción, seguido agregar cantidad suficiente de cDNA para que ocurra la reacción, luego agregar 0,2 µL de *Go Taq DNA Polymerase* y completar con Agua DEPC, hasta alcanzar los 25 µL.

Luego someter a las muestras a ciclos de temperatura, por medio de un termociclador, marca My Gene™ modelo MG25+, con la siguiente programación; 1 ciclo de 5 minutos a 95° C, 30 ciclos de 30 segundos a 95° C, 30 segundos a 58° C, 1 minuto a 72 ° C y 1 ciclo de 10 minutos a 72° C.

## **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con estadística no paramétrica a través de un análisis de varianza de mediciones repetidas usando como post test el de Bonferroni. Los resultados de los experimento de biología molecular se analizaron con t-test. Los datos se presentan en promedios con el respectivo error estándar medio (SEM). Los niveles de probabilidad menores o igual a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Se usó el programa estadístico GraphPad.

## **Resultados.**

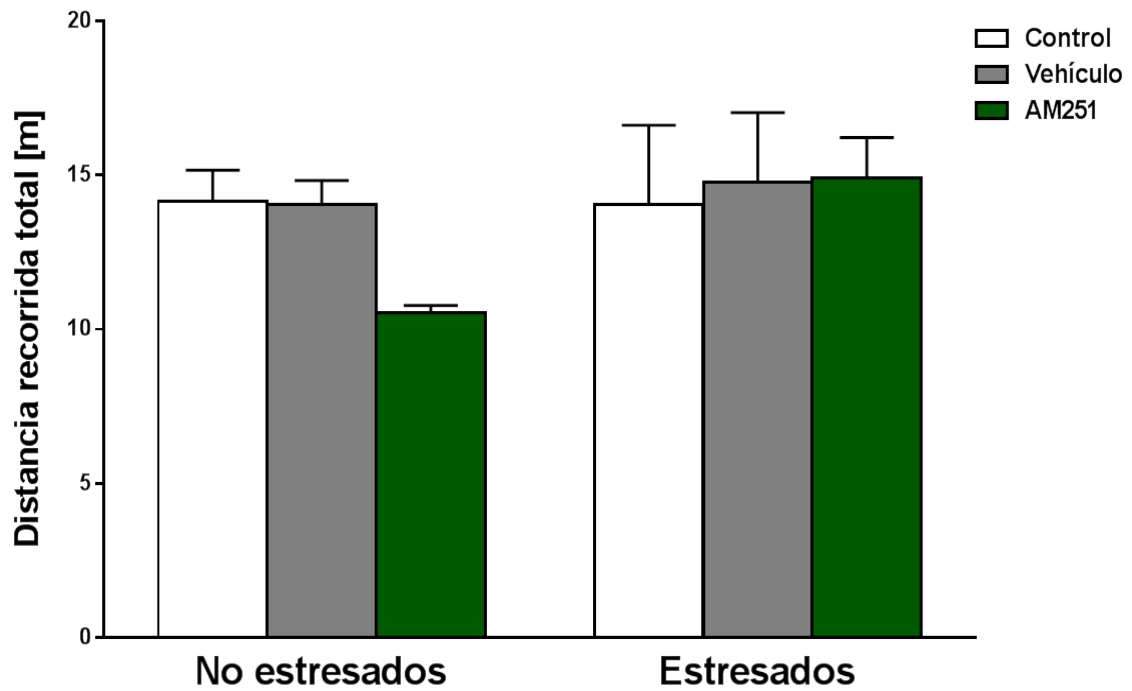
### ***Actividad Locomotora.***

El estrés crónico, las inyecciones con vehículo y el AM251 no afectaron la actividad locomotora de las ratas. No hubo diferencia en la distancia recorrida total (Control:  $14.17 \pm 1$  m, Estrés:  $14.06 \pm 2.6$  m, Vehículo:  $14.04 \pm 0.8$  m, Vehículo + Estrés:  $14.78 \pm 2.3$  m, AM251:  $10.54 \pm 0.2$  m, AM251 + Estrés:  $14.92 \pm 1.3$  m,  $p > 0.05$ ) (Figura 1A). Tampoco hubo diferencia en la velocidad promedio (Control:  $0.047 \pm 0.003$  m/s, Estrés:  $0.055 \pm 0.004$  m/s, Vehículo:  $0.048 \pm 0.002$  m/s, Vehículo + Estrés:  $0.053 \pm 0.006$  m/s, AM251:  $0.035 \pm 0.0008$  m/s, AM 251 + Estrés:  $0.050 \pm 0.004$  m/s,  $p > 0.05$ ) (Figura 1B). Los animales no presentaron diferencia en el tiempo de permanencia en el centro del laberinto (Control:  $22.58 \pm 5.7$  s, Estrés:  $17.82 \pm 6.1$  s, Vehículo:  $26.74 \pm 8.4$  s, Vehículo + Estrés:  $12.15 \pm 4.1$  s, AM251:  $16.6 \pm 1.1$  s, AM251 + Estrés:  $13.83 \pm 1.03$  s,  $p > 0.05$ ) (Figura 1C).

Figura 1. Actividad locomotora.

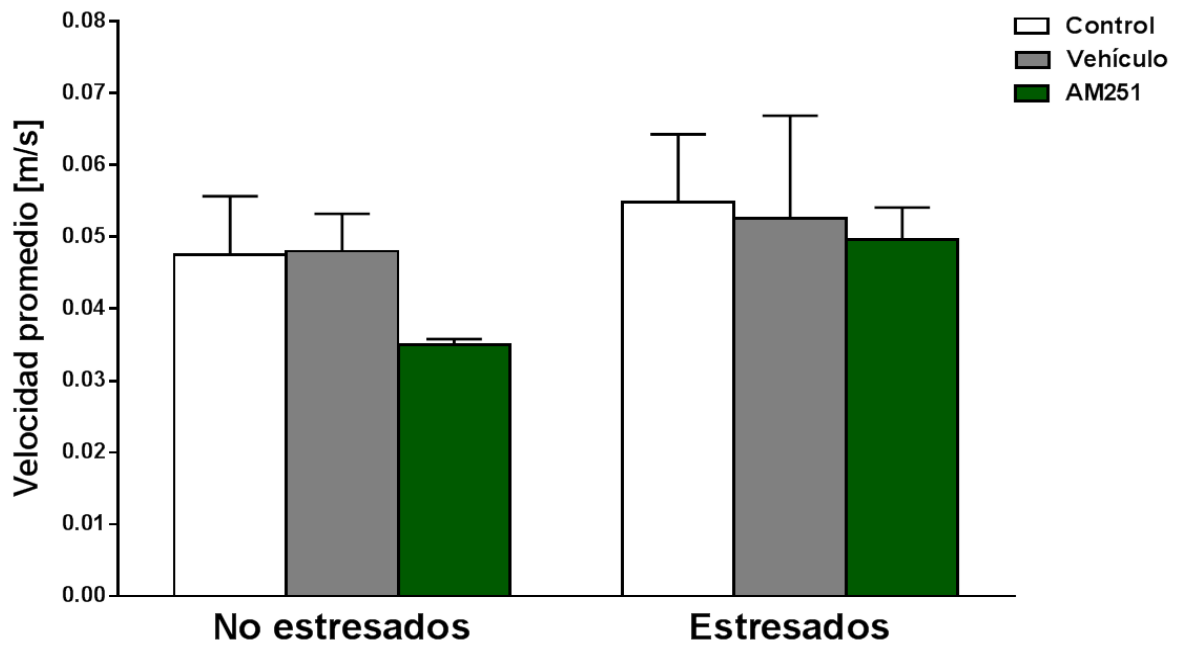
A)

### Actividad locomotora

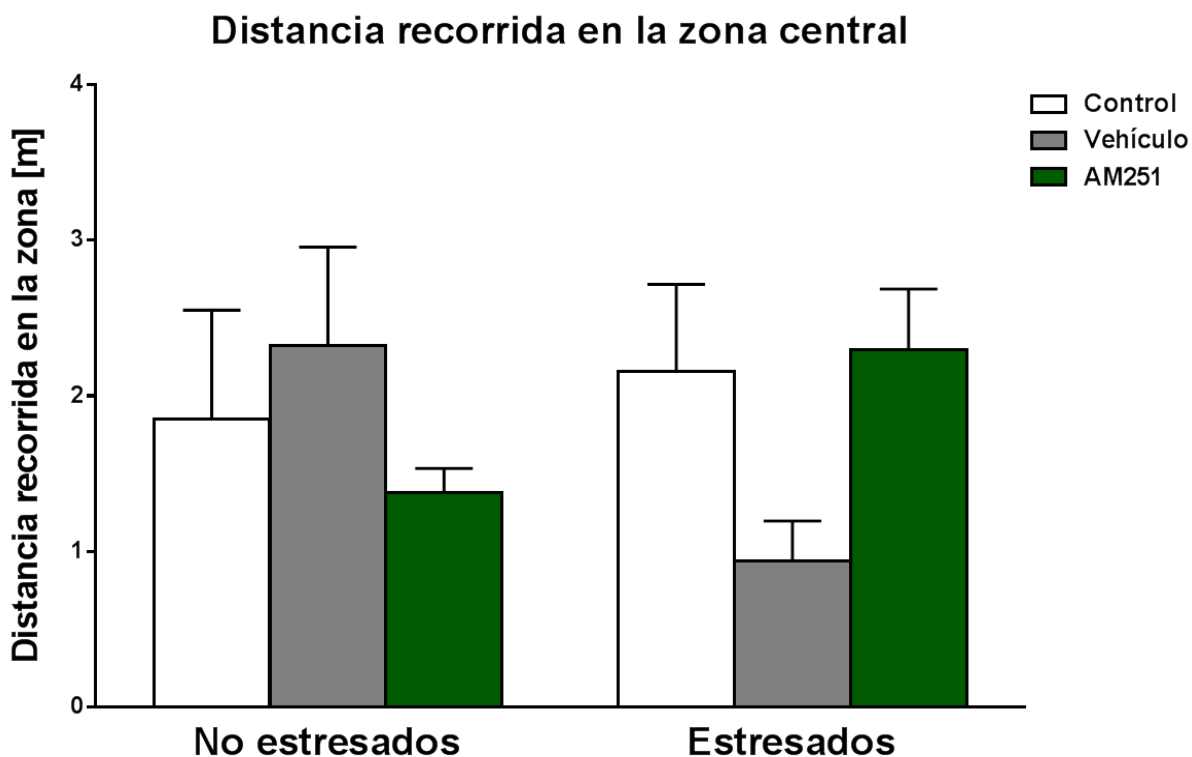


B)

### Actividad locomotora



C)



### ***Marcadores del Estrés***

#### ***Ganancia en Peso.***

El estrés por restricción de movimiento disminuyó la ganancia de peso respecto a los controles (Figura 2A). El análisis estadístico demostró que la disminución de ganancia en peso comenzó desde el día 14 del protocolo de estrés en el grupo AM251 + Estrés, en relación con el grupo Vehículo + Estrés (Figura 2A). La interacción entre el estrés y los días en que se aplicó el estrés fue significativa en los grupos experimentales Control y AM 251 (Control:  $F_{(3,30)} = 40.07$ ,  $p < 0.0001$ ; AM 251:  $F_{(6,45)} = 19.68$ ,  $p < 0.0001$ ). El estrés crónico también afectó a todos los grupos experimentales (Control:  $F_{(1,10)} = 15.20$ , Vehículo:  $F_{(1,10)} = 6.107$ ; AM251:  $F_{(2,15)} = 12.45$ ,  $p < 0.001$ ) (Figura 2A, B).

### **Ansiedad.**

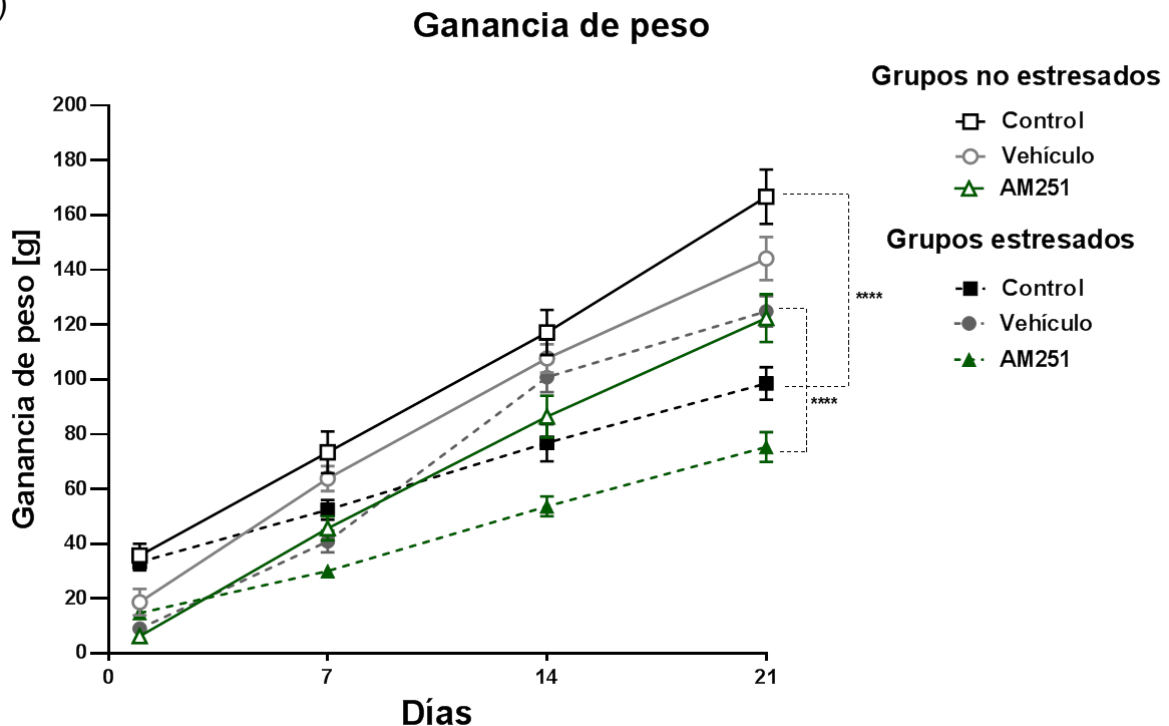
El estrés crónico aumentó el tiempo de permanencia en el perímetro del MWM en los grupos control y vehículo, mientras que el tratamiento con AM251 disminuyó este efecto (Control:  $16.9 \pm 3.0$  s, Estrés:  $32.0 \pm 3.6$  s;  $p < 0.001$ ; Vehículo:  $19.3 \pm 6.2$  s, Vehículo + Estrés:  $42.0 \pm 2.2$  s,  $p < p < 0.001$ , AM251:  $16.4 \pm 4.6$  s, AM251 + Estrés:  $22.2 \pm 4.0$  s,  $p > 0.05$ ) (Figura 2C).

### **Niveles de corticosterona en el plasma.**

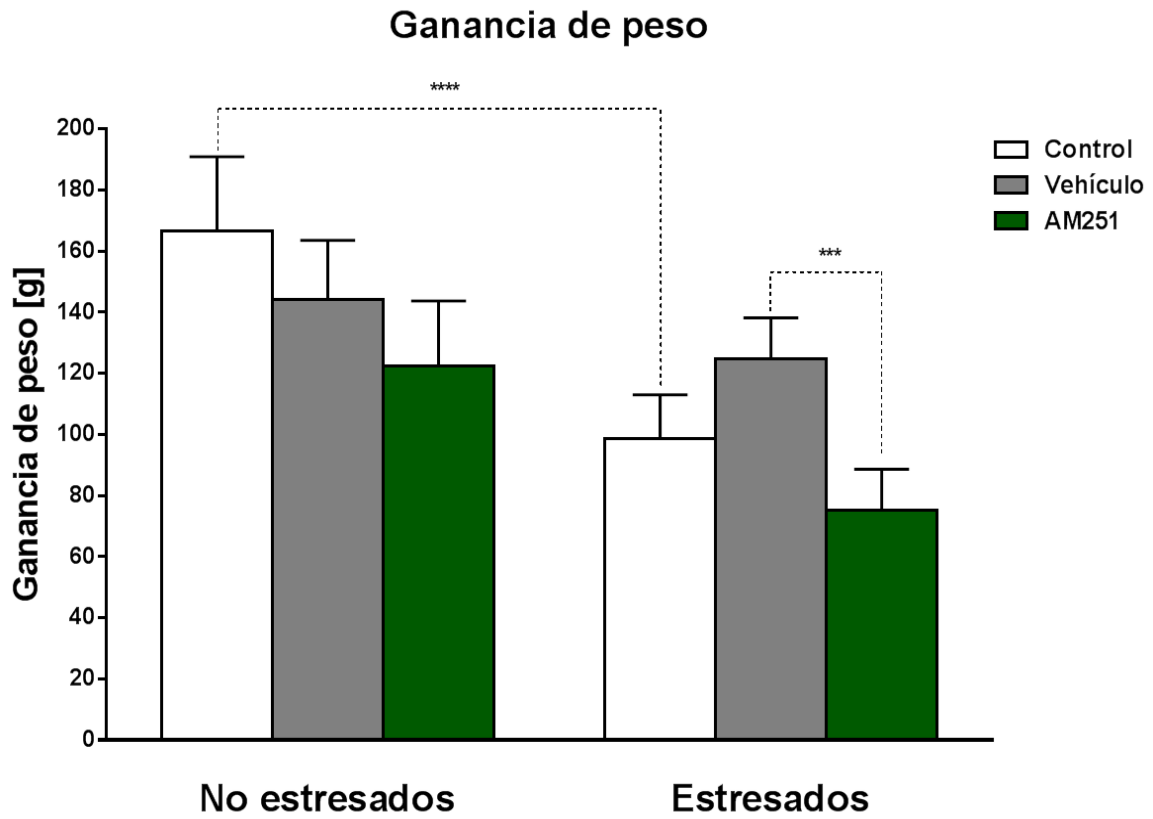
Las ratas sometidas a 60 (s) de un estrés agudo en el MWM mostraron una diferencia significativas respecto a los controles en los niveles plasmáticos de corticosterona (Control:  $285.1 \pm 16.87$  n/dL, Estrés:  $420.0 \pm 30.17$  n/dL,  $p < 0.05$ ; AM251:  $287.1 \pm 13.46$  n/dL, AM251 + Estrés:  $141.0 \pm 30.99$  n/dL,  $p < 0.05$ ) (Figura 2D). Mientras que las ratas del grupo Vehículo no presentaron diferencias significativas (Vehículo:  $250 \pm 12.56$  n/dL, Vehículo + Estrés:  $193.9 \pm 33.86$  n/dL) (Figura 2C).

**Figura 2.** Marcadores del estrés.

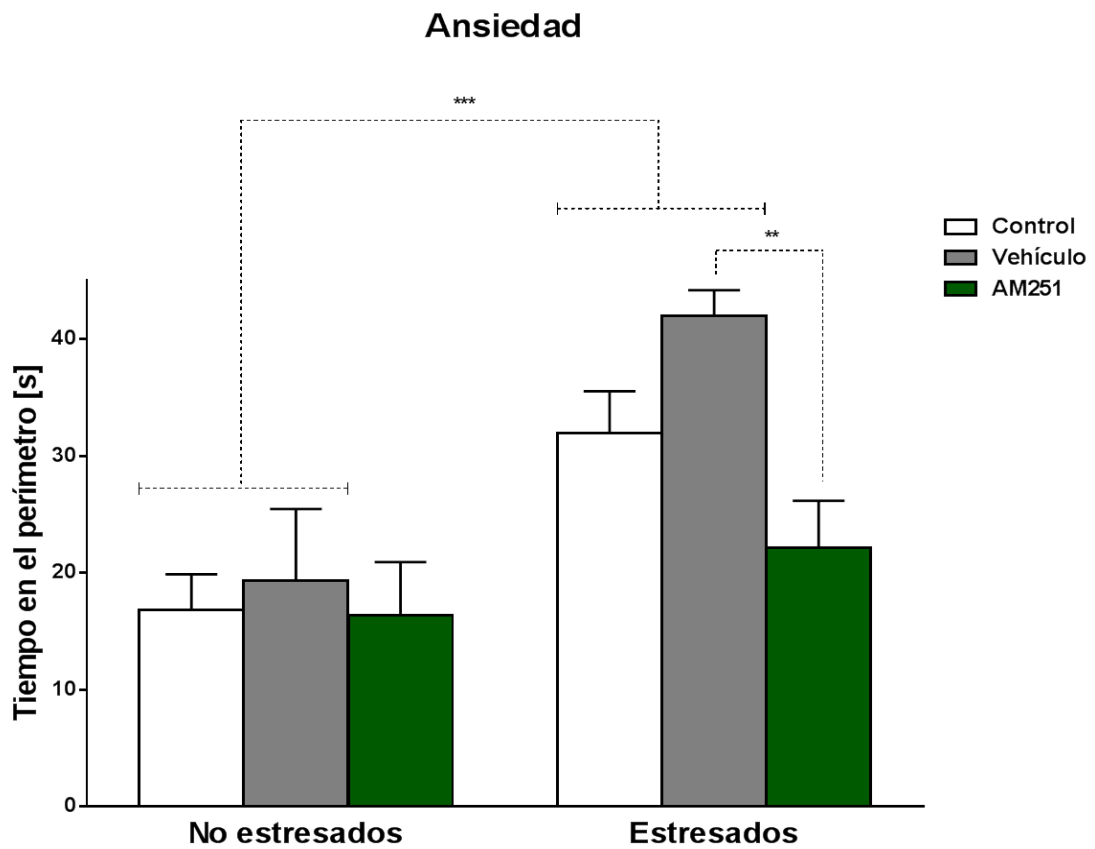
A)



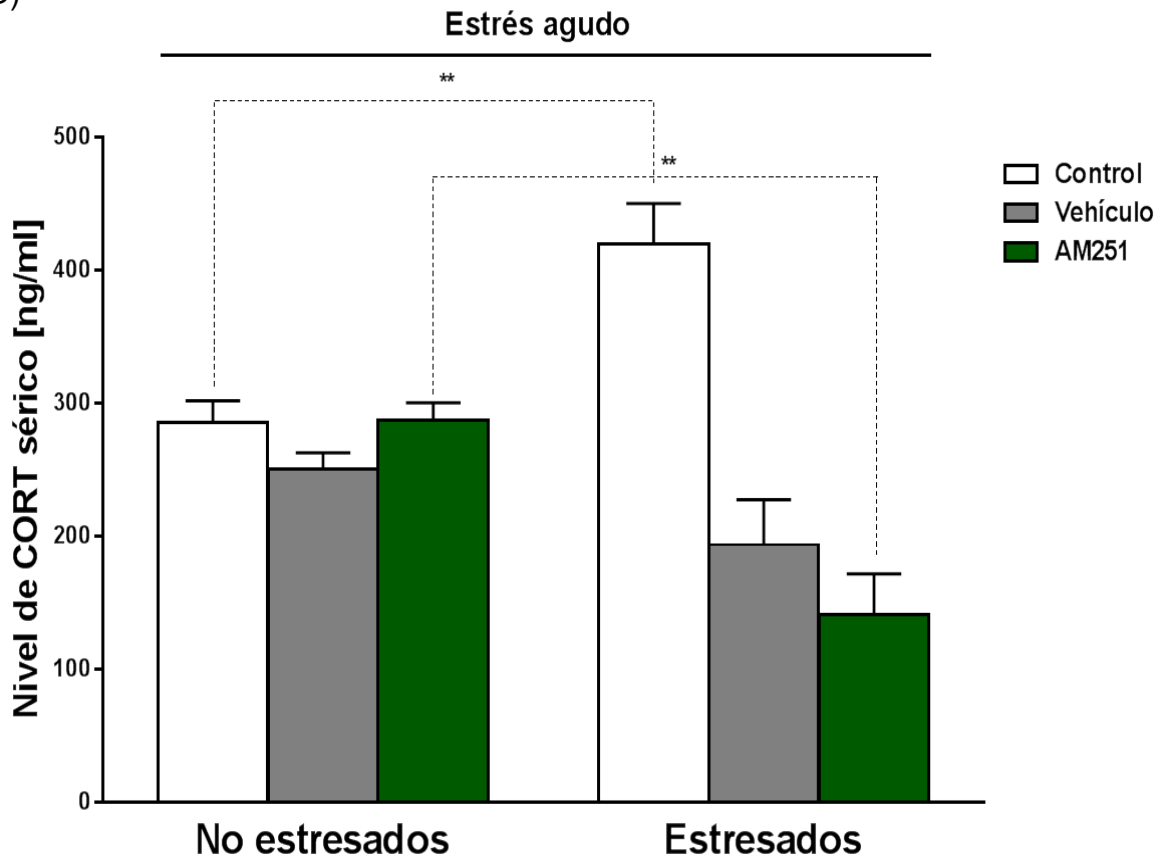
B)



C)



D)



### **Aprendizaje.**

Los animales de los grupos experimentales presentaron diferencias significativas en el tercer día de entrenamiento respecto al tiempo que requirieron para llegar a la plataforma (trial o prueba N° 4: Vehículo:  $16.0 \pm 2.2$  s, Vehículo + Estrés:  $45.0 \pm 7.5$  s,  $p < 0.05$ ; Vehículo + Estrés:  $45.0 \pm 7.5$  s, AM251 + Estrés:  $13.6 \pm 0.7$  s,  $p < 0.05$ ) (Figura 3A, B).

La distancia que recorrieron las ratas hacia la plataforma fue también significativamente diferente entre los grupos experimentales ( $F_{(11,240)} = 19.61$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figura 3C, D). Interesantemente, en el primer día de entrenamiento las ratas que fueron tratadas con AM251 mostraron un aprendizaje significativamente superior al resto de los animales de los grupos experimentales (día 1, ensayo 3: Vehículo:  $15.76 \pm 0.48$  s, Vehículo + Estrés:  $8.43 \pm 2.1$  s,  $p < 0.05$ ; ensayo 2: Vehículo:  $6.87 \pm 1.9$  s, Vehículo + Estrés:  $13.97 \pm 0.8$  s,  $p < 0.05$ ; ensayo 3: AM251:  $2.16 \pm 0.06$  s, AM251 + Estrés:  $17.64 \pm 0.9$  s,  $p < 0.05$ ) (Figura 3C). En el

segundo día de entrenamiento los siguientes grupos mostraron diferencias significativas en el ensayo N° 1 y 2 respectivamente: AM251:  $14.3 \pm 0.5$  s, AM251 + Estrés:  $6.66 \pm 0.63$  s,  $p < 0.05$ ; Vehículo:  $15.23 \pm 2.5$  s, Vehículo + Estrés:  $9.82 \pm 1.7$  s,  $p < 0.05$ ) (Figura 3C). En el tercer día de entrenamiento se obtuvieron las siguientes diferencias significativas en el ensayo N° 4: Vehículo:  $4.09 \pm 0.9$  s, Vehículo + Estrés:  $10.73 \pm 0.7$  s,  $p < 0.05$ ; Vehículo + Estrés:  $10.73 \pm 0.7$  s, AM251 + Estrés:  $4.78 \pm 1.1$  s,  $p < 0.05$ ) (Figura 3C).

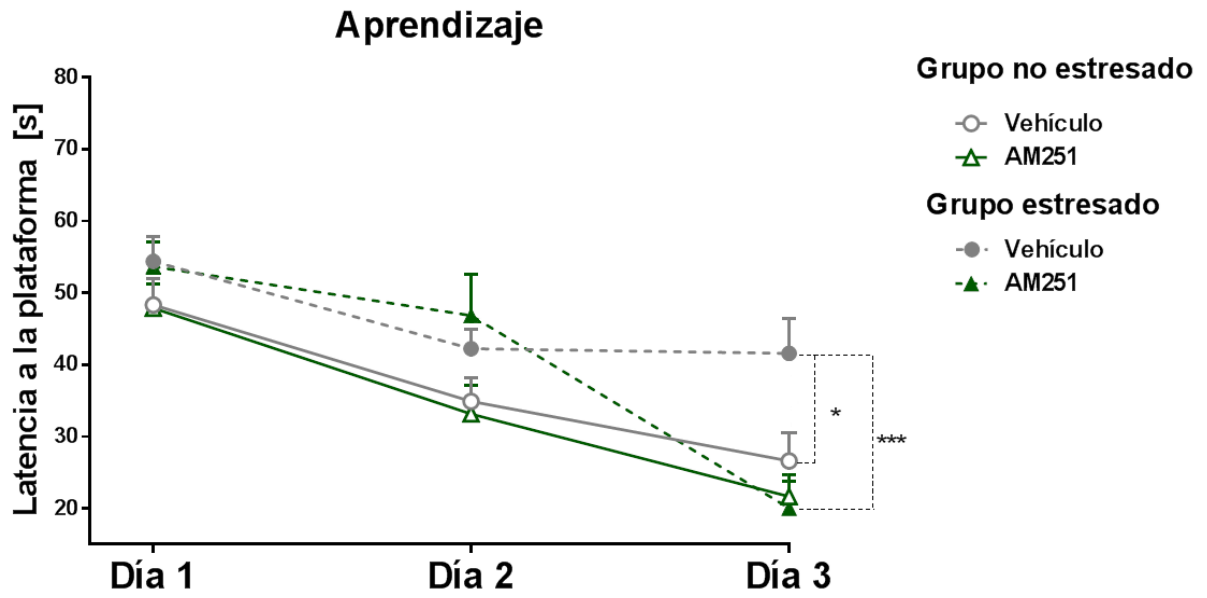
### **Memoria.**

La cuantificación de la consolidación de la memoria se obtuvo al comparar la distancia y tiempo que el animal nadó en el cuadrante objetivo (*target*), que es donde estuvo la plataforma, comparado con la distancia de nado en el cuadrante opuesto. Las ratas con buena memoria nadan más en el cuadrante objetivo respecto al opuesto. Las ratas estresadas que fueron tratadas con AM251 nadaron más tiempo en el cuadrante objetivo comparado con las ratas inyectadas con el vehículo (grupo AM251 + Estrés, cuadrante objetivo:  $17,2 \pm 1.7$  s, cuadrante opuesto:  $7,14 \pm 0.02$  s,  $p < 0.05$ ) (Figura 3B).

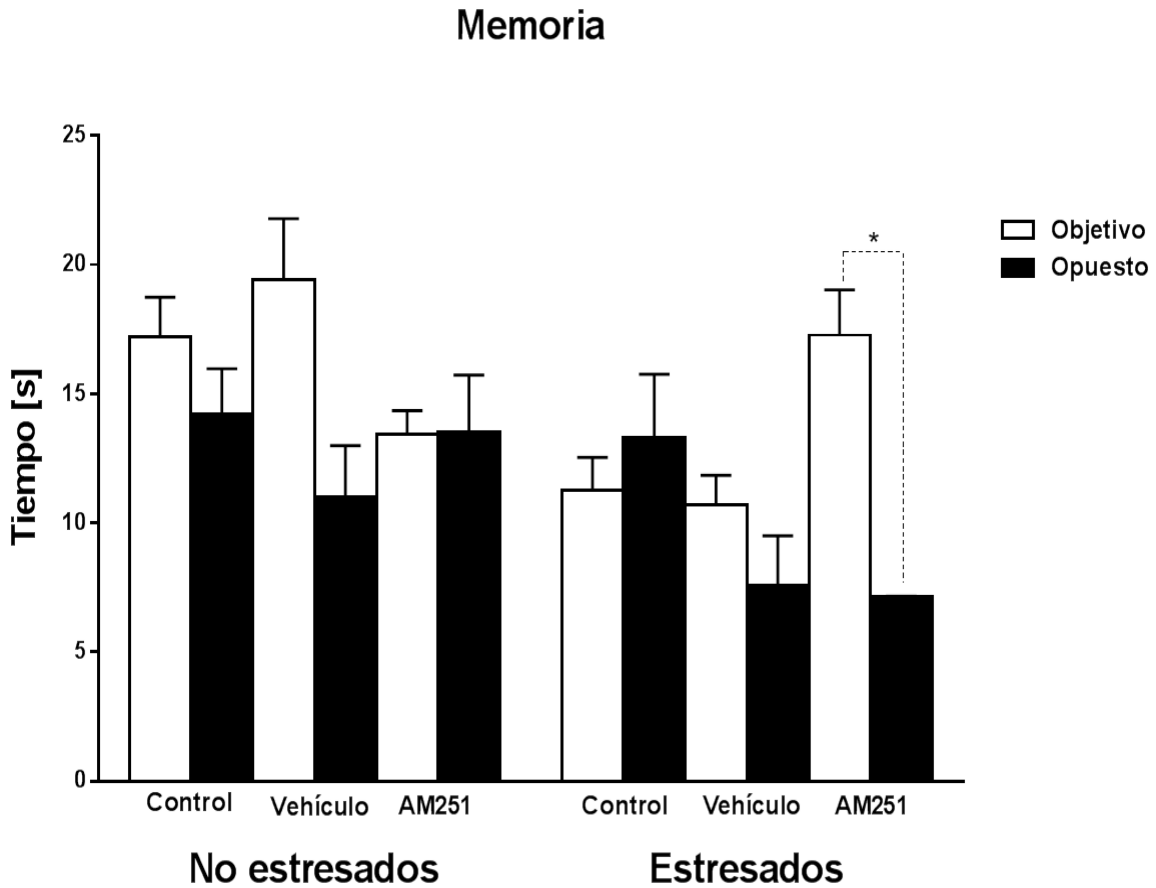
En el grupo de animales no estresados, las ratas que fueron inyectadas con el vehículo o AM251 recorrieron una mayor distancia en el cuadrante objetivo respecto al opuesto (cuadrante objetivo:  $4.96 \pm 0.6$  s, cuadrante opuesto:  $3.03 \pm 0.4$  s,  $p < 0.05$ ). En el grupo de ratas estresadas, las que fueron tratadas con AM251 presentaron una mejor memoria respecto al grupo vehículo (cuadrante objetivo:  $4.43 \pm 0.1$  s, cuadrante opuesto:  $2.59 \pm 0.08$  s,  $p < 0.05$ ).

**Figura 3.** Aprendizaje y Memoria.

A)

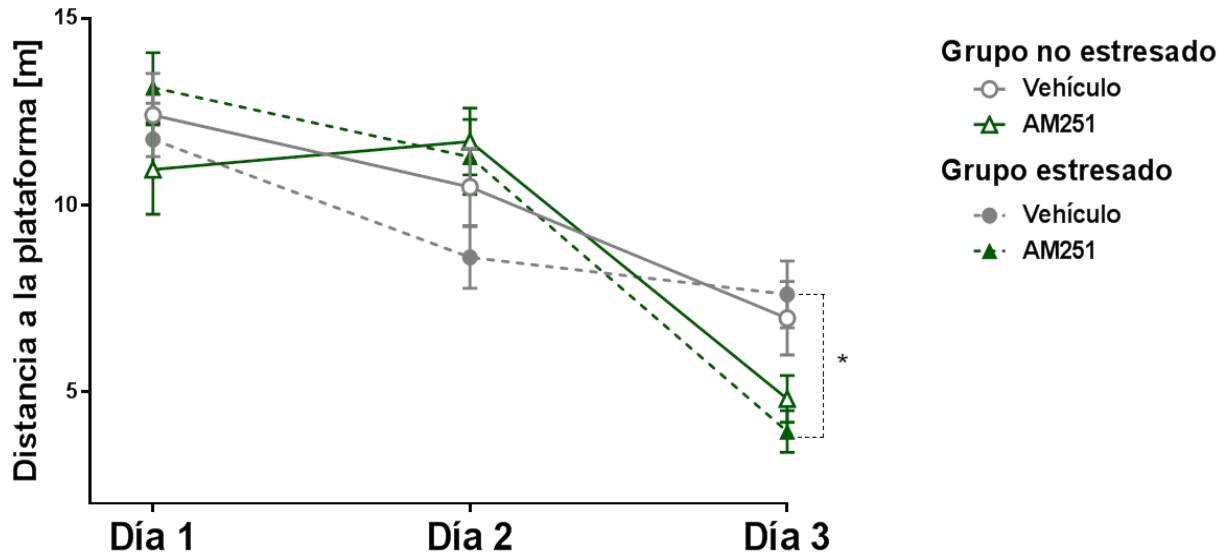


B)



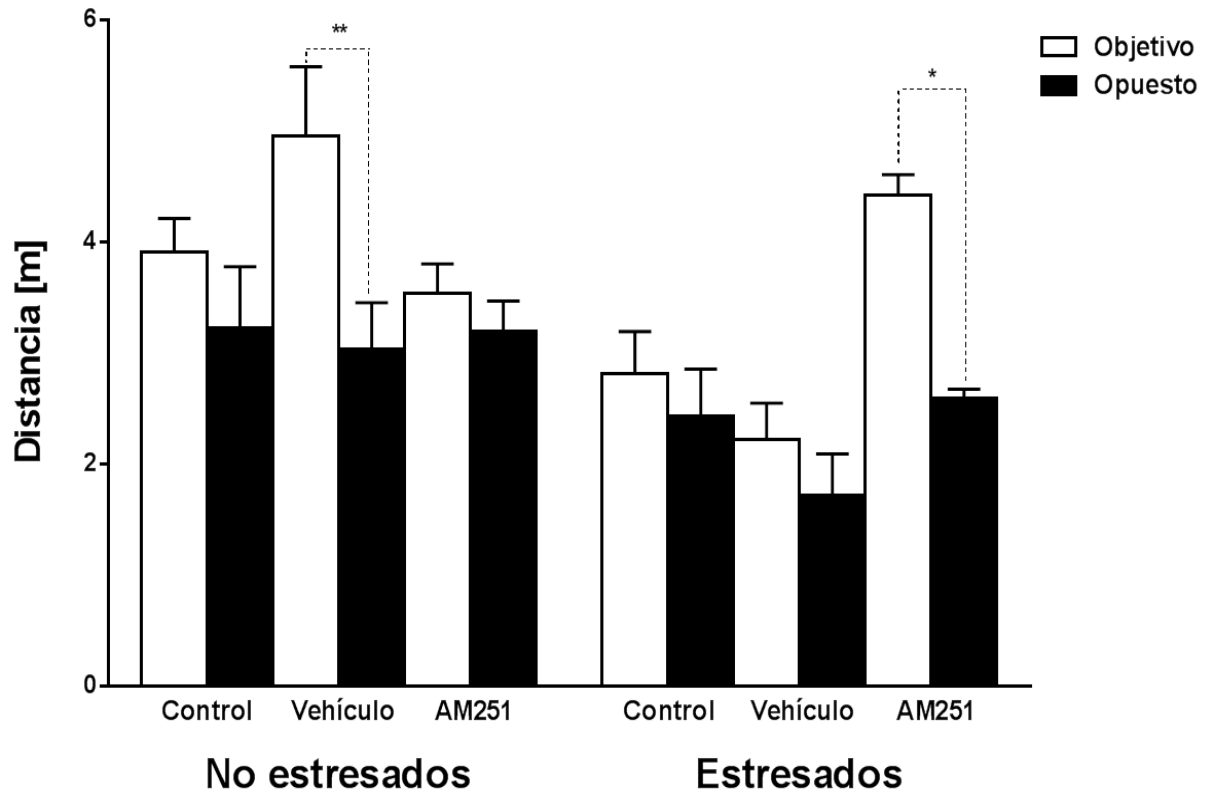
C)

### Aprendizaje



D)

### Memoria

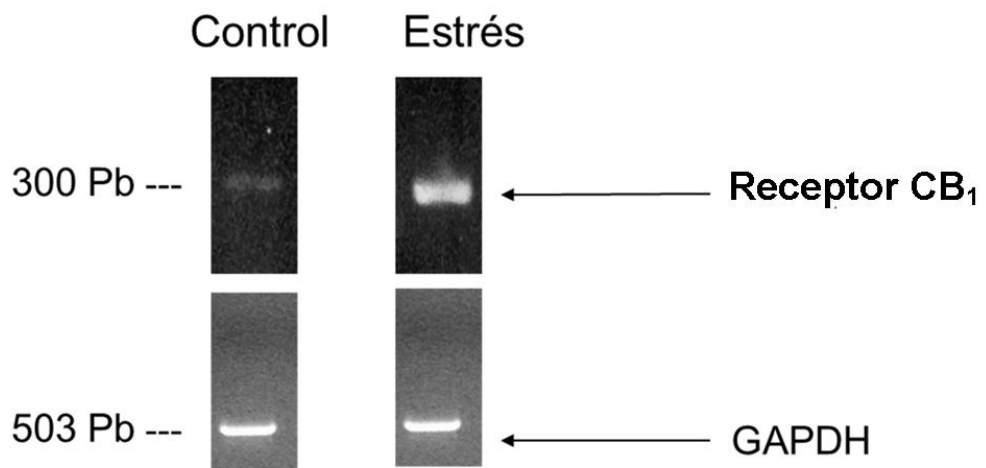


### Expresión de receptor $CB_1$

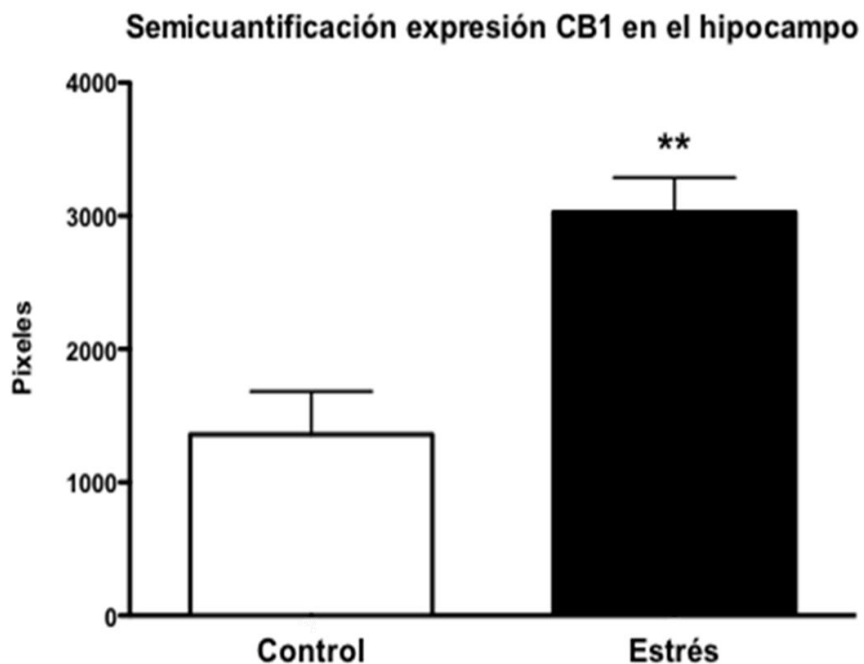
La figura N° 4 muestra la semicuantificación de la expresión de receptor  $CB_1$  en el hipocampo de ratas controles y estresadas. Las ratas estresadas presentan una mayor expresión RNAm de  $CB_1$  en el hipocampo respecto a los animales controles (controles:  $1872 \pm 659$  pixeles; estrés:  $2764 \pm 358$  pixeles,  $p < 0.01$ ) (Figura 4).

**Figura 4.** Expresión de receptor  $CB_1$  en el hipocampo de rata.

A)



B)



## **Discusión**

En esta tesis se demostró que el tratamiento con AM251 tiene un potente efecto antiestrés en las ratas *Sprague Dawley*. Este fármaco tuvo un efecto ansiolítico y regulador del eje HPA, además mejoró el deterioro que indujo el estrés crónico en el aprendizaje y memoria de las ratas.

### ***Actividad locomotora.***

Primero se analizó la actividad locomotora en los animales de todos los grupos experimentales. El estrés crónico, las inyecciones con vehículo y el tratamiento con AM251 no afectaron la actividad locomotora de las ratas (Figura 1A, B). Este resultado indica que todos los cambios de comportamiento medidos en el MWM no ocurren por alteraciones locomotoras de los animales.

En la figura 1C se observa en el grupo no estresado que ratas tratadas con AM251 tienden a estar menos tiempo en el centro del laberinto. Es posible que esa tendencia sea significativa si se aumenta el número de animales sujetos a la prueba de campo abierto. Cuando aumenta su ansiedad, las ratas tienden a estar menos tiempo en el centro del laberinto de campo abierto. Este resultado será correlacionado con los resultados de tigmotaxis mostrados en la figura 2C, donde en un ambiente más estresante como el MWM las ratas pueden mostrar mejor una conducta ansiosa.

## **Marcadores del Estrés**

### ***Ganancia en peso***

El primer paso de esta investigación fue analizar si el protocolo de estrés que se utilizó tuvo un efecto significativo en las ratas. Se analizaron dos marcadores fisiológicos del estrés crónico ampliamente usados, la ganancia de peso y la ansiedad. Las figuras 2A y B muestran que el estrés crónico disminuyó significativamente la ganancia de peso de los animales comparada con los controles.

Una posible explicación para este resultado es que el estrés aumentó la liberación de glutamato en el cerebro (Bagley y Moghaddam, 1997; Reznikov et

al., 2007), lo que genera un aumento de la demanda energética. Así, el catabolismo lipídico podría haber aumentado en las ratas estresadas resultando en la disminución del peso corporal en las ratas estresadas. Otra posible explicación estaría relacionada con los efectos de la corticosterona. El estrés crónico por restricción de movimiento aumenta la liberación de corticosterona (Cook y Wellman, 2004) (Figura 2D), se ha demostrado que esta hormona disminuye la ganancia de peso (Dagnino-Subiabre et al., 2012). La corticosterona aumenta la secreción de insulina (Fleur et al., 2004), lo que incrementa el gasto de energía para la respuesta de lucha y escape. Se ha demostrado que corticosterona, de manera dependiente de insulina, modifica la preferencia de alimento en las ratas hacia una dieta rica en azúcar y grasa (“dieta comfortable”) (Dallman et al., 2005). Así, en ausencia de alimentos placenteros como en los experimentos de esta tesis, los animales disminuirían su ingesta de alimento, lo que combinado con el aumento de la demanda energética producto del estrés se traduciría en una disminución de la ganancia de peso. A pesar de que el consumo de alimentos en nuestros animales no fue medido, no se descarta esta posibilidad.

En el grupo de ratas no estresadas, el tratamiento con AM251 disminuyó significativamente el peso de los animales respecto a los tratados con el vehículo (Figura 2A, B). Rimonabant es un fármaco antagonista de receptor CB<sub>1</sub> que se usó ampliamente hace unos años para disminuir la obesidad en humanos, este fármaco tiene un mecanismo de acción muy similar al AM251 y a través de este pudo haber disminuido la ganancia de peso de las ratas estresadas.

Por otro lado el hipotálamo está compuesto por un variado conjunto de núcleos que controlan un diverso tipo de conductas. Dentro de estos núcleos se encuentra el área hipotalámica lateral (AHL), que ejerce el control del hambre y la sed. El NPV, que es un núcleo integrador dentro de la neurocircuitaría del hipotálamo, el núcleo accumbens (NA), una estructura extrahipotalámica, contiene circuitos que determinan el “querer” y el gusto de los alimentos (Matias I y Di Marzo V, 2006).

Ahora bien desde el área tegmental ventral (ATV), existen eferencias dopaminérgicas, hacia el NA, luego desde el NA existen proyecciones

GABAérgicas hacia el AHL, que es uno de los núcleos que controla el hambre (Matias I y Di Marzo V, 2006). Los receptores CB<sub>1</sub>, están distribuidos en las neuronas presinápticas de diversas áreas del hipotálamo entre ellas el NPV, AHL y el ATV. Se ha demostrado que el consumo apetecible de comida puede ser bloqueado por un antagonista de receptor CB<sub>1</sub> (Matias I y Di Marzo V, 2006).

Por otro lado NPV expresa CRH, la cual es una sustancia anorexigénica o supresora del apetito, el bloqueo de receptor CB<sub>1</sub> disminuye los niveles de éste neuropéptido (Matias I y Di Marzo V, 2006) en el hipotálamo, lo que podría generar la disminución en la ganancia de peso de las ratas.

### ***Ansiedad.***

En los grupos control y vehículo el estrés crónico tuvo un efecto ansiogénico en las ratas, mientras que el tratamiento con AM251 tuvo un efecto ansiolítico en las ratas estresadas (Figura 2C). La conducta ansiosa es regulada principalmente por el complejo amigdaloides y el BNST (Davis et al., 1997, 2010, Kupferschmidt et al., 2012). El estrés crónico induce hipertrofia dendrítica y aumento de la densidad de espinas dendríticas en la amígdala lateral (Vyas et al., 2002; Mitra y Sapolsky, 2008; Mitra et al., 2005). Estas alteraciones morfológicas se correlacionan con un aumento de la excitabilidad en la amígdala basolateral de las ratas estresadas (Rozenckatz et al., 2010). Es posible que el protocolo de estrés crónico usado en esta tesis, indujo estas alteraciones en el complejo amigdaloides y sean el origen del aumento de ansiedad encontrado en las ratas estresadas de los grupos control y vehículo (Figura 2C).

El estrés crónico aumenta la producción de 2-AG en la amígdala y como resultado de esta alteración se inhibe la liberación de GABA (Hill et al., 2008; Patel et al., 2009). Esto podría aumentar la actividad excitatoria en la amígdala lo que induciría el efecto ansiogénico en las ratas estresadas. Por otro lado, el tratamiento con AM251 bloquearía los receptores CB<sub>1</sub> en la amígdala lo que aumentaría la probabilidad de liberación de GABA en las neuronas inhibitorias. Así, el tratamiento con AM251 disminuiría la actividad glutamatérgica en la amígdala y generaría el efecto ansiolítico en las ratas estresadas como se muestra

en la figura 2C.

### ***Niveles de corticosterona***

Las ratas estresadas tuvieron altos niveles de corticosterona en el plasma respecto a los controles después de ser expuestas a un nuevo estresor agudo (Figura 2D). Un resultado no esperado, pero que es muy interesante es el que se observa en el grupo de ratas estresadas que fueron inyectadas con el vehículo. Este grupo de animales presentó niveles de corticosterona menores que las ratas estresadas, esto implica que el estrés generado por las inyecciones diarias, más el estrés inducido por la restricción de movimiento generó resiliencia en esos animales. Otros estudios han demostrado que las ratas son capaces de habituarse a un estresor repetido y así adaptarse con el tiempo a ese estresor si no es capaz de transformarlo. Por ejemplo, el estrés por restricción de movimiento induce un aumento de la corticosterona plasmática durante la primera semana del protocolo de estrés, sin embargo, durante la tercera semana de estrés, el aumento de corticosterona inducido por el estresor es menor que el producido durante la primera semana de estrés (Galea y cols., 1997; Cook y Wellman, 2004). Así, las ratas estresadas disminuyen la actividad de su eje HPA frente al estresor que se aplica repetidamente, como se observa en la figura 2D, y no generan una respuesta de lucha o escape exacerbada. Esta capacidad de generar resiliencia no la presentan solo los roedores, también la tienen los primates y los humanos y cumple una función evolutiva muy importante ya que es la base de la adaptación (Dagnino-Subiabre, 2013).

En la figura 2D también se observa que las ratas estresadas que fueron tratadas con AM251 presentaron niveles de corticosterona significativamente menores que las ratas no estresadas. Este resultado demuestra que el tratamiento con AM251 mejora el principal marcador fisiológico del estrés que es la concentración plasmática de corticosterona. Es posible que AM251 inhiba en parte la actividad de eje HPA cuando el animal es sometido a un nuevo estresor agudo. Esto pudo haber ocurrido porque el AM251 inhibió el efecto generado por el aumento de liberación de 2-AG que presentan las ratas estresadas en la amígdala

basolateral. Así, cuando las ratas estresadas presentarían un aumento de la inhibición en la amígdala, generada por el aumento de 2-AG y la activación de los receptores CB<sub>1</sub>, el tratamiento con AM251 podría inhibir el efecto del 2-AG ya que es un antagonista de receptor CB<sub>1</sub>. Como resultado de la acción de AM251 disminuiría actividad glutamatérgica en la amígdala, silenciándose el eje HPA y disminuyendo los niveles de corticosterona plasmática como se observa en la figura 2D (Wamsteeker JI et al., 2010; Hill MN et al., 2008).

### ***Aprendizaje y Memoria***

Al finalizar la fase de adquisición o aprendizaje en el MWM, las ratas estresadas inyectadas con vehículo tuvieron un aprendizaje significativamente menor que las ratas no estresadas tratadas con vehículo (Figura 3A, C). Este efecto pudo haber sido generado por la atrofia dendrítica que induce el estrés crónico en el hipocampo como ha sido publicado por otros grupos de investigación (Vyas et. al., 2002; McLaughlin et. al., 2007; Conrad, 2010). Por otro lado, el tratamiento con AM251 mejoró significativamente el aprendizaje de las ratas estresadas (Figura 3A, C). Las ratas necesitan aprender a ubicarse espacialmente en el MWM a través de pistas visuales, durante este proceso el hipocampo cumple un rol fundamental. GR está muy expresado en el hipocampo, estructura fundamental del sistema de retroalimentación negativa del eje HPA (McEwen et al., 1968, 1969). Se ha propuesto que el estrés crónico y el tratamiento con corticosterona deterioran estructuralmente el hipocampo a través de la sobreactivación de GR (Conrad D.C, 2010). Es posible que la sobreactivación de GR en el hipocampo genere un aumento de 2-AG. El receptor CB<sub>1</sub> se expresa en las neuronas GABAérgicas del hipocampo (Hill EL et al., 2007; Di S et al 2003; Ziegler CG et al., 2010), entonces en las ratas estresadas la probabilidad de liberación de GABA en el hipocampo esta disminuida producto del aumento de la actividad del sistema eCBs (Heifets BD y Castillo PE, 2009). Los resultados preliminares que se muestran en la figura 4 apoyan esta idea, la cual muestra que las ratas estresadas presentan una mayor expresión del receptor CB<sub>1</sub> en el hipocampo respecto a las ratas controles. El desbalance entre el sistema

excitatorio e inhibitorio en el hipocampo inducido por la sobreactivación del sistema eCBs, también podría ser parte de las alteraciones en la inducción de potenciación a largo plazo y aprendizaje que presentan las ratas estresadas (Keller-Wood ME et al., 1984; Tasker JG et al., 2006; Rademacher DJ et al., 2008).

Respecto a la consolidación de la memoria, las ratas estresadas tratadas con AM251 presentaron un menor tiempo de latencia y una mayor distancia de recorrido en el cuadrante objetivo, comparado con las ratas inyectadas con vehículo (Figura 3B,D). Este resultado puede ser explicado por la misma idea planteada anteriormente, esto implica que el efecto positivo que tiene el tratamiento con AM251 sobre la consolidación de la memoria estaría relacionado con el efecto inhibitorio que tendría el AM251 sobre la hiperactivación del sistema eCBs en el hipocampo de las ratas estresadas. Interesantemente, este efecto solo se produce en las ratas estresadas ya que el tratamiento con AM251 no aumentó el tiempo ni la distancia recorrida en el cuadrante objetivo en las ratas no estresadas (Figura 3B,D). Las inyecciones con vehículo mejoraron la consolidación de la memoria en las ratas no estresadas (Figura 3D), esto pudo haber ocurrido por la inducción de resiliencia producida por el estrés repetido de inyecciones diarias con el vehículo.

## **Conclusiones**

Los datos presentados en esta tesis demuestran que el tratamiento con AM251 tiene un potente efecto antiestrés en las ratas. Disminuyó la ansiedad y la actividad del eje HPA en las ratas estresadas, además mejoró el aprendizaje y la memoria. También se demuestra en esta tesis que la aplicación de dos estresores, el inducido por las inyecciones diarias del vehículo y el generado por la restricción de movimiento, producen resiliencia en las ratas estresadas. Sin duda estos resultados entregan un avance significativo en el conocimiento de la neurobiología del estrés y la posibilidad de desarrollar mejores tratamientos para los pacientes con trastornos ansiosos y depresivos.

## **Financiamiento**

Proyectos Fondecyt N° 1100413 y 1141276 (Prof. Dr. Alexies Dagnino Subiabre).

## **Referencias**

Bagley J, Moghaddam B. 1997. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. *Neuroscience*. 77(1):65-73.

Boris D. Heifets and Pablo E. Castillo. 2009. Endocannabinoid Signaling and Long-Term Synaptic Plasticity. *Annual Review of Physiology*. 71:283-306.

Chad E. Beyer, Jason M. Dwyer, Michael J. Piesla, Brian J. Platt, Ru Shen, Zia Rahman, Karen Chan, Melissa T. Manners, Tarek A. Samad, Jeffrey D. Kennedy, Brendan Bingham, Garth T. Whiteside. 2010. Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiology of Disease*. 39 148–155.

Conrad CD. 2010. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 34(5):742-55

Cook SC, Wellman CL. 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Journal of neurobiology*. 60: 236–248.

Dagnino-Subiabre A, Pérez MÁ, Terreros G, Cheng MY, House P and Salpolsky RM. 2012. Corticosterone treatment impairs auditory fear learning and the dendritic morphology of the rat inferior colliculus. *Hearing Research*. 294(1-2):104-113.

Dagnino-Subiabre A. 2013. Effects of chronic stress on the auditory system and fear learning: an evolutionary approach. *Reviews in the Neurosciences*. 24(2):227-37.

Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE. 2005. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain, behavior, and immunity*. 19(4):275-80.

Davis M, Walker DL, Lee Y. 1997. Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: differential roles in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 352(1362):1675-87.

Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C. 2010. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology reviews* 35:105–135.

Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG. 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 23:4850–4857.

DiPatrizio NV, Piomelli D. 2012. The thrifty lipids: endocannabinoids and the neural control of energy conservation. *Trends in neurosciences*. 35(7):403-11.

Galea LA, McEwen BS, Tanapat P, Deak T, Spencer RL, Dhabhar FS. 1997. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience*. 81(3): 689-97.

Gorzalka BB, Hill MN, Hillard CJ. 2008. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: Implications for stress-related affective disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 32: 1152–1160.

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, et. al. 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in neuroendocrinology*. 24(3):

151-80.

Hill EL, Gallopin T, Férézou I, Cauli B, et. al. 2007. Functional CB1 receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *Journal of neurophysiology*. 97(4):2580-9.

Hill MN, Carrier EJ, McLaughlin RJ, Morrish AC, et. al. 2008. Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *Journal of neurochemistry*. 106:2322–2336.

Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, et. al. 1996. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *British journal of pharmacology*. 118:2023–2028.

Jonathan Kipnis, Sachin Gadani & Noël C. Derecki. 2012. Pro-cognitive properties of T cells. *Nature Reviews Immunology*. 12, 663-669.

Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto Y, Uchigashima M, et. al. 2009. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological reviews*. 89(1):309-80.

Keller-Wood ME, Dallman MF. 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine reviews*. 5(1):1-24.

Kupferschmidt DA, Newan EA, Boonstra R, and Erb S. 2012. Antagonism of cannabinoid 1 receptors reverses the anxiety-like behavior induced by central injections of corticotropin-releasing factor and cocaine withdrawal. *Neuroscience*. 204 (2012) 125–133.

Fleur SE, Akana SF, Manalo SL, Dallman MF. 2004. Interaction between corticosterone and insulin in obesity: regulation of lard intake and fat stores. *Endocrinology*. 145(5):2174-85.

Matias I and Di Marzo V. 2006. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Endocrinology and Metabolism*. 27-37.

McEwen BS, Gould EA, Sakai RR. 1992. The vulnerability of the hippocampus to protective and destructive effects of glucocorticoids in relation to stress. *The British journal of psychiatry*. Supplement. 15: 18-23.

McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS. 1968. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature*. 30;220(5170):911-2.

McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS. 1969. Uptake of corticosterone by rat brain and its concentration by certain limbic structures. *Brain research*. 16(1):227-41.

McLaughlin KJ, Gomez JL, Baran SE, Conrad CD. 2007. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain research*. 3;1161:56-64

Mitra R and Sapolsky RM. 2008. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105(14):5573-8.

Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. 2005. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(26):9371-6.

Morris, R. G., P. Garrud, et al. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 297(5868): 681-683.

Ohl F, Arndt SS, Van der Staay FJ. 2008. Pathological anxiety in animals. *Veterinary journal*. 175(1):18–26.

Patel S, Kingsley PJ, Mackie K, Marnett LJ, Winder DG. 2009. Repeated homotypic stress elevates 2-arachidonoylglycerol levels and enhances short-term endocannabinoid signaling at inhibitory synapses in basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*. 34:2699–2709.

Pérez MÁ, Pérez-Valenzuela C, Rojas-Thomas F, Ahumada J, Fuenzalida M, Dagnino-Subiabre A. 2013. Repeated restraint stress impairs auditory attention and GABAergic synaptic efficacy in the rat auditory cortex. *Neuroscience*. 29; 246:94-107.

Phelps EA, LeDoux JE. 2005. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*. 20;48(2):175-87.

Rademacher DJ, Meier SE, Shi L, Ho WS, Jarrahian A, Hillard CJ. 2008. Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology*. 54(1):108-16.

Reznikov LR, Grillo CA, Piroli GG, Pasumarthi RK, Reagan LP, Fadel J. A. 2007. Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. *The European journal of neuroscience*. 25(10):3109-14.

Rosenkranz JA, Venheim ER, Padival M. 2010. Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. *Biological psychiatry*. 67(12):1128-36.

Selye, H. 1936. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*. 138: 32.

Selye, H. 1956. *The Stress of Life*. Mc Graw-Hill, New York.

Smith SM, Vale WW. 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in

neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 8(4): 383-95.

Tafet GE, Bernardini R. 2003. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 27(6): 893-903.

Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. 2006. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*. 147(12):5549-56.

Vyas A, Bernal S, Chattarji S. 2003. Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Research*. 965:290–294.

Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *The Journal of Neuroscience*. 22:6810–6818.

Vyas A, Pillai AG, Chattarji S. 2004. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*. 128:667–673.

Wamsteeker JI, Kuzmiski JB, Bains JS. 2010. Repeated stress impairs endocannabinoid signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:1118–11196.

Ziegler CG, Mohn C, Lamounier-Zepter V, Rettori V, Bornstein SR, et. al. 2010b. Expression and function of endocannabinoid receptors in the human adrenal cortex. *Hormone and metabolic research*. 42:88–92.