



FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MENCIÓN NEUROCIENCIA

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE AM251 SOBRE LA TOMA DE DECISIONES
Y ATENCIÓN DE RATAS ADOLESCENTES ESTRESADAS CRÓNICAMENTE**

PAOLA ALEJANDRA CASTRO VEGA

Tesis para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Director de Tesis:

Prof. Dr. Alexies Dagnino Subiabre

Universidad de Valparaíso

2017

FINANCIAMIENTOS

Esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de:

- FONDECYT Regular 1141276
- Anillo de Ciencia y Tecnología N° ACT1403
- Beca CONICYT de Magíster para Profesionales de la Educación 2015
- Programa de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
I. INTRODUCCIÓN	9
1. La Corteza Prelímbica	9
2. Atención Auditiva y Toma de Decisiones	10
3. Corteza Prelímbica y su relación con el Estrés	10
4. Relación de la Corteza Prelímbica con el Sistema de Endocannabinoides	12
5. La CPF en la Adolescencia y el Estrés	14
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
1. Hipótesis	15
2. Objetivo general	15
3. Objetivos específicos	15
III. METODOLOGÍA	16
1. Bienestar animal	16
2. Animales de experimentación	16
3. Diseño experimental	16
4. Tarea de Elección de Dos Alternativas: TEDA	17
5. Fármacos a administrar	19
6. Protocolo de estrés	19
7. Marcadores fisiológicos del estrés	19
7.1 Medición de la ganancia de peso	19
7.2 Peso glándulas suprarrenales	20
8. Actividad locomotora y conductas tipo ansiosas	20
8.1 Prueba de campo abierto	20
8.2 Laberinto Elevado en Cruz	21
9. Análisis estadístico	21
IV. RESULTADOS	22
1. Efecto de AM251 sobre los marcadores fisiológicos del Estrés	22
1.1 Ganancia de Peso	22

1.2	Peso glándulas suprarrenales	24
2.	Efecto de AM251 en Pruebas Conductuales	25
2.1	Actividad locomotora en Campo Abierto.....	25
2.2	Conductas tipo ansiosas en Laberinto Elevado en Cruz.....	26
3.	Efecto de AM251 sobre Funciones Cognitivas	29
3.1	Toma de decisiones	29
3.2	Atención auditiva.....	30
V.	DISCUSIÓN	32
1.	Efecto de AM251 sobre los marcadores fisiológicos del Estrés.....	32
2.	Efecto de AM251 sobre la actividad locomotora	35
3.	Efecto de AM251 sobre las conductas tipo ansiosas	35
4.	Efecto de AM251 sobre las funciones cognitivas	36
VI.	CONCLUSIONES.....	41
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
VIII.	ANEXOS	55

ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonilglicerol
AEA	Anandamida
ACTH	Hormona Adrenocorticotropa
AVP	Arginina-Vasopresina
BNST	Amígdala extendida
CA	Cingulada anterior
CALB	Calbindina
CCK	Colecistoquinina
COF	Corteza orbitofrontal
CORT	Corticosterona
CPF	Corteza prefrontal
CPFm	Croteza prefrontal medial
CRF	Factor liberador de corticotropina
DPN	Día postnatal
DP-RC	Diferencia promedio respuestas correctas
DP-TEE	Diferencia promedio tiempo entre ensayos
eCB	Endocanabinoide
HPA	Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal
IL	Infralímbica
IPSC	Corrientes Postsinápticas Inhibitorias
NPV	Núcleo paraventricular
PL	Prelímbica
SAM	Sistema Simpato-Adrenomedular
SeCB	Sistema endocanabinoide
TDAH	Trastorno déficit atencional/hiperactividad
TEDA	Tarea de Elección de Dos Alternativas
TEE	Tiempo entre ensayos

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Corteza prelímbica, sistema endocanabinoide y su relación con el estrés.....	55
Figura 2: Distribución temporal del diseño experimental.....	16
Figura 3: Caja de entrenamiento del paradigma conductual TEDA	57
Figura 4: Paradigma conductual TEDA.....	58
Figura 5: Efecto de los tratamientos en la ganancia de peso de ratas adolescentes	23
Figura 6: Efecto de los tratamientos en el peso de glándulas suprarrenales de ratas adolescentes.....	24
Figura 7: Efecto de los tratamientos sobre la actividad locomotora en prueba de cambio abierto	25
Figura 8: Efecto de los tratamientos sobre conductas tipo ansiosas en laberinto elevado en cruz	27
Figura 9: Efecto de los tratamientos sobre la toma de decisiones.....	29
Figura 10: Efecto de los tratamientos sobre la atención.....	31
Tabla 1: Grupos experimentales.....	55

RESUMEN

La toma de decisiones y atención auditiva son funciones cognitivas complejas que permiten a los individuos responder de manera eficaz a las demandas ambientales. Estas funciones son reguladas por la corteza prelímbica (PL), quien modula además las respuestas al estrés. En este sentido, la PL activa al sistema límbico para generar las respuestas al estrés, y por otro lado, el sistema endocannabinoides (SeCB) de la PL aumenta la actividad de las neuronas de proyección, suprimiendo la actividad del eje HPA y terminando la repuesta al estrés. En condiciones de estrés crónico, se produce atrofia dendrítica en las neuronas piramidales de la PL y además aumenta la liberación de eCBs, deteriorando la toma de decisiones y atención auditiva en ratas. En ese contexto, el objetivo de esta tesis fue estudiar el rol de CB₁ en las funciones cognitivas antes mencionadas, en ratas estresadas crónicamente durante la adolescencia.

Se trabajó con ratas *Sprague-Dawley*, las cuales se dividieron en los grupos experimentales control y estrés. Estas recibieron un tratamiento de inyección intraperitoneal con AM251 o vehículo, durante una semana. Después de media hora de la administración del fármaco, los animales fueron estresados durante 3 horas diarias mediante un protocolo de estrés por restricción de movimiento.

La toma de decisiones y la atención, fueron cuantificadas en el paradigma conductual “Tarea de Elección de Dos Alternativas” (TEDA), en donde animales estresados, tuvieron menor rendimiento que animales control. Este deterioro en las funciones, fue revertido con la administración de AM251, a diferencia de los animales tratados con vehículo.

El desarrollo de esta tesis pretende contribuir a una mejor comprensión del funcionamiento del SeCB en la adolescencia, en relación con el estrés y aportar conocimientos relevantes para trastornos vinculados con esta área en humanos, como lo es el déficit atencional.

SUMMARY

Decision-making and auditory attention are complex cognitive functions that allow to the mammals to respond appropriately to environmental demands. Those functions are regulated by prefrontal cortex (PL), which in addition modulate the responses to stress. In this way, the PL activates to the limbic system to activate the responses to stress, and on the other hand, the endocannabinoid systems (SeCB) increase the projections neurons PL activity ending the stress responses. In chronically stressed rats, dendritic atrophy occurs in PL pyramidal neurons and the SeCB activity increases, which in turn impairs decision-making and auditory attention. The aim of this thesis was determine the role of a type 1 endocannabinoid receptor (CB₁) on these complex cognitive functions, in chronically stressed rats, during adolescence.

, y por otro lado, el sistema endocannabinoides (SeCB) de la PL aumenta la actividad de las neuronas de proyección, suprimiendo la actividad del eje HPA y terminando la repuesta al estrés

Male *Sprague-Dawley* rats were divided into the two experimental groups control and stress. They were treated with AM251 or vehicle by intraperitoneal injections, for one week. After half an hour of the administration of the drug or vehicle, the animals were restraint stressed for three hours daily.

Decision-making and auditory attention were quantified in the behavioral paradigm “Two Alternative Choice Task (2-ACT), where the stressed animals had lower performance than controls animals. Stress-induced cognitive functions impairments were counteracted by AM251 treatment compared with vehicle-treated animals.

This contributes to understand the relationship between SeCB and the stress during adolescence and provide relevant knowledge to understand the neurobiology of stress-related disorders such as attention deficit.

I. INTRODUCCIÓN

1. La Corteza Prelímbica

Los seres vivos deben ser capaces de responder adecuadamente a los continuos cambios ambientales. Para ello, cuentan con la capacidad de adaptación, que les permite reaccionar frente a estímulos y desarrollar comportamientos complejos a través de la denominada función ejecutiva. Esta capacidad incluye un grupo de habilidades cognitivas superiores como la toma de decisiones y la atención (Baddeley, 1998; Stuss & Alexander, 2000) y residen principalmente en la corteza prefrontal (CPF) como ha sido demostrado a través de estudios de lesiones en humanos y otros animales (Bechara & Van Der Linden, 2005).

Se ha demostrado que pacientes con lesiones de la CPF ventromedial presentan un significativo daño en la habilidad de tomar decisiones cotidianas exitosas (Bechara et al., 2000; Damasio, 1994); así también esta área es fundamental en tareas de atención, en donde pacientes con lesión en la CPF revelaron bajo estado de alerta, descuido y distracción (Fuster, 1997). Esto se puede evidenciar en el Trastorno de Déficit Atencional / Hiperactividad (TDAH), caracterizado por el DSM-V (Diagnostic & Statistical Manual of Mental Disorders, 2013) como un patrón persistente de inatención y/o hiperactividad/impulsividad que interfiere con el funcionamiento normal del individuo. En ese sentido, numerosos estudios de imagen han reportado una significativa reducción de volumen de la CPF, en pacientes con TDAH (Castellanos et al., 1996; Cassey et al., 1997; Filipek et al., 1997; Pueyo et al., 2000; Mostofsky et al., 2002).

La CPF, en base a datos estructurales y funcionales en roedores, se puede dividir en dos subregiones, la corteza orbitofrontal (COF) y la corteza prefrontal medial (CPFm) (Groenewegen & Uylings, 2000). Esta última incluye la corteza cingulada anterior (CA), la prelímbica (PL) e infralímbica (IL) (Vertes, 2004). Específicamente, lesiones en la región PL en roedores producen déficit pronunciado en el tiempo de respuesta a tareas de toma de decisiones (Seamans et al., 1995; Delatour & Gisquet-Verrier, 1996, 2000). Lo mismo ocurre con la atención auditiva, como fue demostrado en estudios de lesiones en la región PL de ratas que ven deteriorado su rendimiento en tareas que requieren cambios atencionales (Birrel & Brown, 2000).

2. Toma de Decisiones y Atención Auditiva

La toma de decisiones es una función cognitiva compleja, para la que se requiere evaluar múltiples opciones de respuesta, para luego seleccionar la que se considere óptima. Cada opción de respuesta se puede caracterizar en términos de recompensa o castigo con los que esté asociada (Evenden, 1999). La atención, por su parte, permite a los individuos, seleccionar de una sobreabundancia de estímulos, respuestas y recuerdos, ignorando otros que resulten irrelevantes (Raz, 2004).

Para llevar a cabo estas y otras funciones, la PL establece conexiones con el área IL y CA, además del núcleo accumbens, núcleo medio dorsal del tálamo, amígdala basolateral y central y área tegmental ventral (Vertes, 2004). Entre la PL y estructuras asociadas, existe coherencia entre oscilaciones cerebrales de alta frecuencia en el rango beta (20-30 Hz) y gamma baja (30-80 Hz), las cuales subyacen a las funciones cognitivas superiores asociadas (Donnelly, 2014).

3. Corteza Prelímbica y su relación con el Estrés

El estrés es una reacción biológica común a todos los organismos vivos que les permite adaptarse a las presiones ambientales o estresores y de esa forma, restablecer la homeostasis (Selye, 1936; Goldstein & McEwen, 2002). La respuesta al estrés es mediada fuertemente por el sistema autónomo simpato-adreno-medular (SAM) y por la activación del eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), cuando el organismo se enfrenta a estresores fisiológicos y/o psicológicos (Herman et al., 2003; Sapolsky et al., 2000).

El sistema nervioso autónomo provee la más inmediata respuesta frente a estresores, a través de la activación del sistema nervioso simpático que produce la respuesta de “lucha o escape”, que incluye activación de células cromafines en la médula adrenal. Estas células liberan catecolaminas y neuropéptidos a la circulación sistémica, que junto con los glucocorticoides del sistema neuroendocrino, desarrollarán acciones complementarias en el organismo, incluyendo movilización de energía y mantención de la presión sanguínea (Ulrich-Lay et al., 2006; Ulrich-Lay & Herman, 2009).

La respuesta neuroendocrina es iniciada por un grupo de células en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo que secreta el factor liberador de corticotropina (CRF) y arginina vasopresina (AVP), los cuales estimulan la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) desde la hipófisis

anterior. A continuación, la ACTH lleva a la liberación de glucocorticoides (corticosterona: CORT, en roedores y cortisol en humanos) en la glándula adrenal, los cuales cuentan con receptores en el cerebro y tejidos periféricos (Herman et al., 1996, 2003; Smith & Vale, 2006; Klein & Romeo, 2013) para llevar a cabo su acción. A corto plazo, la liberación de glucocorticoides permite al organismo hacer frente a las demandas energéticas impuestas por eventos estresantes y en parte, contribuye con la habilidad del organismo de restablecer la homeostasis (McEwen, 2007).

El funcionamiento del eje HPA es controlado por mecanismos de retroalimentación negativa, actuando principalmente a través de receptores de glucocorticoides situados en la hipófisis anterior, NPV y otras regiones extra-hipotalámicas, que actúan reduciendo la síntesis de CRF, AVP y ACTH, disminuyendo así la secreción de glucocorticoides (Herman et al., 2003).

El estrés puede ser positivo (eustrés) cuando el estresor es leve, breve y controlable, pero si los estresores persisten pueden llevar a diestrés o estrés crónico (Tafet & Bernardini, 2003). En este último caso, ocurre un incremento significativo de la actividad del eje HPA y de los niveles de CORT plasmáticos comparados con animales control, llevando a una respuesta maladaptativa y afectando el funcionamiento cerebral (Tafet & Bernardini, 2003; Ferraz et al., 2011). Así, la regulación del eje HPA resulta fundamental para mantener el óptimo funcionamiento del organismo (Gorzalka et al., 2008).

La CPFm cuenta con un perfil de conectividad que le permite regular la respuesta al estrés (Holmes & Wellman, 2009). En ese sentido, Radley y su equipo (2009) determinaron que la regulación de la actividad del NPV, proviene específicamente de la corteza PL. Esta ejerce una influencia predominantemente inhibitoria sobre el eje HPA, a través de una región discreta de la amígdala extendida (BNST), que luego se conecta con el NPV; es decir la corteza PL modula indirectamente la activación del eje HPA, inhibiéndolo (Ver Anexo, Figura 1, Panel superior).

Sin embargo, en condiciones de estrés crónico, las funciones intrínsecas de la corteza PL, así como su rol inhibitorio sobre el eje HPA, sufren alteraciones. Estudios en ratas *Sprague-Dawley*, demostraron que el estrés por restricción de 21 días, produce cambios pronunciados en la morfología dendrítica de las neuronas piramidales de la capa II y III de la CPFm, tanto en número como en longitud de ramas dendríticas apicales (Cook & Wellman, 2004). Este efecto fue demostrado de forma específica en la corteza PL de ratas (Izquierdo et al., 2006; Radley et al., 2004), comprobando más tarde que la pérdida de espinas dendríticas ocurre específicamente en las neuronas de la corteza PL que proyectan al eje HPA a través del relevo inhibitorio en el BNST (Radley et al., 2013). Como las

dendritas son el principal sitio de conectividad sináptica, cambios en su morfología inducidos por estrés, podrían resultar en importantes alteraciones funcionales de la CPFm (Cook & Wellman, 2004).

En este sentido, Pérez et al., (2013), demostraron que el estrés por restricción durante 21 días, daña la toma de decisiones en ratas en el paradigma conductual Tarea de Elección de Dos Alternativas (TEDA), lo que se refleja en que los animales gastan más tiempo en cada ensayo para lograr una respuesta correcta y el intervalo entre ensayos es significativamente mayor en ratas estresadas con respecto a las controles. Además, los animales estresados disminuyeron en un 18,8% sus respuestas correctas, en comparación con las controles, demostrando que el estrés también deteriora la atención auditiva.

4. Relación de la Corteza Prelímbica con el Sistema de Endocannabinoides.

El sistema endocannabinoides (SeCB) es un sistema de señalización retrógrada, lo que implica que la activación de sus receptores, expresados presinápticamente, influyen en la liberación del neurotransmisor en la neurona presináptica (Herkenham et al., 1991; Dow-Edwards & Lindsay, 2016). El SeCB está conformado por moléculas de naturaleza lipídica, siendo el 2-araquidonilglicerol (2-AG) y la N-araquidoniletanolamida (anandamida o AEA), los dos principales ligandos endógenos. La síntesis de 2-AG y AEA, ocurre por activación de la neurona postsináptica, luego de lo cual son liberados por acción enzimática, sin ser almacenados en vesículas; una vez que llevan a cabo su acción en los receptores presinápticos, los ligandos son metabolizados por las enzimas monoacilglicerol lipasa y amida hidrolasa de ácidos grasos, respectivamente (Piomelli, 2003; Rodríguez de Fonseca et al., 2005).

A pesar de que el 2-AG y la AEA son sintetizados y liberados por activación enzimática, evidencia reciente sugiere que la AEA es sintetizada de forma constitutiva y liberada tónicamente (Di, Popescu & Tasker, 2013; Kim & Alger, 2010) mientras que la síntesis de 2-AG es estimulada de forma fásica por actividad eléctrica o mecanismos dependientes de receptores esteroidales (Di et al., 2013; Hashimoto et al., 2013; Kim & Alger, 2010), asociados generalmente a un incremento de calcio intracelular (Howlett et al., 2002) (Ver Anexos, Figura 1, Panel inferior).

Con respecto a la regulación del eje HPA, el SeCB se encuentra ampliamente distribuido a través de la circuitería corticolímbica e hipotalámica (Hill & McEwen, 2010; Gorzalka et al., 2008),

expresándose tanto en sinapsis excitatorias como inhibitorias, y en general, su efecto predominante contribuye a la disminución de la actividad del eje HPA (Hill et al., 2010).

Así, se ha descrito la existencia de un tono de anandamida en la BLA, que en condiciones basales disminuye la excitación de las neuronas principales de la BLA, manteniendo inhibida la actividad del eje HPA. Sin embargo, luego de la exposición a estrés, el contenido de anandamida en la BLA disminuye rápidamente, desinhibiendo a la BLA y resultando en la activación de las células neurosecretoras de CRF en el NPV del hipotálamo, lo cual activa el eje HPA (Hill & Tasker, 2012).

En consecuencia, la concentración de CORT se eleva rápidamente y penetra en el cerebro, uniéndose a receptores de membrana en el NPV, y posiblemente en la amígdala, induciendo la síntesis de eCB. Dentro del NPV, el incremento en la señalización de eCB, reprime la transmisión sináptica excitatoria sobre las neuronas CRF y actúa para mediar la inhibición rápida del eje HPA. Dentro de la amígdala, este incremento en la señalización de eCB contribuye a la disminución de la transmisión excitatoria sobre las neuronas principales de la BLA, disminuyendo la influencia que este núcleo posee sobre el eje HPA (Hill & Tasker, 2012).

En la CPFm también ha sido demostrado un claro rol de la señalización del SeCB en los mecanismos de retroalimentación negativa que inhiben el eje HPA (Hill et al., 2011). Estudios realizados en roedores, han mostrado que CB₁ se expresa tanto en sinapsis excitatorias como inhibitorias de la PL (Auclair et al., 2000; Fortin & Levine, 2007; Lafourcade et al., 2007; Chiu et al., 2010). En neuronas GABAérgicas se ha descrito sustancial co-expresión de receptores CB₁ y calbindina (CALB), así también co-expresión de CB₁ con interneuronas positivas para colecistoquinina (CCK⁺) en la CPFm (Bodor et al., 2005; De Felipe, 1997; Eggan et al., 2008). Las interneuronas positivas para CALB se relacionan principalmente con inhibición dendrítica, mientras que las positivas para CCK, con inhibición perisomática de neuronas piramidales (Bodor et al., 2005; Galarreta et al., 2004; Hill et al., 2007).

Así, se ha descrito que el estrés por restricción de movimiento durante 30 minutos en ratas, incrementa el contenido de 2-AG de manera dependiente de glucocorticoides en la PL (Hill et al., 2011). Además, se ha demostrado que el bloqueo farmacológico de CB₁ dentro de la corteza PL, prolonga significativamente la secreción de CORT en ratas adultas, sugiriendo que la activación de CB₁, mediada por 2-AG dentro de la PL, contribuye a la retroalimentación negativa del eje HPA, luego de un episodio de estrés (Hill et al., 2011). La habilidad del SeCB en la CPFm para contribuir a la

terminación de la respuesta al estrés, al parecer se debe a la modulación de la excitabilidad local de receptores de CB₁ de terminales GABAérgicos situados alrededor de neuronas piramidales. La activación de dichos receptores, disminuye la transmisión inhibitoria sobre las neuronas piramidales, incrementando sus eferencias excitatorias sobre el BNST, lo cual contribuye a la terminación de la respuesta al estrés a través de la inhibición del NPV del hipotálamo (Hill et al., 2011).

En condiciones normales, el eje HPA se encuentra regulado por el sistema de eCB de la corteza PL, sin embargo cuando el estrés es crónico, se producen diversas alteraciones. Por ejemplo, diez días de estrés por restricción incrementan la densidad de sitios de unión de CB₁ en la CPF (Lee & Hill, 2013). También se ha demostrado que 10 días de restricción de movimiento, por 30 minutos diarios, produce un incremento sostenido de los niveles de 2-AG en la PL (Rademacher et al., 2008).

5. La CPF en la Adolescencia y el Estrés

La adolescencia comprende un periodo de transición entre la niñez y la adultez, caracterizada en todos los mamíferos por una serie de cambios conductuales, hormonales y neurales (Spear, 2000, 2007; Zhang & Rosenkranz 2012; Negrón et al., 2013). En roedores, el periodo de adolescencia transcurre desde el día postnatal (DPN) 28 al DPN 55 en donde el individuo ha alcanzado ya la maduración reproductiva (Spear, 2000; Ojeda et al., 2006; Lewis et al., 2002).

Recientes investigaciones reconocen a la adolescencia, como un periodo de elevada plasticidad neural (Lee & Gorzalka, 2012), caracterizado por el desarrollo de procesos como poda sináptica, mielinización de fibras nerviosas, eliminación de conexiones innecesarias y reorganización de sistemas de neurotransmisores (Guerry & Hastings, 2011). Todo aquello, convierte a la adolescencia en un periodo crítico de vulnerabilidad frente a presiones ambientales (Lee & Gorzalka, 2012).

Por otra parte, la extensiva maduración del cerebro adolescente y específicamente de la CPF, están íntimamente asociados con la maduración del SeCB. El desarrollo cortical, involucra la poda sináptica la cual considera el normal funcionamiento del SeCB normal así como lo hace la maduración de las redes corticales de oscilaciones (Romeo & McEwen, 2006; Uhlhass et al., 2009).

Así, la adolescencia conlleva cambios sustanciales que incluyen la reactividad frente al estrés y la maduración del SeCB. En consecuencia, la exposición a estrés durante esta etapa, puede tener profundas consecuencias que finalmente determinen si el estresor lleva a una respuesta adaptativa o maladaptativa (Romeo et al., 2006).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las evidencias mencionadas anteriormente señalan que el estrés crónico produce alteraciones morfológicas en la PL, una de las principales áreas que regulan las respuestas neuroendocrinas al estrés. A esto se suma, un aumento de la actividad del SeCB en condiciones de estrés crónico, que contribuiría a un deterioro en funciones cognitivas como toma de decisiones y atención. Esto ha sido estudiado en adultos, sin embargo existe en la actualidad poca información sobre las consecuencias del estrés crónico en la adolescencia, una etapa particularmente sensible a los efectos del estrés. Con estos antecedentes, surge la pregunta de investigación que guía el desarrollo de esta tesis:

¿Qué efecto tiene la administración de AM251, un antagonista/agonista inverso de CB₁, sobre procesos cognitivos como la toma de decisiones y la atención en ratas adolescentes estresadas crónicamente?

1. Hipótesis

La administración sistémica de AM251 contrarresta el deterioro que produce el estrés crónico sobre la toma de decisiones y atención auditiva de ratas adolescentes respecto a las tratadas con vehículo.

2. Objetivo general

Estudiar el rol de CB₁ en funciones cognitivas superiores de ratas adolescentes estresadas.

3. Objetivos específicos

- 3.1 Determinar el efecto de un antagonista de CB₁ sobre marcadores fisiológicos del estrés y conductas tipo ansiosas, en ratas adolescentes.
- 3.2 Analizar el efecto de un antagonista de CB₁, durante un protocolo de estrés, sobre la toma de decisiones y atención en ratas adolescentes,.

III. METODOLOGÍA

1. Bienestar animal

Tanto los experimentos como la manipulación de los animales fueron realizados de acuerdo al protocolo ético establecido por el “National Institutes of Health” (NIH) y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Así también, se respetaron los tres principios propuestos por Russell y Burch (1959) para la experimentación con animales, considerando las alternativas de reemplazo, reducción y refinamiento.

2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas machos *Sprague-Dawley* pertenecientes al Laboratorio de Neurobiología del Estrés del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. El laboratorio donde se llevó a cabo los experimentos se encuentra aislado de ruidos ambientales externos.

Se dio inicio a los experimentos en el DPN 22, con un peso aproximado de 50±10 (g). Estos fueron mantenidos en cajas de acrílico transparente de 20 x 20 x 40 cm, agrupados de tres animales por caja, con un ciclo circadiano de 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad (luz encendida a las 08:00 AM), en condiciones de temperatura y humedad controlada (20 ± 1 °C, 55 %). Los animales tuvieron libre acceso a agua y comida (LabDiet®, ProLab RMH 3000, MO, USA); siendo pesados diariamente con una balanza digital (modelo WLC2/A1, Radwag, Polonia).

3. Diseño experimental

La línea temporal del desarrollo de experimentos, se observa a continuación (Fig. 2).

DPN	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
Hito	D	ENTRENAMIENTO TEDA																			E1	H	ESTRÉS Y TRATAMIENTOS						E2	PC	EG







 Destete	 Evaluación 2: 50 Ensayos
 Evaluación 1: 50 Ensayos	 Pruebas conductuales: Campo abierto y laberinto elevado en cruz
 Hidratación	 Extracción Glándulas suprarrenales

Figura 2: Distribución temporal del diseño experimental. En gris se indican los días postnatales, a partir del destete (DPN 21), hasta la finalización de los experimentos (DPN 51), indicando los diferentes días e intervalos en que se desarrollaron los principales hitos en el transcurso de los experimentos.

Luego del nacimiento de las camadas, estas permanecieron juntas hasta el DPN 21 en donde fueron separadas de la madre. A partir de aquí, se registró diariamente el peso de las ratas, hasta finalizar los experimentos.

Aleatoriamente, los machos se distribuyeron para formar los grupos experimentales, que comenzaron a ser entrenados en la Tarea de Elección de Dos Alternativas, TEDA, a partir del DPN 22 hasta el DPN 39. En el DPN 40 fue evaluado el rendimiento en la TEDA mediante la realización de una prueba de 50 ensayos, incluyendo en el estudio solo a aquellos que logren un desempeño igual o superior al 80% de respuestas correctas. El DPN 41 fue de descanso e hidratación de los animales.

En el DPN 42, se dio inicio al tratamiento de los grupos experimentales, que consistió en la inyección intraperitoneal de AM251 o solución vehículo. Este procedimiento fue realizado hasta el DPN 48 (7 días de tratamiento), media hora antes de iniciar el protocolo de estrés por restricción de movimiento. Tanto la inyecciones intraperitoneales como el protocolo de estrés, fueron implementados por una persona distinta al experimentador.

En el DPN 49, los animales fueron evaluados nuevamente en la prueba de 50 ensayos. En el DPN 50, a partir de las 10:00 AM los animales se sometieron al análisis de actividad locomotora y ansiedad, utilizando el Paradigma de Campo Abierto y Plataforma Elevada en Cruz. Los experimentos culminaron con la extracción de las glándulas suprarrenales el DPN 51.

4. Tarea de Elección de Dos Alternativas: TEDA

Corresponde a un paradigma que se utiliza para evaluar la atención auditiva y la toma de decisiones en roedores. Consiste en una cámara de condicionamiento operante de 67 x 67 x 67 cm (Panlab S.L., Barcelona, Spain) con 3 parlantes ubicados frente a 3 puertos que se encuentran conectados a un dispensador de agua (Anexo, Figura 3). Esta cámara se encuentra al interior de una caja de entrenamiento aislada acústicamente, con una iluminación de 200 Lux (medida con un luxómetro digital, modelo #LX-1010B, Weafo Instrument Co., Shanghai, China) y ruido ambiental de 30 dB (medido con un sonómetro, modelo #1100, Quest Technologies, Oconomowoc, WI, USA).

Durante la realización de este paradigma, las ratas son privadas de agua durante 14 hrs a partir de las 19:00 hrs aproximadamente, ya que el agua se utiliza como recompensa en la tarea.

Este paradigma conductual consta de 3 etapas y en cada una de ellas, se puede realizar el estudio independiente del aprendizaje, consolidación de memoria y atención auditiva. La primera etapa del paradigma, se realiza durante la primera semana de entrenamiento y consiste en habituación de las ratas al traslado y al lugar de entrenamiento; luego se les presenta un tono de 1 kHz y otro de 15 kHz de forma alternada, cada uno a 70 dB, para habituarlas a los tonos de la tarea.

En la segunda etapa, comienza la privación de agua. De esta manera, se motiva el inicio de la prueba y se les entrega agua en el puerto central para que las ratas se habitúen al sonido que se produce al caer la gota de agua desde el dispensador. Luego, las ratas son expuestas a los dos tonos de forma manual, otorgándoles gotas de agua en el puerto derecho para el tono de 1 kHz y en el puerto izquierdo para el tono de 15 kHz (Anexo, Figura 4). En esta etapa, la rata aprende que la prueba comienza cuando introduce su hocico en el puerto central de la caja de condicionamiento, lo que permite que el sistema, controlado por el programa Packwin 2.0 (Panlab S.U.L, Barcelona, España), regule la emisión al azar de un tono (1 ó 15 kHz) que durará 350 milisegundos.

Posteriormente, se aplican los Programas 1 y 2 del software Pacwin 2.0., que consisten en generar el tono de 15 kHz o de 1 kHz por separado, con la caída de agua en el puerto correspondiente. La rata tiene 10 segundos luego de la emisión del tono, para introducir el hocico en el puerto correcto. Una vez que la rata introduce su hocico en el puerto central y comienza el entrenamiento, se considera que aprendió el paradigma. Al final de esta semana, ocurre la consolidación de la memoria relacionada con la tarea. Finalmente, se entrenan las ratas seleccionadas para mejorar su atención auditiva. El último día se selecciona las ratas que obtengan un rendimiento sobre el 80% de respuestas correctas en una prueba de 50 ensayos, con un intervalo de respuesta de 5 segundos; su desempeño en la prueba es grabado con una cámara web gran angular (Genius® Webcam Wide F100 FHD) que se encuentra instalada al interior de la caja de entrenamiento y que está sincronizada con el programa AnyMaze (Stoelting Co., Illinois, USA).

Para cuantificar la atención auditiva, se considera la diferencia de respuestas correctas (RC) de la primera y segunda evaluación de los 50 ensayos, donde un número positivo indica mejor atención auditiva. Para cuantificar la toma de decisiones se considera el tiempo entre ensayos (TEE), que es el tiempo total que demora la rata entre un ensayo y otro (considerando desde el ensayo 1 al 50); se

considera la diferencia entre la primera y la segunda evaluación. En este caso, un número negativo indica un mejor rendimiento en la toma de decisiones.

5. Fármacos a administrar

Los tratamientos se administraron de forma crónica y sistémica, a través de inyecciones intraperitoneales de solución vehículo ó AM251 en una dosis de 0,3 mg/Kg de peso del animal y en un volumen final constante durante los siete días de tratamiento de 800 uL. La inyección del fármaco o vehículo, fue aplicada entre los DPN 42 y 48, a las 09:30 AM, previo al inicio del protocolo de estrés.

El antagonista/agonista inverso de CB₁, AM251 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) es de naturaleza lipofílica, razón por la cual, se disuelve en etanol al 1% y solución salina (0.9% NaCl). Por consiguiente, el vehículo utilizado fue etanol al 1% en solución salina.

La dosis de AM251 fue la misma utilizada previamente en nuestro laboratorio (Gárate, 2013) que demostró ser efectiva para contrarrestar los efectos del estrés crónico en el aprendizaje y memoria, dependientes de hipocampo.

6. Protocolo de estrés

Se utilizó un protocolo de estrés por restricción de movimiento, durante una semana por tres horas diarias, a partir de las 10:00 AM (Negrón et al., 2013). Para ello, las ratas fueron introducidas en tubos de acrílico (6 x 20 cm), que presentan agujeros para una adecuada ventilación de los animales. Este procedimiento fue realizado por una persona diferente al experimentador, entre los DPN 42 y 48.

7. Marcadores fisiológicos del estrés

7.1 Ganancia de peso

El peso de los animales fue registrado a partir del destete, el DPN 21 hasta el DPN 50, utilizando una balanza digital (modelo WLC2/A1, Radwag, Polonia). Para efectos de análisis de ganancia de peso, se consideraron los días de tratamiento (DPN 42 al 48).

7.2 Peso glándulas suprarrenales

El peso de las glándulas adrenales fue cuantificado el último día del experimento. Para ello, el animal fue anestesiado completamente utilizando Isoflurano y se realizó posteriormente una incisión en la zona torácica que permitió la extracción de las glándulas suprarrenales. Posteriormente, se retiró el exceso de tejido adiposo y se procedió a registrar el peso de las glándulas. Finalmente, se calculó una proporción de las glándulas con respecto al peso del animal registrado el DPN 50, de la siguiente forma:

$$[(\text{Peso Glándulas Suprarrenales en mg} / 2) * 100 / (\text{Peso corporal en g})]$$

8. Actividad locomotora y conductas tipo ansiosas

8.1 Prueba de campo abierto

Se realiza con el propósito de evaluar los efectos del estrés y/o de la inyección intraperitoneal, sobre la actividad locomotora y conductas tipo ansiosas de los animales. Este paradigma conductual se desarrolla en una caja de acrílico negra (70 x 70 x 40 cm), en donde el animal se posiciona en el centro, permitiendo su exploración durante 5 minutos. El rendimiento del animal durante esta prueba se registró utilizando una cámara gran angular (Genius® Webcam Wide F100 FHD) y se analizó posteriormente con el software AnyMaze (Stoelting Co., Illinois, USA).

Durante todos los registros, la caja de este paradigma fue iluminada en el centro con 300 ± 20 lux (medidos con un luxómetro digital, modelo #LX-1010B, Weafo Instrument Co., Shanghai, China), siendo limpiada con una solución de etanol al 5% entre cada animal. El día previo a la realización de esta prueba se realizó un periodo de habituación de 15 minutos, para esto, los animales fueron trasladados hasta la sala de la prueba en sus respectivas jaulas.

Se determinó la distancia total recorrida (m), la velocidad promedio (m/s) y velocidad máxima (m/s) para cuantificar la actividad locomotora de las ratas; mientras que la distancia (m) y

el tiempo (s) de permanencia en el centro y en la periferia, fueron utilizados para evaluar las conductas tipo ansiosas de los animales.

8.2 Laberinto Elevado en Cruz

Este paradigma consta de una estructura con dos brazos abiertos (60 cm largo x 15 cm ancho), dos brazos cerrados (60 cm largo x 15 cm ancho x 15 cm alto) y una plataforma central (15 x 15 cm), situados a 100 cm sobre el suelo. La iluminación fue de 300 ± 10 lux en los brazos abiertos y 210 ± 10 lux en los brazos cerrados. El día previo al desarrollo de esta prueba, los animales fueron habituados al contexto de la sala durante 15 minutos.

Para iniciar la prueba, la rata fue ubicada en el centro del laberinto con su cabeza mirando hacia uno de los brazos abiertos, registrando su actividad durante 5 minutos con una cámara gran angular (Genius® Webcam Wide F100 FHD) para ser analizado posteriormente con el software ANY-Maze (Stoelting Co., Illinois, USA).

Para análisis de conductas tipo ansiosas se consideró el número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados, así como la relación entre el N° de entradas al brazo abierto con respecto al N° total de entradas [$(\text{N}^\circ \text{ entradas al brazo abierto} / \text{N}^\circ \text{ total de entradas}) * 100$].

9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de las pruebas conductuales así como de la ganancia de peso corporal neta y de las glándulas adrenales, fue realizado mediante ANOVA de dos vías, siendo uno de los factores la presencia/ausencia de estrés crónico y el otro factor, el tratamiento utilizado (control, vehículo o AM251). Para analizar el efecto diario del estrés sobre la ganancia de peso, se utilizó ANOVA de dos vías de medidas repetidas (Grupos x días). Lo mismo para el caso de la toma de decisiones durante los ensayos del 1 al 50 (Grupos x ensayos). Se utiliza como post-test el de Bonferroni, con comparaciones múltiples.

Los datos se presentan en promedios, acompañados de su respectivo error estándar medio (SEM). Los niveles de probabilidad menores o igual a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc).

IV. RESULTADOS

Para el análisis estadístico, considerar en todos los parámetros que se describen a continuación, la presencia de dos Grupos: No estresados y Estresados. Dentro de dichos grupos, existen tres tratamientos a comparar: Control, Vehículo y AM251. Para hacer alusión a un grupo con su tratamiento, en general se referirá a él como “subgrupo”, existiendo en consecuencia un total de 6 subgrupos experimentales (Ver Tabla 1).

1. Efecto de AM251 sobre los marcadores fisiológicos del Estrés

1.1 Ganancia de Peso

Como se observa en la Fig. 5a, al finalizar los tratamientos existe una diferencia significativa entre los grupos estresados y no estresados ($F_{(1, 30)} = 58,2$; $p < 0,0001$). Además, hubo interacción entre días y grupos experimentales ($F_{(6, 30)} = 16,95$; $p < 0,0001$).

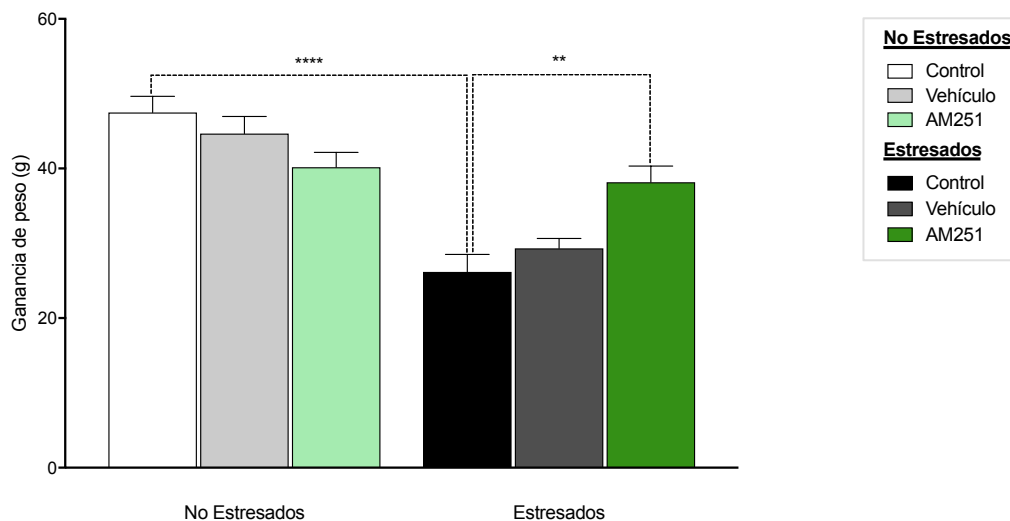
Al analizar el efecto del estrés crónico en los grupos que no recibieron tratamiento, se observa una disminución significativa en la ganancia de peso neta con respecto al control (No estresados: Control = $47,5 \pm 2,14$ g; Estresados: Control = $26,17 \pm 2,36$ g; $p < 0,001$). Estas diferencias, ya pueden apreciarse a partir del tercer día de estrés (DPN 44), en ratas adolescentes (Fig. 5b) (No estresados: Control = $18,33 \pm 0,88$ g; Estresados: Control = $7,17 \pm 1,25$ g; $p < 0,001$).

En el grupo no estresado, no hay diferencias significativas en la ganancia de peso neta de los tratamientos, con respecto al control (No estresados: Control = $47,5 \pm 2,14$ g; Vehículo = $44,67 \pm 2,29$ g; AM251 = $40,17 \pm 1,99$ g; $p > 0,9999$; $p = 0,2679$). Sin embargo, en la Fig. 5a, es posible observar una tendencia a disminuir la ganancia de peso en el subgrupo tratado con AM251, con respecto al control y al vehículo. De hecho, al observar el efecto diario del tratamiento con AM251 (Fig. 5b), se evidencia una disminución significativa en la ganancia de peso en los últimos tres días de este tratamiento, con respecto al vehículo (No estresados: Vehículo = $30,33 \pm 1,59$ g; AM251 = $26,5 \pm 1,12$ g; $p = 0,0176$).

En el grupo estresado, existe un aumento significativo en la ganancia de peso neta del tratamiento de AM251 con respecto al control pero no respecto al vehículo (Estresados: Control = $26,17 \pm 2,36$ g; AM251 = $38,17 \pm 2,15$ g; Vehículo = $29,33 \pm 1,31$ g; $p = 0,0043$; $p = 0,0771$). No obstante, al

analizar el efecto diario del estrés crónico sobre la ganancia de peso (Fig. 5b), se observa diferencias significativas a partir del tercer día de tratamiento entre AM251 y vehículo, que se mantienen hasta finalizar el experimento (Estresados: AM251= 12,67 ± 1,38 g; Vehículo = 6,83 ± 1,52 g; p = 0,0009).

a)



b)

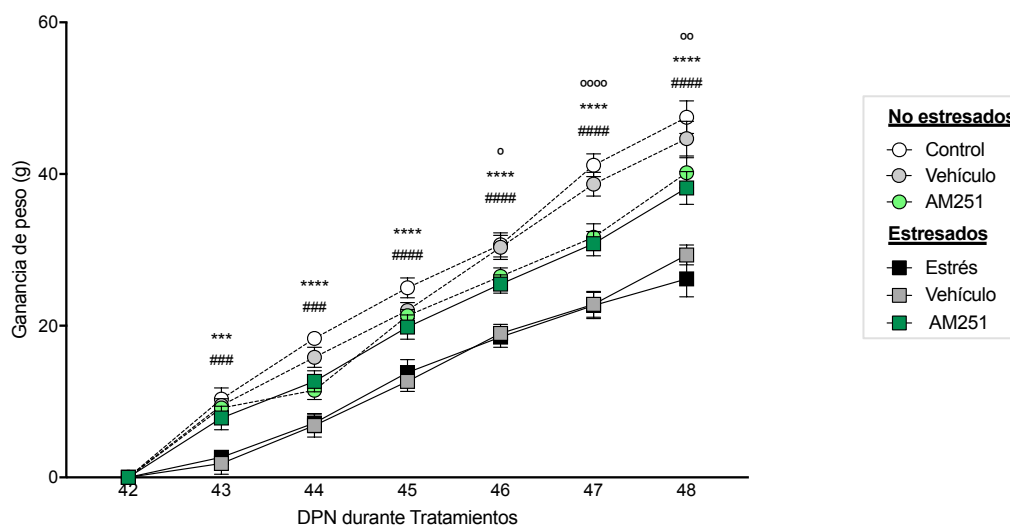


Figura 5: Efecto de los tratamientos en la ganancia de peso de ratas adolescentes. a) Ganancia de peso promedio (g) de los seis subgrupos al finalizar el tratamiento el DPN 48 **b)** Ganancia de peso (g) diaria durante el tratamiento, desde el DPN 42 al DPN 48. Todos los datos están representados como Media ± SEM (n = 6); * representa diferencias significativas entre No estrado: Control y Estresado: Control; # representa diferencias significativas entre Estresado: Vehículo y Estresado: AM251; ° representa diferencias significativas entre No estresado: Vehículo y No estresado: AM251.

1.2 Peso Glándulas Suprarrenales

La administración de AM251 tanto en ratas estresadas como no estresadas, redujo significativamente el peso de las glándulas suprarrenales con respecto a los animales tratados con vehículo (No estresados: Vehículo = $14,77 \pm 0,8894$ mg/Kg; AM251 = $9,033 \pm 0,6505$ mg/Kg; $p < 0,0001$; Estresados: Vehículo = $15,62 \pm 0,233$ g; AM251 = $9,667 \pm 0,4695$ mg/Kg; $p < 0,0001$) (Ver Fig. 6).

El estrés crónico generó un aumento significativo en el peso de las glándulas suprarrenales del grupo estresado no sometido a tratamiento, con respecto al subgrupo control (No estresado: Control = $10,08 \pm 0,5671$ mg/Kg; Estresado: Control = $16,5 \pm 0,5675$ mg/Kg; $p < 0,0001$). No existe diferencia significativa entre el subgrupo sometido a estrés que no recibió tratamiento, en comparación con el estrés vehículo.

Por último, se observa en el grupo no estresado, una disminución en el peso de las adrenales en el tratamiento con AM251, con respecto al vehículo (No estresado: Vehículo = $14,77 \pm 0,8894$ mg/Kg; AM251 = $9,033 \pm 0,6505$ mg/Kg; $p < 0,0001$)

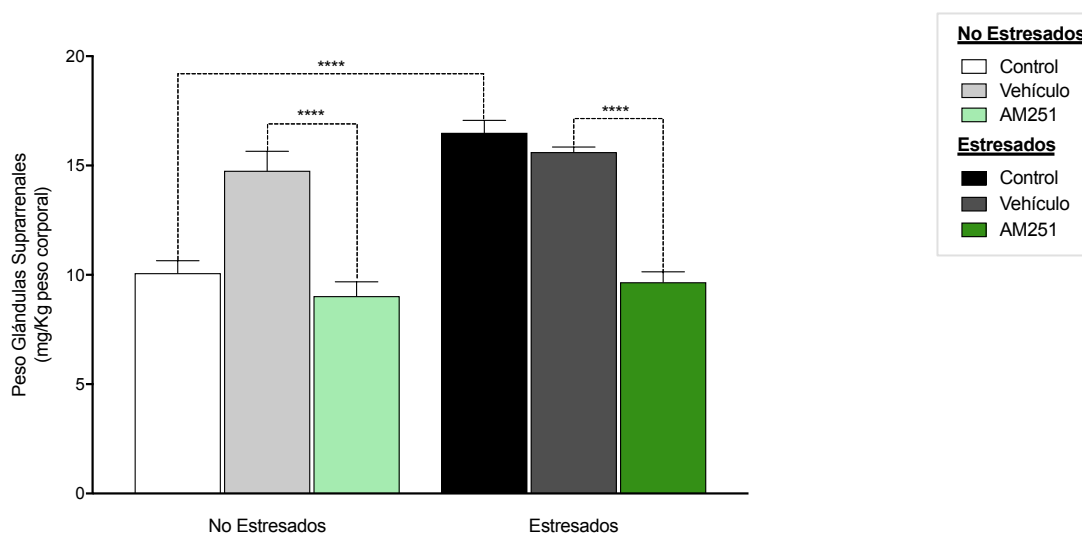


Figura 6: Efecto de los tratamientos en el peso de las glándulas suprarrenales de ratas adolescentes. Razón entre el peso de las glándulas adrenales (mg) y el peso de los animales (Kg) al finalizar el tratamiento (DPN 48). Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6); **** $p < 0,0001$.

2. Efecto de AM251 sobre pruebas conductuales

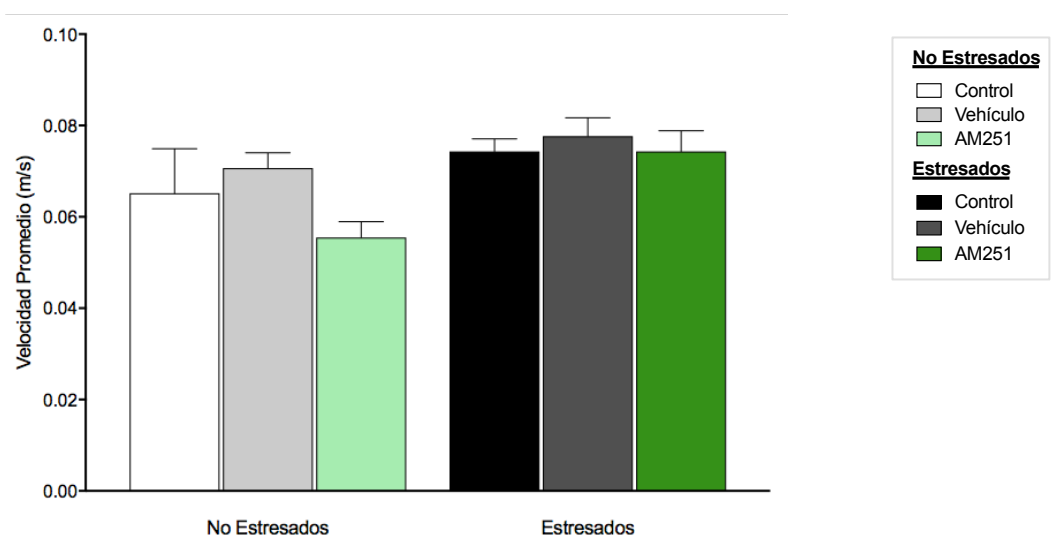
2.1 Actividad locomotora en Campo Abierto

Como se observa en la Fig. 7a, no existen diferencias por efecto de los tratamientos en la velocidad promedio analizada en la prueba de campo abierto de ninguno de los subgrupos (No estresados: Control= $0,06517 \pm 0,0097$ m/s; Vehículo= $0,0706 \pm 0,0033$ m/s; AM251= $0,0555 \pm 0,0034$ m/s; Estresados: Control= $0,0743 \pm 0,0027$ m/s; Vehículo= $0,0776 \pm 0,0040$ m/s; AM251= $0,0743 \pm 0,0045$ m/s).

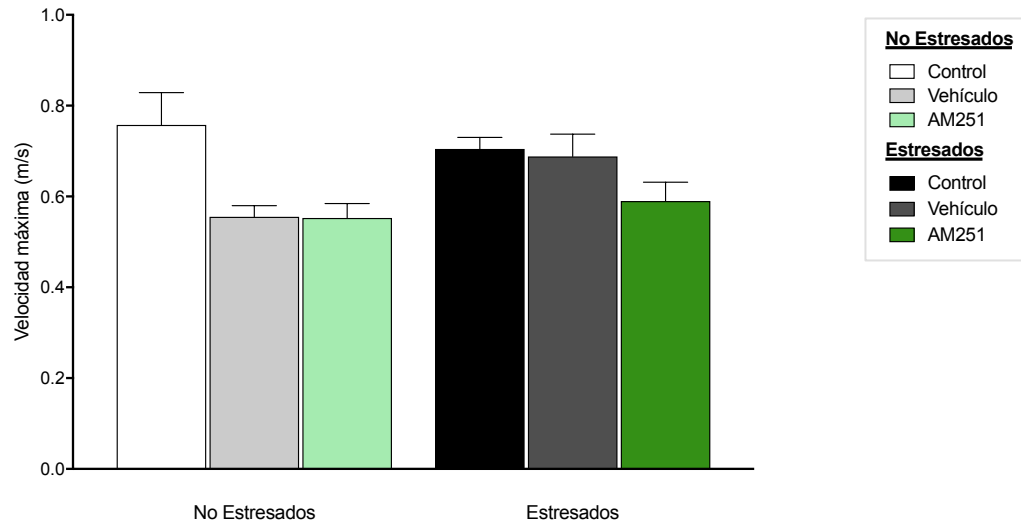
Al analizar la velocidad máxima (Ver Fig. 7b) de los subgrupos en la prueba de campo abierto, tampoco se observa diferencias entre los tratamientos aplicados (No estresados: Control= $0,7575 \pm 0,0711$ m/s; Vehículo= $0,5553 \pm 0,0245$ m/s; AM251= $0,5528 \pm 0,0316$ m/s; Estresados: Control= $0,7045 \pm 0,0256$ m/s; Vehículo= $0,688 \pm 0,0491$ m/s; AM251= $0,59 \pm 0,0415$ m/s).

Por último, al igual que en los demás parámetros para analizar la actividad locomotora de los animales, no se evidenció diferencia entre los tratamientos con respecto a la distancia total recorrida durante la prueba (Ver Fig. 7c). (No estresados: Control= $21,62 \pm 2,20$ m/s; Vehículo= $21,08 \pm 0,97$ m/s; AM251= $16,90 \pm 0,97$ m/s; Estresados: Control= $22,27 \pm 0,81$ m/s; Vehículo= $22,63 \pm 1,02$ m/s; AM251= $22,15 \pm 1,54$ m/s).

a)



b)



c)

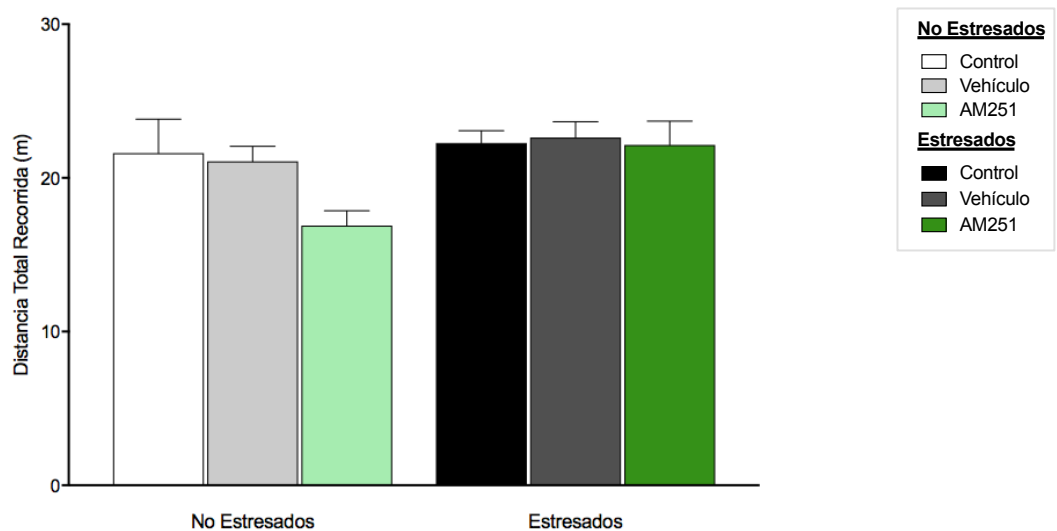


Figura 7: Efecto de los tratamientos sobre la actividad locomotora en la prueba de cambio abierto. a) Velocidad promedio (m/s) b) Velocidad máxima (m/s) c) Distancia Total Recorrida (m). Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

2.2 Conductas tipo ansiosas en Laberinto Elevado en Cruz

En la Fig. 8a, se observa que el estrés crónico disminuye significativamente el tiempo de permanencia en el brazo abierto del laberinto elevado en cruz, solo en el caso del subgrupo que no recibió tratamiento, con respecto al control del grupo no estresado (No estresado: Control= $48,48 \pm$

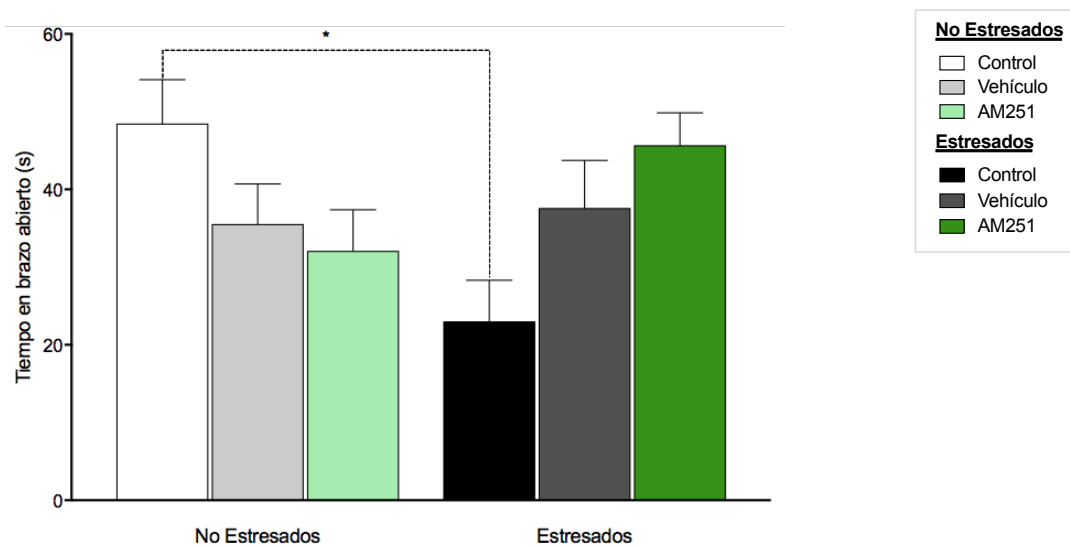
5,63 s; Estresado: Control= 23,02 ± 5,30 s; p= 0,03). No existen diferencias significativas entre los demás subgrupos (No estresado: Vehículo= 35,55 ± 5,16 s; No Estresado: AM251= 32,08 ± 5,30 s; Estresado: Vehículo= 37,6 ± 6,14 s; Estresado: AM251= 45,68 ± 4,18 s).

Al analizar la distancia recorrida en el brazo abierto del laberinto (Fig. 8b), nuevamente se observa que el grupo estresado que no recibió tratamiento, disminuye significativamente su distancia recorrida con respecto al subgrupo control (No estresado: Control= 2,03 ± 0,35 m; Estresado: Control= 0,32 ± 0,10 m; p= 0,034).

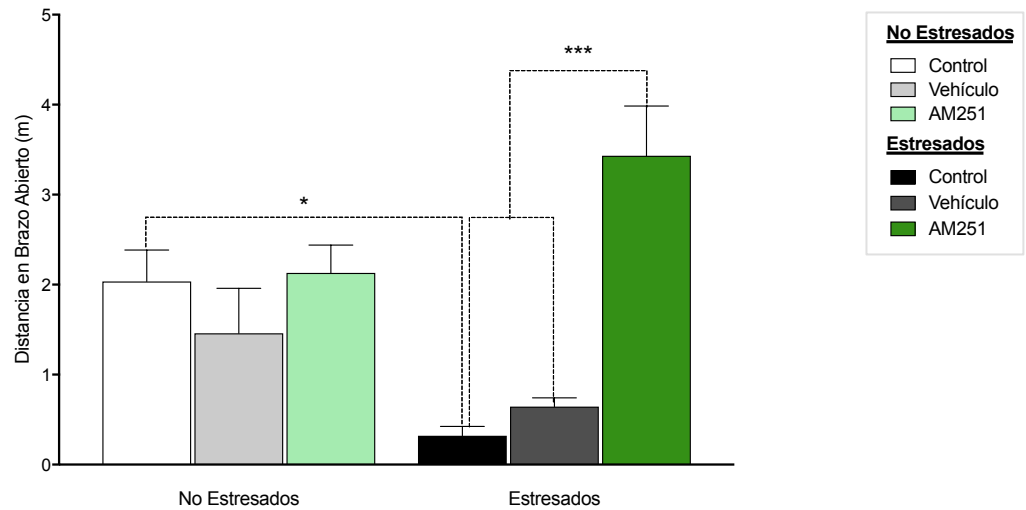
Dentro del grupo de animales estresados, el subgrupo tratado con AM251 aumenta significativamente la distancia recorrida en el brazo abierto, con respecto al vehículo (Estresado: Vehículo= 0,64 ± 0,09 m; AM251= 3,43 ± 0,55 m; p= 0,0001) y con respecto al subgrupo que no recibe tratamiento (Estresado: Control= 0,32 ± 0,10 m; AM251= 3,43 ± 0,55 m; p< 0,0001).

No existen diferencias entre los grupos estresados y no estresados ($F_{(2, 30)} = 2,39$; p = 0,1085), ni tampoco efecto significativo en los tratamientos ($F_{(1, 30)} = 2,80$; p = 0,1048), en la razón del número de entradas al brazo abierto con respecto al total de entradas al laberinto (Fig. 8c).

a)



b)



c)

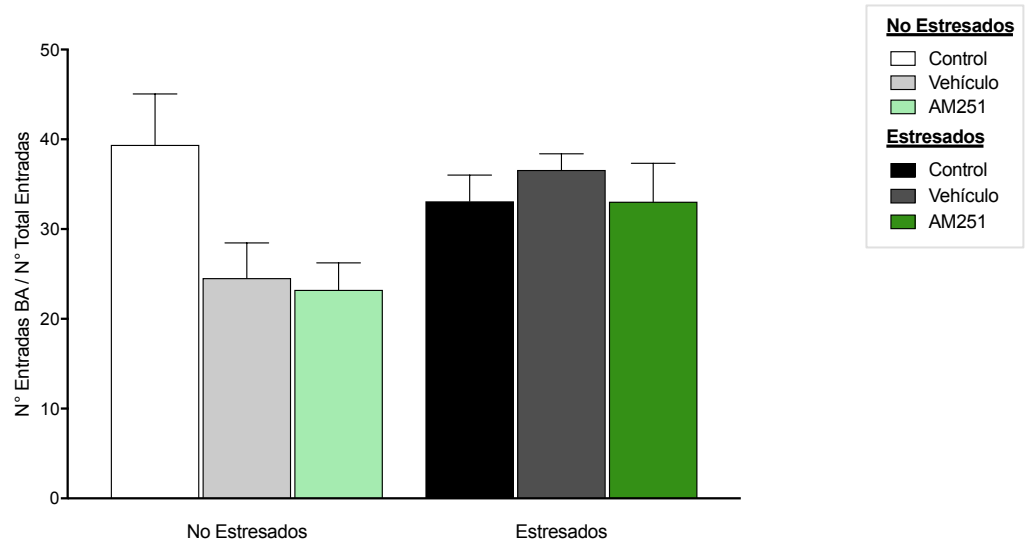


Figura 8: Efecto de los tratamientos sobre las conductas tipo ansiosas en el laberinto elevado en cruz: a) Tiempo en el brazo abierto (s) b) Distancia recorrida en el brazo abierto (m). c) Razón N° entradas al Brazo Abierto (BA), respecto al N° Total de Entradas. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6 por subgrupo); *p=0,03; *p<0,001.**

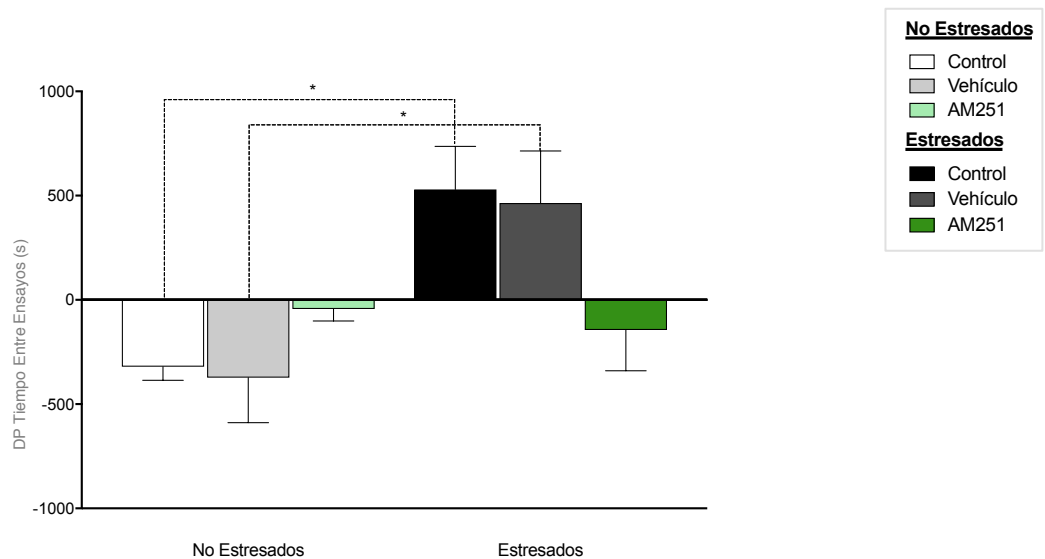
3. Efecto de AM251 sobre Funciones Cognitivas

3.1 Toma de decisiones

En la Fig. 9a, se observa que el grupo estresado no sometido a tratamiento aumenta significativamente el tiempo entre ensayos, con respecto al subgrupo control (No estresados: Control: $-320,6 \pm 65,05$; Estresados: Control $529,9 \pm 206$; $p=0,03$). Así también, se observa esta situación al comparar los subgrupos tratados con vehículo (No estresados: Vehículo: $-373,4 \pm 215,7$; Estresados: Vehículo $464,2 \pm 250,4$; $p=0,04$).

Finalmente, no se observa diferencia significativa del tratamiento con AM251 comparado con el vehículo en ninguno de los dos grupos (No estresado: Vehículo= $-373,4 \pm 215,7$; AM251= $-43,42 \pm 57,94$; Estresado: Vehículo= $464,2 \pm 250,4$; AM251= $-144,4 \pm 195,7$). Sin embargo, al analizar el tiempo entre ensayos en intervalos de diez (Fig. 10b), se observa que el tratamiento con AM251 genera una disminución significativa del TEE en los últimos diez ensayos (No estresado: Vehículo= $470,6 \pm 169,4$; AM251= $35,42 \pm 62$; $p = 0,0116$). En el caso de animales no estresados ocurre el efecto contrario: el tratamiento con AM251 aumenta el tiempo entre respuestas en los últimos ensayos de la prueba (Fig. 9b).

a)



b)

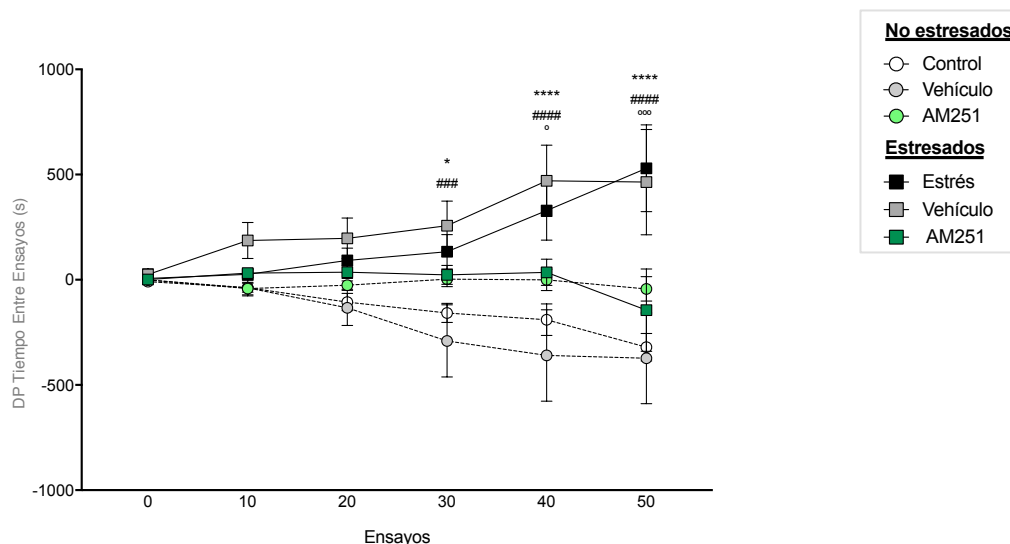


Figura 9: Efecto de los tratamientos sobre la toma de decisiones. DP representa la diferencia promedio del tiempo entre ensayos entre la evaluación 1 y 2 en el paradigma TEDA. **a)** Promedio final del tiempo entre ensayos. **b)** Diferencia entre el tiempo cada 10 ensayos. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6 por subgrupo); * representa diferencias significativas entre los grupos No estresado: Control y Estresado: Control; # representa diferencias significativas entre los grupos No estresado: Vehículo y No estresado: AM251; ° representa diferencias significativas entre los grupos Estresado: Vehículo y Estresado: AM251.

3.2 Atención auditiva

Al analizar el promedio de respuestas correctas, entre los grupos no estresados y estresados, sin tratamiento, se observa en la Fig. 10, que el estrés disminuye significativamente los aciertos con respecto al control (No estresados: Control: $2,00 \pm 1,59$; Estresados: Control $-9,00 \pm 2,52$; $p=0,0003$). El mismo efecto del estrés, se evidencia al comparar los subgrupos que recibieron el tratamiento vehículo (No estresados: Vehículo: $5,00 \pm 0,73$; Estresados: Vehículo $-5,00 \pm 1,46$; $p=0,0009$).

En los grupos estresados, el tratamiento con AM251 tiene un efecto significativo al aumentar las respuestas correctas con respecto al subgrupo tratado con vehículo (Estresados: Vehículo: $-5,00 \pm 1,46$; AM251 $4,50 \pm 0,96$; $p=0,0018$).

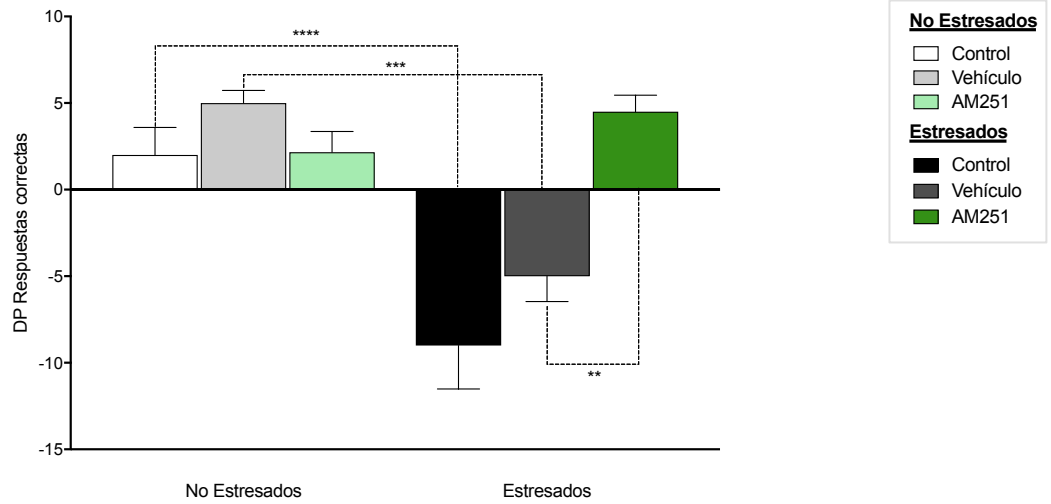


Figura 10: Efecto de los tratamientos sobre la atención auditiva en la TEDA. DP indica la diferencia promedio de respuestas correctas entre la evaluación 1 y 2 del paradigma TEDA. Diferencia promedio total en el desarrollo de la prueba. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6); **p=0,0018; ***p=0,0003; ****=0,0009.

V. DISCUSIÓN

1. Efecto de AM251 sobre los marcadores fisiológicos del Estrés

Tal como ha sido demostrado en investigaciones anteriores utilizando similares paradigmas de estrés (Cook & Wellman, 2004; Eiland et al., 2012; Pérez et al., 2013; Negrón et al., 2014), en esta tesis se encontró que el estrés crónico por restricción de movimiento, disminuyó significativamente la ganancia de peso con respecto a individuos control, en los subgrupos no sometidos a tratamiento (Fig. 5a). El estrés crónico aumenta los niveles basales de CORT (Cook & Wellman, 2004; Yeon, Hoon & Soon, 2013), probablemente reflejando alteraciones en los mecanismos de retroalimentación negativa del eje HPA. Si consideramos el hecho de que la ingesta de comida y muchos procesos metabólicos son mediados por glucocorticoides, su alteración podría relacionarse con la disminución en la ganancia de peso (Scherer et al., 2011; Yeon, Hoon & Soon, 2013). Consideremos además que los efectos de la CORT difieren de acuerdo al estado en que se encuentre el individuo; así en períodos de reposo promueve el almacenamiento de energía a través de la glucogénesis, mientras que durante períodos de estrés agudo, promueve la glucogenólisis y gluconeogénesis, con el objetivo de movilizar glucosa como fuente de energía (Champagne, de Kloet & Joëls, 2009; Peters, et al., 2004).

Otro mecanismo que podría explicar las diferencias en la ganancia de peso, es que el estrés crónico conduce a una mayor liberación de glutamato en regiones límbicas (Bagley & Moghaddam, 1997; Reznikov et al., 2007) lo cual, nuevamente, podría incrementar la demanda energética proporcionada por el catabolismo lipídico, dando como resultado que en nuestros experimentos los animales estresados tengan menor ganancia de peso que sujetos control (Negrón et al., 2014).

Durante todo el tratamiento, no hubo diferencias significativas en la ganancia de peso de animales no estresados tratados con vehículo, con respecto a sujetos control, lo que estaría indicando que las inyecciones intraperitoneales durante 7 días, no resultaron estresantes en ratas adolescentes como ha ocurrido en estudios de similares características con animales adultos (Cook & Wellman, 2004; Brown, Henning & Wellman, 2005; Mitra & Sapolsky, 2008). Sería interesante complementar estos resultados con el análisis de niveles plasmáticos de CORT, que en animales adultos revelan mayores concentraciones en sujetos sometidos a inyecciones crónicas con vehículo con respecto a sujetos controles.

El tratamiento con AM251 en animales no estresados, disminuyó significativamente la ganancia de peso, con respecto a sujetos tratados con vehículo, efecto que se observa a partir del quinto día de tratamiento. Esto podría explicarse por la similitud estructural del AM251 con SR141716A (otro antagonista de CB₁), que fue utilizado inicialmente para tratar la obesidad (Pertwee, 2004). Se sabe que los receptores de CB₁, se encuentran altamente expresados en áreas hipotalámicas, involucradas en la regulación de conductas de alimentación. Dichas regiones también se conectan con el sistema de recompensa, por lo tanto antagonistas de CB₁, como AM251, podrían indirectamente inhibir las propiedades recompensantes de la comida, mediadas por dopamina (Xie et al., 2007; Di Marzo, 2008) y de esa forma, lograr una disminución en la ganancia de peso, como ocurrió en nuestros experimentos.

En sujetos estresados, el tratamiento con AM251 logró revertir la disminución en la ganancia de peso a causa del estrés crónico, a diferencia del tratamiento con vehículo que no tiene tal efecto. El aumento significativo en la ganancia de peso gracias a AM251 ocurre a partir del tercer día de tratamiento (DPN 44) y se mantiene hasta la finalización (DPN 48). De gran relevancia es el efecto opuesto de AM251 generado a partir del tratamiento de sujetos no sometidos a estrés en comparación con aquellos que sí fueron estresados crónicamente: en sujetos no estresados, AM251 disminuye la ganancia de peso, mientras que en sujetos estresados crónicamente, la aumenta; esto al ser comparados con el tratamiento vehículo. Esto nos lleva a la idea de que AM251 tiene un efecto protector al ser aplicado previo al estrés, que estaría impidiendo que ocurran los efectos en la disminución en la ganancia de peso, tantas veces observada en diferentes protocolos de estrés que utilizaron distintas intensidades y duración (Brown, Henning & Wellman, 2005; Sherer, Holmes & Harris, 2010; Eiland et al., 2012; Pérez et al., 2013; Negrón et al., 2014). Es probable que esa protección tenga relación con algún mecanismo que aun no ha sido descrito y que es mediado por CORT. Si el AM251 aplicado previo al estrés, logra impedir que ocurran las alteraciones en los mecanismos de retroalimentación del estrés, el sistema no sufriría los efectos nocivos de su desregulación, y con ello, no debieran observarse tampoco hipertrofia de glándulas adrenales, ni aumento de conductas tipo ansiosas e incluso, tampoco debiéramos ver alteradas las funciones cognitivas.

Otro marcador fisiológico del estrés, lo constituye el peso de las glándulas adrenales. En ese sentido, y de acuerdo a lo esperado según la bibliografía (Ulrich-Lay et al., 2006; Eiland et al., 2012; Negrón et al., 2014), se encontró que animales sometidos a estrés crónico, presentan hipertrofia de glándulas suprarrenales con respecto a los individuos control. Esto es, en individuos no sometidos a ningún tratamiento. El aumento en el tamaño de las glándulas adrenales en ratas estresadas, se

explicaría por la hiperactivación del eje HPA. El estrés crónico incrementa los niveles plasmáticos de CORT e induce hipertrofia e hiperplasia, dependiente de ACTH (Ulrich-Lai et al., 2006; Pérez et al., 2013; Negrón et al., 2014).

Individuos no estresados, tratados con vehículo también presentan un aumento significativo en el peso de glándulas adrenales con respecto a animales sin tratamiento, lo que nos lleva a señalar a las inyecciones intraperitoneales como un factor estresante, tal como ha sido descrito previamente en otras investigaciones (Cook & Wellman, 2004; Brown, Henning & Wellman, 2005; Mitra & Sapolsky, 2008). Allí se han observado mayores niveles de CORT en comparación con animales que no recibieron inyección alguna.

Si las inyecciones por sí solas resultan ser estresantes para los animales, lo que en este caso se refleja en hipertrofia adrenal, podríamos suponer que animales tratados con vehículo y que además fueron sometidos a un protocolo de estrés, tendrían mayor alteración adrenal. Sin embargo no existe diferencia significativa entre estos subgrupos (No estresado: control / Estresado: control / Estresado: vehículo). El hecho de que dos estresores (inyecciones + estrés por restricción) no tengan mayor efecto que la aplicación de un estresor (estrés por restricción), podría explicarse por un efecto de enmascaramiento del primer estresor sobre el segundo, en donde lo que observamos finalmente en las adrenales, sea consecuencia del aumento crónico de CORT inducido por las inyecciones crónicas, que fueron previas a la restricción de movimiento.

Al igual que lo ocurrido en la ganancia de peso descrita previamente, el tratamiento con AM251 en animales estresados crónicamente, revierte la hipertrofia de las glándulas adrenales con respecto al subgrupo tratado con vehículo. Ahora bien, en el caso de los efectos de AM251 sobre las glándulas adrenales, nos encontramos con que no difieren en sujetos no estresados y estresados, a diferencia de lo que ocurría en la ganancia de peso. En este parámetro, AM251 revierte la hipertrofia adrenal en sujetos no estresados, así como lo hace en sujetos estresados. La diferencia encontrada en el efecto del fármaco sobre estos dos parámetros, tal vez ocurre porque las adrenales de animales tratados con vehículo fueron sensibles al efecto de la CORT inducida por las inyecciones y respondieron hipertrofiándose; sin embargo, animales tratados previamente con AM251, tienen un sistema protegido frente al estrés, por lo que no desarrollan la hipertrofia adrenal.

2. Efecto de AM251 sobre la actividad locomotora

No existen diferencias significativas entre los grupos ni entre los tratamientos en cuanto a velocidad máxima ni velocidad promedio, ni tampoco en la distancia total recorrida durante el desarrollo de la prueba de campo abierto (Figs. 7a, 7b, 7c). Lo anterior nos demuestra que ni la administración de AM251 ni el protocolo de estrés utilizado, afectaron la actividad locomotora de los animales, por lo que cualquier otro efecto observado a nivel de comportamiento, no puede ser atribuido a un daño locomotor en los individuos.

3. Efecto de AM251 sobre las conductas tipo ansiosas

En la prueba de campo abierto, no existen diferencias significativas en el tiempo gastado en el centro ni en la periferia, de ningún subgrupo (gráficos no mostrados). Estos resultados se contraponen a lo obtenido por Negrón et al (2014), utilizando el mismo protocolo de estrés.

En el laberinto elevado en cruz, los animales estresados crónicamente evidencian menor distancia recorrida en el brazo abierto, así como menor tiempo de permanencia, al ser comparados con animales control. Al considerar solo estos dos parámetros, podríamos suponer que el protocolo de estrés utilizado tuvo un efecto ansiogénico en los animales. Sin embargo, al analizar la razón entre el número de entradas al brazo abierto con respecto al número total de entradas, no existe diferencia significativa entre estos subgrupos. Es probable que al aumentar el n de los subgrupos, la diferencia encontrada en la razón del número de entradas sea mayor en individuos control versus estresados, ya que en el gráfico se puede observar esta tendencia (Ver Fig. 8c). Resulta interesante observar que en el trabajo de Negrón et al (2014), en donde se utilizó el mismo protocolo de estrés en ratas de la misma edad que las usadas en esta investigación, el estrés produjo un efecto ansiogénico, reflejado en un menor tiempo de permanencia en el centro de la prueba de campo abierto y en una menor proporción de entradas al brazo abierto con respecto al total de entradas, en el laberinto elevado en cruz, por lo que se esperaría replicar estos resultados en nuestra investigación. Sin embargo, una posible explicación en las diferencias encontradas, podría guardar relación con que el cerebro de ratas entrenadas intensivamente en un protocolo de atención y toma de decisiones, durante más de 20 días consecutivos posterior al destete, es diferente al cerebro de ratas de las mismas condiciones pero que no fueron sometidas a este entrenamiento, por lo que los mecanismos para enfrentar las conductas tipo ansiosas, podrían diferir también.

En los animales no sometidos a estrés, no se observa diferencia en ninguno de los parámetros del laberinto elevado en cruz relacionados con conductas tipo ansiosas, entre los animales tratados con vehículo y con AM251. Sin embargo, en aquellos animales que fueron sometidos a estrés crónico, observamos que el AM251 logra aumentar significativamente la distancia recorrida en el brazo abierto, con respecto a aquellos que fueron tratados con vehículo. Esto podría indicar que el antagonista de CB₁ utilizado, tiene un efecto ansiolítico en animales no estresados, sin embargo esta inferencia no es apoyada por los otros dos parámetros analizados en donde no se observan diferencias significativas entre el AM251 y vehículo.

Las conductas tipo ansiosas son principalmente reguladas por la amígdala basolateral y el BNST (Davis, 1998; Davis et al., 2010). De hecho, algunos paradigmas de estrés crónico que potencian conductas tipo ansiosas, han sido correlacionados con hipertrofia dendrítica en la amígdala basolateral y BNST (Vyas, Bernal & Chattarji, 2003; Vyas et al., 2002; Vyas, Pillai & Chattarji, 2004). Es posible que los resultados ansiogénicos encontrados en esta tesis, se expliquen por este mecanismo; sin embargo para tener mayor certeza de los discordantes efectos obtenidos en la prueba de campo abierto y en el laberinto elevado en cruz, sería deseable aumentar el número de animales de los grupos experimentales.

4. Efecto de AM251 sobre las funciones cognitivas

En nuestro laboratorio ha sido demostrado previamente que el estrés crónico disminuye significativamente el promedio de respuestas correctas (DP-RC) en comparación con animales controles adultos, así como también aumenta el promedio entre ensayos en la realización de la TEDA (Pérez et al., 2013). Dichas alteraciones también fueron evidentes en el desarrollo de esta tesis, en donde un protocolo más breve de estrés por restricción de movimiento bastó para alterar las funciones cognitivas en animales adolescentes. Lo mismo ocurre al comparar animales tratados con vehículo: aquellos sometidos a estrés crónico, ven deteriorada su toma de decisiones y atención con respecto al subgrupo no sometido a estrés.

El deterioro en la atención en ratas estresadas es contrarrestado por el tratamiento con AM251, con respecto a animales tratados con vehículo, mientras que en la toma de decisiones, el AM251 tiene un efecto anti-estrés, a partir del ensayo 40 de la prueba de TEDA.

Como ya se ha descrito, la toma de decisiones y la atención son funciones cognitivas que residen principalmente en la CPFm (Damasio, 1994; Fuster, 1997; Bechara et al., 2000; Bechara & Van Der Linden, 2005), un área que además tiene un importante rol en la inhibición del eje HPA después de una respuesta al estrés (Holmes & Wellman, 2009; Radley et al., 2009). Pero a su vez, la CPF es altamente sensible a los efectos del estrés crónico, el cual induce alteraciones morfológicas en neuronas piramidales, que se relacionan probablemente con los déficit cognitivos asociados al efecto del estrés (Radley et al., 2004; Cook y Wellman, 2004; Izquierdo et al., 2006; Radley et al., 2013). Estos han sido descritos en animales adultos, sin embargo la adolescencia es un período especialmente crítico y de mayor sensibilidad, particularmente de aquellas áreas que maduran más tardíamente, como la CPF (McEwen, 1992; Lupien et al., 2009; Yuen et al., 2012, Negrón et al., 2014). En ese sentido, en esta tesis lo anterior ha quedado en evidencia, puesto que tan solo 7 días de estrés por restricción durante tres horas, producen las alteraciones en la toma de decisiones y atención, que se han descrito en adultos, con mayor duración e intensidad en los protocolos utilizados. Este deterioro a nivel cognitivo, tanto en la toma de decisiones como en la atención, fue eficazmente contrarrestado por un antagonista de CB₁, el AM251, aplicado previo al estrés, en ratas adolescentes. Esto sugiere que el AM251 tuvo, al menos algunos de sus efectos, sobre la actividad neuronal de la CPFm.

El cerebro adolescente está sometido a un proceso de maduración de estructuras de procesamiento de orden superior claves, como lo es la CPF (Casey & Jones, 2010; Gogtay et al., 2004; Lee et al., 2015). Sin embargo, una consecuencia de esa elevada naturaleza plástica, es la alta vulnerabilidad al estrés durante esta etapa (Adriani & Laviola, 2004; Andersen, 2003; Lee et al., 2015).

Investigaciones en humanos y roedores relacionan las experiencias de estrés en la adolescencia, con una permanente desregulación del eje HPA, alterando la subsecuente reactividad al estrés, funcionamiento cognitivo y conduciendo a alteraciones conductuales y emocionales que no ocurren bajo similares condiciones en adultos (Sapolsky & Meaney, 1986; Viveros et al., 2005; Rubino et al., 2009; McCormick et al., 2010; Buwalda et al., 2011; Campolongo et al., 2011; Llorente-Berzal et al., 2011; Lee & Gorzalka, 2012). Así también, modificaciones en la normal señalización del SeCB en estructuras corticolímbicas, como la CPF, contribuyen a adquirir esas mismas alteraciones (Patton et al., 2002; Cohen et al., 2008), en línea con evidencia que señala al SeCB como el principal regulador del eje HPA (Hill & McEwen, 2009; Hill et al., 2010; Lee & Gorzalka, 2012).

En general, la señalización eCB ejerce un rol inhibitorio sobre la actividad del eje HPA, contribuyendo a la mantención de bajos niveles de glucocorticoides durante condiciones basales y

funcionando para detener la actividad del eje HPA en situaciones de estrés agudo (Gorzalka & Hill, 2009; Lee & Gorzalka, 2012).

Si consideramos, que la alteración del SeCB por el efecto del estrés crónico en la adolescencia contribuye al deterioro de los mecanismos de retroalimentación negativa del eje HPA, entonces podemos señalar que la inhibición previa al estrés del SeCB, a través del uso de antagonistas de los receptores de CB₁ en la CPF, podría estar impidiendo la subsecuente desregulación del eje HPA, y en consecuencia, los sistemas tratados con AM251, no evidenciarían las características propias de un individuo estresado crónicamente; esto es, entre otros factores, disminución en la ganancia de peso, hipertrofia adrenal, aumento de conductas tipo ansiosas y alteraciones en funciones cognitivas como toma de decisiones y atención, con respecto a sujetos control. Eso es precisamente lo que se evidenció en este estudio. Ahora bien, el mecanismo exacto por el que esta especie de “protección” podría estar ocurriendo, permanece ampliamente inexplorado.

Se ha propuesto que el daño cognitivo inducido por estrés crónico, podría ocurrir por la supresión de la expresión y función de receptores de glutamato en la CPF (Yuen et al., 2012). Dada la importancia de la señalización glutamatérgica en procesos cognitivos mediados por la CPF (Goldman-Rakic, 1995; Lisman et al., 1998; Yuen et al., 2012), no resultaría extraño que el estrés repetido dañe las funciones que allí residen. Al respecto, el grupo de investigación de Yuen y cols. (2012), demostraron que la transmisión glutamatérgica en neuronas piramidales de la CPF, está significativamente suprimida en ratas adolescentes expuestas a estrés repetido, sin la aparente pérdida de sinapsis. Esta supresión en la transmisión de glutamato, sería dependiente de GR. Resultados similares fueron obtenidos en el estudio del grupo de Negrón et al., (2014) concluyendo que el estrés crónico en la adolescencia, conduce a una disminución de la transmisión sináptica excitatoria en la PL. Considerando que las neuronas excitatorias de las capas II y III de la PL regulan la actividad neuronal en la región IL, y estas en respuesta, modulan la transmisión GABAérgica en la BLA a través de las células intercaladas (Milad & Quirk, 2012), entonces la disminución inducida por estrés en la transmisión excitatoria de la PL, podría indirectamente reducir la actividad inhibitoria en la BLA y como resultado, alterar funciones cognitivas en ratas adolescentes estresadas (Negrón, et al., 2014).

Por otro lado, dado que la adolescencia es un período en el que el SeCB no está del todo maduro, sus respuestas frente al estrés difieren de las de un sistema adulto. En ese sentido, estudios en roedores en la etapa de adolescencia, han mostrado que estos exhiben reducidos mecanismos de retroalimentación negativa a glucocorticoides y prolongada secreción de CORT en respuesta a estrés

agudo, y no evidencian respuestas de habituación de CORT al estrés repetido (Romeo et al., 2006; Doremus-Fitzwater et al., 2009; Barha et al., 2011; Lee & Hill, 2013).

Un estudio en ratas adolescentes Sprague-Dawley, que utilizó un tratamiento con AM251 durante 10 días, encontró que este no tuvo efecto en la respuesta aguda al estrés del eje HPA, pero sí llevó a la habituación en la secreción de CORT en respuesta al estrés por restricción repetido (Lee et al., 2015). Adicionalmente, demostraron un aumento basal de AEA a nivel hipotalámico, luego del tratamiento con AM251, que promovería mayor retroalimentación negativa sobre la habituación del eje HPA, resultando así en niveles de respuesta más bajos de CORT frente al estrés repetido (Lee et al., 2015). Esta hipótesis es consistente con el rol de la señalización del receptor CB₁ en el NPV para facilitar la retroalimentación negativa del eje HPA (Di et al., 2003; Evanson et al., 2010). Similarmente, este grupo demostró que el tratamiento con AM251, incrementa la expresión del receptor CB₁ en la CPF al ser medido en animales adultos. Dada la importancia de esta área para la inhibición de la secreción de CORT inducida por estrés (Hill et al., 2011), el incremento en la expresión de CB₁, inducido por el tratamiento adolescente con AM251, puede contribuir al efecto de habituación de la CORT.

En el contexto de los resultados obtenidos en esta tesis, esto podría explicar que animales adolescentes tratados con vehículo, al tener una reducida retroalimentación negativa de CORT (una condición dependiente de la edad) y por ende, una elevada secreción de esta hormona ante el estrés agudo de las inyecciones, ven alterada la señalización de su SeCB y en consecuencia, se ven expuestos a la desregulación del eje HPA, que lleva a las alteraciones antes mencionadas, producto del estrés crónico. Sin embargo, el tratamiento con AM251, permite mantener una respuesta controlada frente al estrés agudo, y logra la habituación al estrés crónico por restricción, proceso que no ocurre en aquellos tratados con vehículo. Esto explicaría, al menos en parte, el efecto positivo del tratamiento con AM251, que logra contrarrestar los efectos del estrés crónico en la adolescencia.

Es importante considerar además que el SeCB se encuentra en proceso de desarrollo en la adolescencia. El peak de expresión de CB₁ en roedores machos, en varias regiones corticolímbicas, ocurre en los inicios de la adolescencia (DPN 30) y luego gradualmente disminuyen a niveles adultos hasta el DPN 70 (Heng et al., 2011; Rodriguez de Fonseca et al., 1993; Lee et al., 2015). Simultáneamente, el contenido de AEA y la actividad de la FAAH, fluctúan dinámicamente a través del período que transcurre entre la adolescencia a la adultez (Wenger et al., 2002; Ellgreen et al., 2008; Lee et al., 2013; Rubino et al., 2015; Lee et al., 2015).

Así, las perturbaciones de esas fluctuaciones normales en la señalización eCB puede comprometer procesos del neurodesarrollo, resultando en sostenidos cambios en el cerebro adulto (Rubino et al., 2015; Lee et al., 2015). Recientemente, esos efectos han sido atribuidos a la posibilidad de que el exceso de exposición a eCB durante la adolescencia, dependientes de CORT en condiciones de estrés crónico, altere la señalización eCB en proceso de maduración, a través de la desensibilización del sistema, y sea esta interrupción, quien media los efectos adversos de la excesiva exposición a eCB durante la adolescencia, en condiciones de estrés crónico (Rubino et al., 2015, Lee et al., 2015). Nuevamente, AM251 estaría de alguna forma, previniendo esta desensibilización y protegiendo al individuo de los efectos del estrés crónico.

VI. CONCLUSIONES

El estrés crónico por restricción de movimiento, aplicado durante una semana en ratas adolescentes, fue suficiente para deteriorar la toma de decisiones y la atención auditiva, con respecto a los sujetos controles. Adicionalmente, el estrés crónico generó una disminución en la ganancia de peso con respecto a los individuos controles, así como también llevó a la hipertrofia de las glándulas adrenales. Todas estas alteraciones, fueron contrarrestadas por el tratamiento con AM251, un antagonista del receptor CB₁.

Estos resultados nos confirman que el cerebro es altamente sensible a los efectos del estrés crónico durante la adolescencia, particularmente en aquellas áreas cerebrales que maduran más tardíamente, como lo es la CPF. A su vez, nos demuestra el importante rol que cumple el SeCB en modular las respuestas frente al estrés, y al mismo tiempo, que en la adolescencia este sistema también es altamente vulnerable a los efectos del estrés crónico.

En consecuencia, es imperativo que se generen más estudios con respecto al funcionamiento normal del SeCB y su relación con el eje HPA en la adolescencia, así como también en relación a la desregulación que ocurre producto del estrés crónico y sus deletéreas consecuencias que incluso, podrían extenderse hasta la adultez.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Adriani, W., Laviola, G., 2004. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behavioral Pharmacology* 15, 341-352.
2. American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed). Washington, DC: Author.
3. Andersen S L (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27: 3-18.
4. Auclair N., Otani S., Soubrie P., Crepel F (2000). Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83(6): 3287-3293.
5. Baddeley A (1998). The central executive: a concept and some misconceptions. *Journal of the International Neuropsychological Society* 4: 523–526.
6. 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: 65–73.
7. Barha CK, Brummelte S, Lieblich SE, Galea LA (2011). Chronic restraint stress in adolescence differentially influences hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and adult hippocampal neurogenesis in male and female rats. *Hippocampus* 21: 1216-1227.
8. Bechara A, Tranel D, Damasio, H (2000). Characterization of the decision-making deficit of patients with ventromedial prefrontal cortex lesions. *Brain* 123: 2189-2202.
9. Bechara A, Van Der Linden M (2005). Decision-making and impulse control after frontal lobe injuries. *Current Opinion Neurology* 18: 734–739.
10. Birrell JM, & Brown VJ (2000). Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *The Journal of Neuroscience*, 20 (11): 4320-4324.

11. Bodor AL, Katona I, Nyíri G, Mackie K, Ledent C, Hájos N, Freund TF (2005). Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *Journal of Neuroscience*. 25: 6845–6856.
12. Brown SM, Henning S, Wellman CL (2005). Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*;15: 1714–22.
13. Buwalda B, Geerdink M, Vidal J, Koolhaas JM (2011) Social behavior and social stress in adolescence: a focus on animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1713–1721.
14. Campolongo P, Trezza V, Ratano P, Palmery M, Cuomo V (2011). Developmental consequences of perinatal cannabis exposure: behavioral and neuroendocrine effects in adult rodents. *Psychopharmacology (Berl)* 214: 5–15.
15. Casey BJ, Castellanos FX, Giedd JN, Marsh WL, Hamburger SD, Schubert AB, Vauss YC, Vaituzis AC, Dickstein DP, Sarfatti SE, Rapoport JL (1997). Implication of right frontostriatal circuitry in response inhibition and attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Academy Child Adolescence Psychiatry* 36: 374–383.
16. Casey BJ, Jones RM (2010). Neurobiology of the adolescent brain and behavior. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 49: 1189-1285.
17. Castellanos FX, Giedd JN, Marsh WL, Hamburger SD, Vaituzis AC, Dickstein DP, Sarfatti SE, Vauss YC, Snell JW, Lange N, Kaysen D, Krain AL, Ritchie GF, Rajapaske JC, Rapoport JL (1996). Quantitative brain magnetic resonance imaging in attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 53: 607–616.
18. Champagne DL, de Kloet ER, Joëls M (2009). Fundamental aspects of the impacts of glucocorticoids on the (immature) brain. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 14: 136-142.
19. Chiu CQ, Puente N, Grandes P, Castillo PE (2010). Dopaminergic Modulation of Endocannabinoid-Mediated Plasticity at GABAergic Synapses in the Prefrontal Cortex. *Journal of Neuroscience*. 30: 7236–7248.
20. Cohen M, Solowij N, Carr V (2008). Cannabis, cannabinoids and schizophrenia: integration of the evidence. *Aust N Z J Psychiatry* 42: 357–368.

21. Cook S & Wellman CL (2004). Chronic Stress Alters Dendritic Morphology in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Neurobiology* 60: 236-248.
22. Dahl RE (2004). Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann N Y Acad Sci*; 1021: 1–22.
23. Damasio AR (1994). Descartes' error and the future human life. *Sci Am.* 271 (4): 144.
24. Damasio H, Grabowski T, Frank R, Galaburda AM, Damasio AR (1994). The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science* 264: 1102-1105.
25. 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. *Neuropsychopharmacol Rev* 2010; 35:105–35.
26. Davis M (1998). Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety. *Biol Psychiatry*; 44: 1239–47.
27. DeFelipe J (1997). Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat.* 14(1): 1-19.
28. Delatour B, Gisquet-Verrier P (1996). Prelimbic cortex specific lesions disrupt delayed-variable response tasks in the rat. *Behavioral Neuroscience* 110:1282–1298.
29. Delatour B, Gisquet-Verrier P (2000). Functional role of rat prelimbic- infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. *Behav Brain Res* 109: 113–128.
30. Di Marzo V (2008). CB₁ receptor antagonism: biological basis for metabolic effects. *Drug discovery today* 13:23-24.
31. Di SH, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker J G (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *Journal of Neuroscience* 23: 4850-4857.

32. Di SH, Popescu R, Tasker J (2013). Glial Control of Endocannabinoid Heterosynaptic Modulation in Hypothalamic Magnocellular Neuroendocrine Cells. *The Journal of Neuroscience*, 33(46): 18331–18342.
33. Donnelly NA, Holtzman T, Rich PD, Nevado-Holgado AJ, Fernando AB, Van Dijck G, Holzhammer T, Paul O, Ruther P, Paulsen O, Robbins TW, Dalley JW (2014). Oscillatory activity in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens correlates with impulsivity and reward outcome. *PloS one* 9 (10).
34. Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP (2009). Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiol. Behav.* 97: 484–494.
35. Dow-Edwards D & Lindsay S (2016). Endocannabinoids in brain plasticity: cortical maturation, HPA axis function and behavior. *Brain Research*.
36. Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR (2003). Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB1 cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience* 119: 481–496.
37. Eggan SM, Hashimoto T, Lewis DA. 2008. Reduced cortical cannabinoid 1 receptor messenger RNA and protein expression in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 65: 772–784.
38. Eiland L, Ramroop J, Hill MN, Manley J, McEwen BS (2012). Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*; 37(1): 39–47.
39. Ellgren M, Artmann A, Tkalych O, Gupta A, Hansen HS, Hansen SH, Devi LA, Hurd YL (2008). Dynamic changes of the endogenous cannabinoid and opioid mesocorticolimbic systems during adolescence: THC effects. *European Neuropsychopharmacology* 18: 826-834.
40. Evanson NK, Tasker JG, Hill MN, Hillard CJ, Herman JP (2010). Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology* 151: 4811-4819.
41. Evenden JL (1999). Varieties of impulsivity. *Psychopharmacology (Berl)* 146: 348–361.

42. Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, Sonagli M, Borgers C, Araujo P, Andersen ML, Tufik S, Lima MM (2011). Chronic ω -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behav Brain Res* 219: 116–122.
43. Filipek PA, Semrud-Clikeman M, Steingard RJ, Renshaw PF, Kennedy DN, Biederman J (1997). Volumetric MRI analysis comparing subjects having attention-deficit hyperactivity disorder with normal controls. *Neurology* 48: 589–601.
44. Foilb AR, Lui P, Romeo RD (2011). The transformation of hormonal stress responses throughout puberty and adolescence. *J Endocrinol*; 210 (3): 391–398.
45. Fortin & Levine (2007). Differential effects of endocannabinoids on glutamatergic and GABAergic inputs to layer 5 pyramidal neurons. *Cereb Cortex* 17(1): 163-174.
46. Fuster JM (1997). *The prefrontal cortex*. Lippincott-Raven, New York.
47. Galarreta M, Erdelyi F, Szabo G, Hestrin S (2004). Electrical coupling among irregular-spiking GABAergic interneurons expressing cannabinoid receptors. *J Neuroscience* 24: 9770–9778.
48. Gárate M (2013). Efecto antiestrés de un antagonista del receptor de endocanabinoide tipo 1. Tesis de Licenciatura, Universidad de Valparaíso, Chile.
49. Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM (2004). Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 8174-8179.
50. Goldman-Rakic, PS (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron* 14: 477–485.
51. Goldstein D, McEwen B (2002). Allostasis, homeostat, and nature of stress. *Stress* 5(1): 55–58.
52. Gorzalka, B, Hill MN, Hillard CJ (2008). Regulation of endocannabinoid signaling by stress: Implications for stress-related affective disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32: 1152–1160.
53. Gorzalka B, Hill M (2009). Integration of endocannabinoid signaling into the neural network

regulating stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Curr Top Behav Neurosci* 1: 289–306.

54. Groenewegen & Uylings (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Progress in Brain Research*, Vol 126.
55. Guerry J & Hastings P (2011). In search of HPA axis dysregulation in child and adolescent depression. *Clin Child Fam Psychol Rev* 14: 135–160.
56. Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Tanimura A, Kita Y, Sano Y, Shimizu T, Di Marzo V, Kano M (2013). Acute inhibition of diacylglycerol lipase blocks endocannabinoid-mediated retrograde signalling: evidence for on-demand biosynthesis of 2-arachidonoylglycerol. *J Physiol* 591.19: 4765-4776.
57. Heng L, Beverley JA, Steiner H, Tseng KY (2011). Differential developmental trajectories for CB₁ cannabinoid receptor expression in limbic/associative and sensorimotor cortical areas. *Synapse* 65: 278-286.
58. Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., Rice, K. C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *Journal of Neuroscience* 11, 563-583.
59. Herman JP, Prewitt CM, Cullinan WE (1996). Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit Rev Neurobiol* 10: 371–394.
60. Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai, Y, Ostander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamic-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* 24: 151–180.
61. Hill EL, Gallopin T, Ferezou I, Cauli B, Rossier J, Schweitzer P, Lambolez B (2007). Functional CB₁ receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurophysiol*, 97: 2580–2589.
62. Hill MN & McEwen BS (2009). Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioral effects of stress and glucocorticoids. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 34:791–797.

63. Hill MN & McEwen BS (2010). Involvement of the Endocannabinoid System in the Neurobehavioral Effects of Stress and Glucocorticoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34(5): 791–797.
64. Hill MN, Patel S, Campolongo P, Tasker J, Wotjak C, Bains J (2010). Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *J Neurosci* 30: 14980–14986.
65. Hill MN, McLaughlin RJ, Pan B, Fitzgerald ML, Roberts CJ, Lee TT, Karatsoreos IN, Mackie K, Viau V, Pickel VM, McEwen BS, Liu QS, Gorzalka BB, Hillard CJ (2011). Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *Journal of Neuroscience* 3: 10506–10515.
66. Hill MN & Tasker JG (2012). Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience* 204: 5-16.
67. Holmes A & Wellman CL (2009). Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 33: 773–783.
68. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54(2): 161-202.
69. Lafourcade M., et al (2007). Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS One* 2(8): e709.
70. Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A (2006). Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J. Neuroscience* 26: 5733–5738.
71. Johnson SB, Blum RW, Giedd JN (2009). Adolescent maturity and the brain: the promise and pitfalls of neuroscience research in adolescent health policy. *J Adolesc Health* 45: 216–221.
72. Kim J & Alger BE (2010). Reduction in endocannabinoid tone is a homeostatic mechanism for specific inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 13: 592–600.
73. Klein ZA, Romeo RD (2013). Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal stress responsiveness before and after puberty in rats. *Hormones and Behavior* 64: 357-363.

74. Lee TT & Gorzalka BB (2012). Timing is everything: evidence for a role of corticolimbic endocannabinoids in modulating hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity across developmental periods. *Neuroscience* 204: 17-30.
75. Lee TT & Hill MN (2013). Age of stress exposure modulates the immediate and sustained effects of repeated stress on corticolimbic cannabinoid CB₁ receptor binding in male rats. *Neuroscience* 249: 106–114.
76. Lee TT, Hill MN, Hillard CJ, Gorzalka BB (2013). Temporal changes in N- acylethanolamine content and metabolism throughout the peri-adolescent period. *Synapse* 67: 4-10.
77. Lee TT, Hill MN, Hillard CJ, Gorzalka B (2015). Disruption of peri-adolescent endocannabinoid signaling modulates adult neuroendocrine and behavioral responses to stress in male rats. *Neuropharmacologic*. Doi: 20.1016/ 2015.07.021
78. Lewis EM, Barnett JF, Freshwater L, Hoberman AM, Christian MS (2002). Sexual maturation data for Crl Sprague-Dawley rats: criteria and confounding factors. *Drug Chem Toxicol*; 25(4): 437–58.
79. Lisman JE, Fellous JM, Wang XJ (1998). A role for NMDA-receptor channels in working memory. *Nat. Neurosci. 1*: 273–275.
80. Llorente-Berzal A, Fuentes S, Gagliano H, López-Gallardo M, Armario A, Viveros MP, Nadal R (2011). Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addict Biol* 16: 624–637.
81. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10: 434–445.
82. McCormick CM, Mathews IZ, Thomas C, Waters P (2010). Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain Cogn*; 72(1): 73–85.
83. McEwen B (1992) Steroid hormones: effect on brain development and function. *Horm Res* 37:1-10
84. McEwen BS (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.* 87: 873–904.

85. McLaughlin R, Hill M, Gorzalka B (2014). A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 42: 116–131.
86. Milad MR, Quirk GJ (2002). Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420: 70-74.
87. Milad MR, Quirk GJ. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu Rev Psychol.* 2012;63:129-51.
88. Mitra R, Sapolsky RM (2008). Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci* 105: 5573-5578.
89. Mostofsky SH, Cooper KL, Kates WR, Denckla MB, Kaufmann WE (2002). Smaller prefrontal and premotor volumes in boys with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 52: 785–794.
90. Negrón-Oyarzo I, Pérez MA, Terreros G, Muñoz P, Dagnino-Subiabre A (2014). Effects of chronic stress in adolescence on learned fear, anxiety, and synaptico transmission in the prelimbic cortex. *Behavioural Brain Research* 259: 342-353.
91. Ojeda SR, Skinner MK (2006). Puberty in the rat. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Physiology of Reproduction*. St. Louis, MO: Elsevier Academic Press. p. 2061–2126.
92. Patton GC, Coffey C, Carlin JB, Degenhardt L, Lynskey M, Hall W (2002). Cannabis use and mental health in young people: cohort study. *BMJ* 325:1195–1198.
93. Paxinos & Watson (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier 6^a Edición.
94. Pérez MA, 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* 246: 94-107.
95. Pertwee RG (2004). Novel pharmacological targets for cannabinoids. *Current Neuropharmacology* 2: 9–29.

96. Peters A, Schweiger U, Pellerin (2004). The selfish brain: competition for energy resources. *Neurosci Biobehav Rev.* 28:143–80.
97. Piomelli D (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neuroscience* 4: 873–884.
98. Pruessner JC, Baldwin MW, Dedovic K, Renwick R, Mahani NK, Lord C, Meaney M, Lupien S (2005). Self-esteem, locus of control, hippocampal volume, and cortisol regulation in young and old adulthood. *Neuroimage* 28: 815–26.
99. Pueyo R, Maneru C, Vendrell P, Mataro M, Estevez-Gonzalez A, Garcia-Sanchez C (2000). Attention deficit hyperactivity disorder. Cerebral asymmetry observed on magnetic resonance. *Rev Neurol* 30: 920–925.
100. Rademacher DJ, Meier SE, Shi L, Ho WS, Jarrachian 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.
101. Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2004). Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 125: 1–6.
102. Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE (2009). A Discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *The Journal of Neuroscience*, 29: 7330 –7340.
103. Radley JJ, Anderson RM, Hamilton BA, Alcock JA, Romig-Martin SA (2013). Chronic Stress-Induced Alterations of Dendritic Spine Subtypes Predict Functional Decrements in an Hypothalamo–Pituitary–Adrenal-Inhibitory Prefrontal Circuit. *The Journal of Neuroscience* 33(36): 14379 –14391.
104. Raz A (2004). Anatomy of attentional networks. *Anatomical record. Part B, New Anatomist* 281: 21-36.
105. Reznikov LR, Grillo CA, Piroli GG, Pasumarthi RK, Reagan LP, Fadel J (2007). Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of

- antidepressant treatment. *Eur J Neurosci*; 25: 3109–14.
106. Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol and alcoholism* 40: 2-14.
 107. Rodriguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnin A, Fernández-Ruiz JJ (1993). Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal stages. *Neuroreport* 4: 135-138.
 108. Romeo RD, Bellani R, Karatsoreos IN, Chhua N, Vernov M, Conrad CD, McEwen BS (2006). Stress History and Pubertal Development Interact to Shape Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Plasticity. *Endocrinology* 147(4): 1664–1674.
 109. Romeo RD & McEwen BS (2006). Stress and the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci* 1094: 202-2014.
 110. Rubino T, Realini N, Braidà D, Alberio T, Capurro V, Viganò D, Guidali C, Sala M, Fasano M, Parolaro D (2009). The depressive phenotype induced in adult female rats by adolescent exposure to THC is associated with cognitive impairment and altered neuroplasticity in the prefrontal cortex. *Neurotoxic Research* 15: 567- 607.
 111. Rubino T, Prini P, Piscitelli F, Zamberletti E, Trusel M, Melis M, Sagheddu C, Ligresti A, Tonini R, Di Marzo V, Parolaro D (2015). Adolescent exposure to THC in female rats disrupts developmental changes in the prefrontal cortex. *Neurobiology of Disease* 73: 60-69.
 112. Sapolsky RM & Meaney M (1986). Maturation of the adrenocortical stress response, neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev* 11: 65–76.
 113. Sapolsky R.M, Romero LM, Munck AU (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21: 55–89.
 114. Scherer IJ, Holmes PV, Harris RB (2010). The importance of corticosterone in mediating restraint-induced weight loss in rats. *Physiol Behav* 102 (2): 225-233.

115. Scherer IJ, Holmes PV, Harris RB. 2011. The importance of cortico-sterone in mediating restraint-induced weight loss in rats. *Physiol Behav.* 102(2):225–233.
116. Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG (1995). Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research Neuroscience* 109: 1063–1073.
117. Selye H (1936). A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 138: 32-32.
118. Smith SM & Vale WW (2006). The role of the hypothalamic–pituitary– adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci* 8: 383–395.
119. Spear LP (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience Biobehavioral Review*;24(4): 417–63.
120. Spear LP (2007) The psychobiology of adolescence. In: Kline K, editor. *Authoritative Communities: The Scientific Case for Nurturing the Child (The Search Institute Series on Developmentally Attentive Community and Society)*. New York, NY: Springer. p. 263–80.
121. Stuss DT & Alexander MP (2000). Executive functions and the frontal lobes: a conceptual view. *Psychological Research* 63(3-4): 289-298.
122. Tafet GE & Bernardini R., 2003. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(6); 893–903.
123. Uhlhass PJ., et al (2009). The development of neural synchrony reflects late maturation and restructuring of functional networks in humans. *Proc Natl Acad Sci* 106(24): 9866-9871.
124. Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP (2006). Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E965-E973.
125. Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10: 397–409.
126. Vertes (2004). Differential projections of the Infralimbic and Prelimbic cortex in the rat. *Snaps* 51: 32–58.

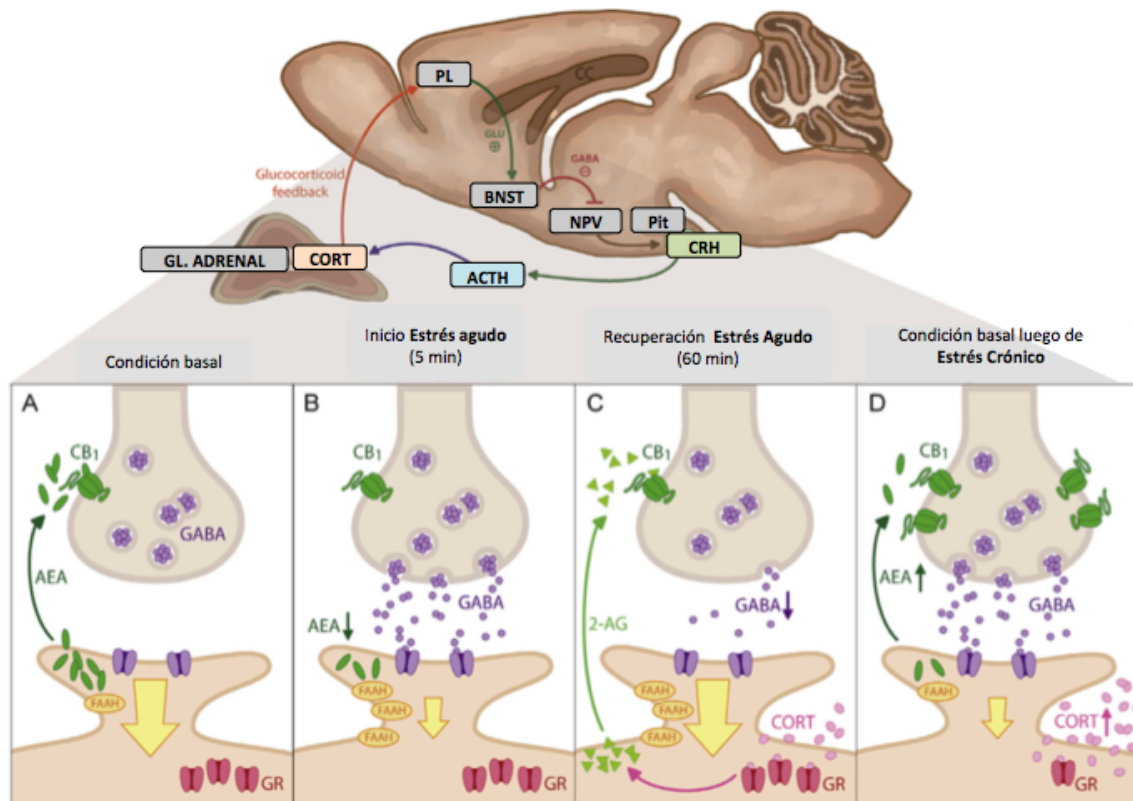
127. Viveros MP, Marco EM, File SE (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 331–342.
128. Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22: 6810–8.
129. Vyas A, Bernal S, Chattarji S (2003). Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Res*; 965: 290–4.
130. 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.
131. Wedzony K & Chocyk A (2009). Cannabinoid CB₁ receptors in rat medial prefrontal cortex are colocalized with calbindin- but not parvalbumin- and calretinin- positive GABAergic neurons. *Pharmacol. Rep.* 61: 1000–1007.
132. Wenger T, Gerendai I, Fezza F, González S, Bisogno T, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V (2002). The hypothalamic levels of the endocannabinoid, anandamide, peak immediately before the onset of puberty in female rats. *Life Sciences* 70: 1407-1414.
133. Xie S, Furjanic MA, Ferrara JJ, McAndrew NR, Ardino EL, Ngondara A, Bernstein Y, Thomas KJ, Kim E, Walker JM, Nagar S, Ward SJ, Raffa RB (2007). The endocannabinoid system and rimonabant: a new drug with a novel mechanism of action involving cannabinoid CB₁ receptor antagonism – or inverse agonism – as potential obesity treatment and other therapeutic use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 32, 209-231.
134. Yeon J, Hoon D, Soo S (2013). Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. *Endocrinol Metab* 28: 288-296.
135. Yuen EY, Wei J, Liu W, Zhong P, Li X, Yan Z (2012). Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron*;873 (5) :962–77.
136. Zhang W & Rosenkranz (2012). Repetead restraint stress increases basolateral amygdala neuronal activity in an age-dependent manner. *Neuroscience* 226: 459–474.

VIII. ANEXOS

Tabla N° 1: Grupos experimentales y tratamientos.

GRUPOS EXPERIMENTALES		
	No estresados	Estresados
TRATAMIENTO	Control (n =6)	Control (n =6)
	Vehículo (n = 6)	Vehículo (n = 6)
	AM251 (n = 6)	AM251 (n = 6)

Figura 1: Corteza prelámbica, sistema endocanabinoide y su relación con el estrés.

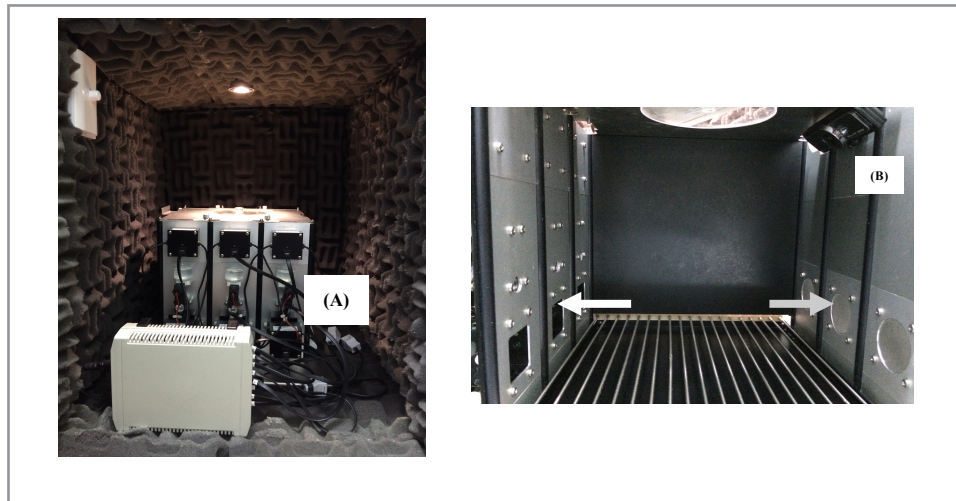


(Traducido de McLaughlin R., Hill M., Gorzalka B. 2014)

Panel superior: El núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo se activa liberando factor liberador de corticotropina (CRF) hacia la pituitaria anterior (Pit), estimulando la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH) al torrente sanguíneo. La ACTH induce la liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos, corticosterona en roedores) en la corteza adrenal, pasando a la circulación general. Los glucocorticoides (CORT) cruzan la barrera hematoencefálica y se unen a receptores de CORT localizados en la región prelímbica (PL) de la CPFm (así como de otras regiones, no mostradas). La activación de esas neuronas de retroalimentación inhibitorias estimula la activación de centros de relevo GABAérgicas en la amígdala extendida (BNST), que directamente inhiben la activación del NPV, promoviendo en consecuencia la terminación del eje HPA y una adecuada recuperación frente al estrés.

Panel inferior: Modelo teórico que destaca el mecanismo por el cual, alteraciones en la señalización de eCB en la CPFm, modula la actividad de las neuronas piramidales bajo condiciones de estrés agudo y crónico. **(A)** Bajo condiciones basales, la señalización de AEA se encuentra tóxicamente elevada, suprimiendo la inhibición, mediada por GABA, de las neuronas piramidales. **(B)** Inmediatamente después del inicio del estrés, la AEA disminuye por actividad de degradación de la enzima FAAH, permitiendo el incremento de GABA, la reducción de la actividad de las neuronas piramidales y la consiguiente respuesta neuroendocrina y conductual. **(C)** Después del cese del estrés, la CORT se une a receptores de glucocorticoides intracelulares (GR), llevando a la síntesis de 2-AG que se une a receptores presinápticos CB₁. Esto reduce la inhibición mediada por GABA en las neuronas piramidales que proyectan al BNST, que inhibe directamente al NPV, resultando finalmente en la terminación del eje HPA y el restablecimiento de la homeostasis. **(D)** Bajo condiciones de estrés crónico, la CORT está hipersecretada, los receptores de glucocorticoides están regulados a la baja y los sitios de unión del receptor CB₁ están incrementados. La AEA está persistentemente reducida, resultando en una mayor inhibición mediada por GABA, suprimiendo así la normal actividad de las neuronas piramidales, tornando la CPFm a un estado de baja actividad continua.

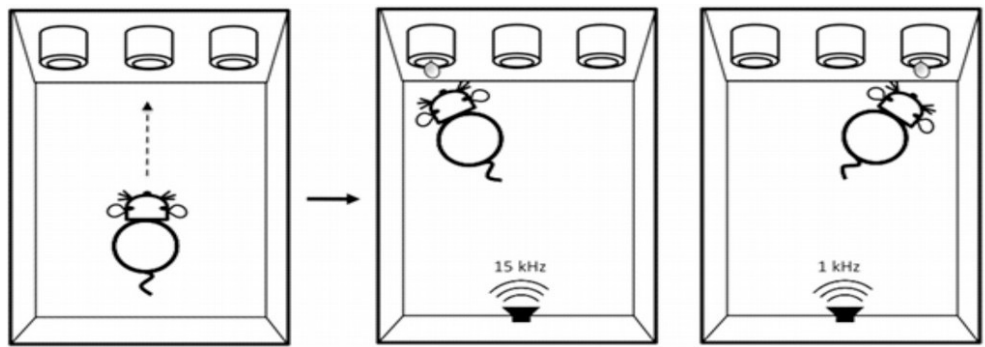
Figura 3: Caja de entrenamiento del paradigma conductual TEDA, para cuantificar atención auditiva y toma de decisiones.



La caja de entrenamiento consta de:

- a) Cámara operante utilizada para cuantificar la atención auditiva en las ratas y la toma de decisiones. Esta cámara se encuentra en una caja aislada acústicamente.
- b) Cámara web en el interior de la caja operante, que registra la actividad realizada por las ratas. La flecha blanca indica los pocillos donde debe introducir el hocico para iniciar la prueba y recibir la recompensa. La flecha gris indica los parlantes que emiten los tonos.

Figura 4: Paradigma conductual TEDA.



Consiste básicamente en:

- c) La rata decide introducir su hocico en el puerto central; con esto se da inicio a la prueba.
- d) El sistema emite un tono al azar, que puede ser de alta frecuencia (15 kHz) o de baja frecuencia (1kHz), los cuales se encuentran asociados al puerto izquierdo y derecho, respectivamente.
- e) La rata aprende la asociación entre el lado de la caja asociado a cada tono, recibiendo una recompensa cuando su respuesta es correcta. La recompensa corresponde a una gota de agua.