



FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIA

**EFECTO DEL ESTRES CRONICO SOBRE LA DENSIDAD DE
CELULAS POSITIVAS PARA PARVALBUMINA EN LA CORTEZA
AUDITIVA DE RATAS**

CELINDO GONZALEZ ASTUDILLO

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

Director de Tesis:

**Prof. Dr. Alexies Dagnino Subiabre
Universidad de Valparaíso
2017**

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a mi familia, en especial a mi madre, siempre con su apoyo incondicional. A mis amigos y compañeros del laboratorio en estos largos años del magister, sin los cuales habría sido muy difícil sobrellevar el desafiante y exigente trabajo académico y experimental. A todos con los que compartí durante esta época de crecimiento personal e intelectual, German Campos, Macarena, Catherine, Marcela, Valentín, Ann, Marcia, German, Meli, Pao, Mauricio, Hernán, Valentina y todos aquellos con los que compartí y contribuyeron a la realización de esta tesis.

Agradecimiento en especial al profesor Alexies por haberme acogido en su laboratorio y por toda su dedicación para poder llevar a buen puerto este proceso. A los profesores de la comisión Marco y Agustín por su tiempo y pronta corrección de esta tesis.

FINANCIAMIENTOS

Esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de:

- FONDECYT Regular 1141276
- Anillo de Ciencia y Tecnología N° ACT1403
- 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. Respuesta fisiológica al estrés.....	9
2. Efectos del estrés crónico en el sistema auditivo.....	10
3. Neuronas GABAérgicas parvalbumina.....	11
4. Neuronas PV+ en la corteza auditiva.....	12
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
1. Hipótesis.....	13
2. Objetivo general.....	13
3. Objetivos específicos.....	13
III. METODOLOGÍA.....	14
1. Bienestar animal.....	14
2. Animales de experimentación.....	14
3. Estrés crónico impredecible.....	14
4. Diseño experimental.....	14
5. Ganancia de peso.....	15
6. Corticosterona plasmática.....	15
7. Prueba de campo abierto.....	16
8. Laberinto en cruz elevado.....	16
9. Prueba de interacción social.....	17
10. Ingesta de sacarina.....	17
11. Nado forzado.....	18
12. Inmunohistoquímica de PV+.....	18
13. Cuantificación de neuronas PV+.....	19
14. Análisis estadístico.....	20
IV. RESULTADOS.....	21
1. Efecto del CUS sobre los marcadores fisiológicos del Estrés.....	21

1.1 Ganancia de Peso.....	21
1.2 Niveles plasmáticos de corticosterona.....	22
2. Efecto del CUS en Pruebas Conductuales.....	23
2.1 Actividad locomotora en Campo Abierto.....	23
2.2 Conductas tipo ansiosas en Campo Abierto.....	25
2.3 Conductas tipo ansiosas en Laberinto Elevado en Cruz.....	26
2.4 Conductas similares a la depresión en la prueba de nado forzado.....	27
2.5 Prueba de interacción social y consumo de sacarina.....	28
3. Efecto del CUS sobre la densidad de neuronas PV+.....	29
4. Correlación entre la densidad de PV+ y niveles de corticosterona.....	34
V. DISCUSIÓN.....	35
1. Respuesta exacerbada del eje HPA en el estrés crónico impredecible	35
2. Actividad locomotora en animales expuestos a estrés crónico impredecible	36
3. Conductas similares a la ansiedad en animales expuestos a CUS	36
4. Conductas similares a la depresión observadas en animales expuestos a CUS.....	36
5. Influencia del CUS en la densidad de células PV+.....	37
VI. CONCLUSIONES.....	40
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	41
VIII. ANEXOS.....	48

TABLA DE ABREVIATURAS

A1	Corteza auditiva primaria
ACTH	Hormona Adenocorticotropa
CG	Glucocorticoides
CRF	Factor Liberador de Corticotrofina
CUS	Estrés crónico impredecible
GABA	Acido γ -aminobutírico
HPA	Hipotalámico-Pituitario-Adrenal
IC	Colículo inferior
L-HPA	Sistema Límbico-Hipotalámico-Pituitario-Adrenal
MG	Geniculado mediano
NPV	Núcleo paraventricular
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehido
PND	Día postnatal
PV	Parvalbumina
SAN	Sistema Simpático-Adrenérgico-Noradrenérgico
μ L	Microlitros

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Efecto del CUS en la ganancia de peso de ratas.....	22
Figura 2: Niveles plasmáticos de corticosterona en ratas después de 14 días de CUS.....	23
Figura 3: Efecto del CUS en la actividad locomotora en la prueba de campo abierto.....	25
Figura 4: Efecto del estrés crónico impredecible sobre las conductas tipo ansiosas en el el Campo Abierto.....	25
Figura 5: Efecto del estrés crónico impredecible sob.re las conductas tipo ansiosas en el laberinto elevado en cruz.....	26
Figura 6: Efecto del estrés crónico impredecible sobre las conductas similares a la depresión en la prueba de nado forzado.....	27
Figura 7a: Efecto del estrés crónico impredecible sobre la conducta de interacción social.....	28
Figura 7b: Efecto del estrés crónico impredecible sobre la preferencia por sacarina.....	28
Figura 8: Efecto del CUS en la densidad de PV+ a en la corteza auditiva primaria.....	29
Figura 9: Efecto del CUS en la densidad de PV+ en la capa 2/3 de la A1.....	30
Figura 10: Efecto del CUS en la densidad de PV+ en la capa 4 de la A1.....	31
Figura 11: Efecto del CUS en la densidad de PV+ en la capa 5 de la A1.....	32
Figura 12: Efecto del CUS en la densidad de PV+ en la capa 6 de la A1.....	32
Figura 13: Efecto del CUS en la densidad PV+ en la corteza visual primaria.....	33
Figura 14: Correlación entre los niveles de corticosterona plasmática y la densidad de PV+ en grupos control y CUS.....	34
Figura 15: Diseño experimental que se utilizará para los grupos experimentales.....	48
Figura 16: Microfotografía de una sección de cerebro mostrando neuronas PV+ y área magnificada de la corteza auditiva primaria (A1).....	48
Figura 17: Microfotografía de una sección de cerebro que muestra neuronas GABAergicas PV+ y las diferentes capas de la corteza auditiva primaria (A1).....	48

RESUMEN

El estrés crónico induce atrofia dendrítica y disminuye el tono inhibitorio en la corteza auditiva primaria (A1) de rata, lo cual se correlaciona con un deterioro en la atención auditiva. Las neuronas GABAérgicas predominantes en A1 son las neuronas positivas para parvalbumina (PV+), estas cumplen un importante rol en la sincronización entre A1 y la corteza frontal. En el hipocampo y la corteza prefrontal, las neuronas GABAérgicas-PV+ son susceptibles al estrés crónico. Por otro lado, en A1 este tipo de neuronas son susceptibles al envejecimiento, lo cual está correlacionado con un deterioro en el procesamiento auditivo. Todas estas evidencias sustentan la pregunta de investigación de esta tesis: ¿el estrés crónico afecta a las neuronas PV+ en A1?. Así, el objetivo de esta tesis fue determinar si el número de neuronas PV+ en A1 se reduce en ratas expuestas a un estrés crónico impredecible (CUS). El CUS se aplicó a ratas machos *Sprague-Dawley* adultos por 14 días y luego se determinó el número de las células PV+ en las diferentes capas de la corteza auditiva. Se observó una disminución significativa en la densidad de células que expresan PV en las capas V y VI de ratas que fueron expuestas al CUS. No hubo cambios en la densidad de células que expresan PV en las capas II, III y IV. Estos cambios sugieren una susceptibilidad específica por capas al estrés crónico. Las capas V y VI dan origen al sistema eferente cortico olivococlear en el sistema auditivo, que se cree tiene un rol fundamental en la atención auditiva. Su deterioro a causa del estrés crónico, podría explicarse en parte por la deficiencia funcional de las neuronas PV+ con la consiguiente pérdida del balance inhibitorio / excitatorio requerido para el normal funcionamiento cerebral.

SUMMARY

It has been shown that chronic stress induces dendritic atrophy and decreases the inhibitory tone at the rat primary auditory cortex (A1), as result auditory attention is impaired. The GABAergic neurons predominant in A1 are the positive neurons for parvalbumin (PV +), these neurons have a key role in the A1 and frontal cortex synchronization. In the hippocampus and prefrontal cortex, GABAergic-PV+ neurons are susceptible to chronic stress. On the other hand, this type of neuron in A1 are susceptible to aging, which is correlated with impairments in the auditory processing. Taken together, these evidences support the question of this thesis: ¿Does chronic stress affect the density of PV + cells at A1?. Thus, the objective was to determine whether chronically unpredictable stress (CUS) affects the number of PV + neurons in A1. Male *Sprague-Dawley* rats were subjected to CUS for 14 days and density of PV + cells were determined in the different layers of the A1. Rats exposed to CUS had significant lower density of cells expressing PV in layers V and VI of the A1. CUS did not affect the density of PV + cells in layers II, III and IV. Layers V and VI give rise to the olivocochlear cortical efferent system in the auditory system, this system has a key role in auditory attention. These results suggest that less density of PV + cells induced by chronic stress could to affect the inhibitory / excitatory balance in A, which it is required for normal auditory attention.

I. INTRODUCCIÓN

1. *Respuestas fisiológicas al estrés*

El estrés es una reacción biológica compleja y común en todos los organismos, la cual permite la adaptación a las demandas del medio ambiente y el restablecimiento de la homeostasis (Selye, H, 1936, 1956). La exposición a una demanda del medioambiente (estresor) activa al sistema simpático-adrenérgico-noradrenérgico (SAN) y el sistema límbico-hipotalámico-pituitario-adrenal (L-HPA) (Ströhle y Holsboer, 2003). El eje L-HPA se activa cuando un organismo se enfrenta a un ambiente que es asimilado como aversivo, iniciándose con la activación del núcleo paraventricular (NPV) en el tálamo, que estimula la síntesis y liberación del factor liberador de corticotropina (CRF) hacia la hipófisis anterior o adenohipófisis, donde estimula la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) hacia la circulación sistémica (Smith y Vale, 2006). La ACTH estimula la síntesis y secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) desde la médula adrenal y glucocorticoides (CG) (cortisol en humanos) o corticosterona (ratas y ratones) (Ulrich Lai y Herman 2009), desde la corteza de las glándulas suprarrenales (Herman et al., 2003; Smith y Vale, 2006). Las catecolaminas aumentan la frecuencia cardíaca contribuyendo a movilizar la glucosa hacia los músculos estriados para desarrollar las respuestas de lucha y escape, mientras que los glucocorticoides activan la glucogenólisis hepática y el metabolismo neuronal (Herman et al., 2003), uniéndose en el cerebro a sus receptores (glucocorticoides y mineralcorticoides) localizados en áreas límbicas, como la amígdala, la corteza prefrontal y el hipocampo (Ströhle y Holsboer, 2003).

El estrés puede ser clasificado en dos tipos: el estrés positivo (eustrés) y negativo (distrés o estrés crónico). El primero se caracteriza por ser generado a través de un estresor que se percibe como leve, controlable y breve, y se generan respuestas adaptativas (Tafet y Bernardini, 2003). Mientras que el estrés crónico, implica un alto costo energético para el organismo, debido a que es más fuerte, incontrolable y duradero generando respuestas desadaptativas (Tafet y Bernardini, 2003). Cuando este último se hace presente, puede ocasionar consecuencias negativas en la salud, siendo uno de los principales factores de riesgo para desarrollar trastornos neuropsiquiátricos como la depresión (Tafet et al. 2004).

El estrés crónico deteriora el cerebro, por ejemplo, en el hipocampo el estrés crónico induce atrofia dendrítica en la región CA3 y deteriora la transmisión GABAérgica (Conrad y Wright, 2008; Holm et al., 2011). En la corteza prefrontal el estrés crónico disminuye la densidad de las espinas dendríticas y a su vez atrofia a las dendritas de neuronas piramidales de las capas II y III (Cook y Wellman, 2004; Radley et al., 2004; Liu y Aghajanian, 2008). Mientras que en la amígdala lateral el estrés crónico induce hipertrofia dendrítica de la neuronas estrellas, lo que se correlaciona con el aumento de la ansiedad que se presenta en animales de experimentación, cuando son sometidos a pruebas conductuales (Vyas et al., 2002, 2003).

2. Efectos del estrés crónico en el sistema auditivo

Los estudios sobre la neurobiología del estrés se han enfocado en el sistema límbico y la corteza prefrontal medial. Sin embargo, los efectos del estrés en el sistema límbico pueden extenderse a regiones no límbicas, afectando a sistemas sensoriales específicos (Dagnino-Subiabre, 2013). Ratas expuestas al estrés crónico presentan deterioro del

aprendizaje al miedo generado por estímulos auditivos y atrofia dendrítica en el colículo inferior (IC), principal núcleo del sistema auditivo (Dagnino-Subiabre et al., 2005, 2012). Además, el estrés crónico induce atrofia dendrítica en las neuronas magnocelulares del núcleo geniculado medial (MG, tálamo auditivo) y neuronas piramidales de las capas II / III y V / VI de la corteza auditiva primaria (Dagnino-Subiabre et al., 2009, Bose et al., 2010), lo cual se correlaciona con la disminución de la eficacia sináptica GABAérgica en la corteza auditiva y deterioro de la atención auditiva (Pérez et al., 2013). Un estudio reciente proporciona nueva evidencia que indica que el estrés crónico altera in vivo la actividad de los potenciales de campo locales en A1 de rata (Ma et al., 2017).

3. *Neuronas GABAérgicas PV+*

La parvalbúmina es una proteína similar a la albúmina que se une al calcio, esta proteína es parte de la familia hf-hand, las cuales parecen funcionar como reguladores fisiológicos en el control del exceso de Ca^{+2} citoplasmático (Dambolt, 2001). En el cerebro de rata, las neuronas que expresan parvalbumina (PV+) comprenden una población heterogénea de neuronas GABAérgicas (Celio 1986, 1990), principalmente en neuronas en candelabro y en cesta, y representan aproximadamente un 40% de las neuronas GABAérgicas (Xu et al., 2010). Las células en cesta tienen axones de largo alcance que se extienden horizontalmente, apuntando al perisoma y dendritas proximales de las células piramidales de diferentes minicolumnas (Lund y Lewis, 1993; DeFelipe, 1997). Las células en candelabro también proporcionan inhibición lateral, estableciendo conexiones sinápticas con los segmentos iniciales del axón de las células piramidales (Wang et al., 2000). Las neuronas PV+ se encuentran en todas las capas del neocórtex excepto la capa I, y son más numerosas en la región somatosensorial que en la corteza motora (van Brederode et al., 1991). Las neuronas PV+ están implicadas en el periodo crítico relacionado con la

plasticidad cortical, específicamente a nivel somatosensorial, visual y auditiva (Hensch et al., 1998; Fagiolini y Hensch, 2000, Hensch, 2004, 2005, Fox y Wong, 2005; Yuste, 2005) y tienen un rol crítico en el procesamiento de la información cortical (Tallon-Baudry et al., 1998; Bartos et al., 2017, Cardin et al., 2009, Sohal et al., 2009). La mayoría de las neuronas PV+ son de disparo rápido y controlan a nivel perisomático el disparo de potenciales de acción de las neuronas piramidales (Markram et al., 2004; Freund y Katona, 2007; Kawaguchi y Kubota, 1997). Además, las neuronas GABAérgicas que expresan parvalbúmina dan lugar a la actividad oscilatoria gamma de los potenciales de campo locales (LFP), las cuales se asocian a funciones cognitivas (Bartos et al., 2007). En varias enfermedades neuropsiquiátricas, la función de las neuronas PV+ parece estar alterada, incluyendo la esquizofrenia y la depresión, una enfermedad relacionada con el estrés crónico (Marin, 2012). En el hipocampo, el estrés crónico disminuye la concentración de GABA y el número de neuronas GABAérgicas PV+, esto sugiere que estas alteraciones podrían afectar la actividad oscilatoria de los LFP en ratas estresadas (Hu et al., 2010; Somogyi, 2005). En la corteza prefrontal medial, el estrés crónico reduce el número de neuronas GABAérgicas PV+ en el hemisferio derecho (Hu, 2010). Esta susceptibilidad de las neuronas GABAérgicas PV+ estaría determinada por su particular sensibilidad al estrés oxidativo (Behrens et al., 2007).

4. Neuronas PV+ en la corteza auditiva

En la corteza auditiva primaria las neuronas PV+ representan alrededor del 35% de las neuronas GABAérgicas (Ouellet et al., 2014) correspondiendo aproximadamente al 7% del número total de neuronas en A1 (McMullen et al., 1994). En modelos de roedor envejecido, se encontró una disminución en el número de neuronas GABAérgicas PV+ A1 (Del Campo et al., 2012).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En resumen, el estrés crónico puede inducir a una disminución en el número de neuronas PV+ en regiones del hipocampo y en la corteza prefrontal, y provocar déficit en la atención auditiva correlacionado con una disfunción en la actividad sináptica inhibitoria en la corteza auditiva. En consecuencia, estudiar los posibles efectos del estrés crónico sobre el sistema GABAérgico, en particular las neuronas PV+, es fundamental para comprender los mecanismos que subyacen al deterioro auditivo observado en modelos animales y en humanos. En este contexto se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Es posible que un estrés crónico impredecible pueda afectar el número de células PV+ en A1?

1. HIPÓTESIS

El estrés crónico impredecible disminuye el número de células PV+ en la corteza auditiva primaria de rata.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Estudiar el efecto del estrés crónico sobre los sistemas sensoriales, en particular sobre el sistema inhibitorio en la corteza auditiva.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Evaluar los marcadores fisiológicos y conductuales del CUS.
2. Determinar el número de células PV+ en A1 de ratas control y expuestas a CUS.
3. Correlacionar el número de células PV+ y los niveles de corticosterona.

III. METODOLOGÍA

1. Bienestar animal

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

2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas machos *Sprague-Dawley* de 59 días y de aproximadamente 300 g al inicio de los experimentos, pertenecientes al Laboratorio de Neurobiología y Conducta del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Estos animales fueron mantenidos en grupos de a tres en jaulas de acrílico transparente, bajo un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (luz encendida a las 8 am). Las ratas tuvieron acceso ad libitum de agua y comida (ACWS, N° catálogo: RMH 3000 LabDiet®, Santiago de Chile) en una habitación con temperatura y humedad controlada (20 ± 1 °C, 55 %). Cada grupo experimental estuvo compuesto por 6 ratas, estos fueron pesados diariamente con una balanza digital (modelo WLC2/A1, Radwag, Polonia).

3. Estrés crónico impredecible (CUS)

Las ratas fueron sometidas a un protocolo de estrés crónico impredecible (Jacinto et al., 2013), que consiste en exponerlas diariamente por 14 días consecutivos a varios estresores aplicados en diferentes horas del día por una hora, que incluye: movimiento de rotación (ángulo y velocidad), corriente de aire frío (entre 18 y 20 °C), restricción de movimiento y luz brillante.

4. Diseño Experimental

Las ratas fueron asignadas al azar formando los siguientes grupos experimentales: uno de ellos no fue sometido a ningún tipo de estrés (control) (n = 6) y el otro fue sujeto a un

protocolo de estrés crónico impredecible (CUS) (n = 6). El protocolo de estrés se aplicó desde el día postnatal (PND) 59 hasta día postnatal 72 (ver ANEXO, Figura 1). El día 73 PN se aplicó la prueba de laberinto de campo abierto y laberinto de cruz elevado. El día 74 PN se realizó la prueba de interacción social e ingesta de sacarina, y el día 75 PN la prueba de nado forzado. El día 76 los animales fueron eutanasiados bajo anestesia profunda usando isoflurano. Obtenidas las muestras de cerebro estas fueron procesadas y el día 84 PN se realizó el protocolo de inmunohistoquímica.

5. *Ganancia de peso*

Como marcador fisiológico del estrés se utilizó la medición de ganancia de peso de los animales a partir del día PN 59. Los animales se pesaron diariamente con una balanza (modelo WLC2/A1, Radwag, Polonia).

6. *Corticosterona plasmática*

Cada grupo experimental constó de 6 ratas. Primero se obtuvo una muestra basal de 60-70 uL de sangre de la cola del animal y recolectada en tubos heparinizados. Una segunda muestra se obtuvo después de que cada animal fuera sometido a un estrés agudo por restricción de movimiento por 30 minutos para estimular el eje HPA. Finalmente, después de 60 minutos se obtuvo una tercera muestra. Las muestras fueron centrifugadas a 6.000 rpm por 20 minutos a 4° C. El plasma fue congelado a -80° C y después analizado. La concentración de corticosterona se determinó con un Kit de inmunoensayo (Rat Corticosterone ELISA Kit, Catalog. #80554, Crystal Chem, USA). La densidad óptica fue medida a 450 nm usando un lector de microplaca (Tecan GENios, Männedorf, Switzerland).

7. Prueba de campo abierto

Para medir la actividad locomotora y conductas similares a la ansiedad en los animales se utilizó el paradigma de prueba de campo abierto, que consiste en una caja de acrílico negro (70x70x40 cm), en la cual se ubica a la rata durante 5 minutos. La caja esta iluminada con 300 ± 20 lux (medidos con un luxómetro digital, modelo # LX-1010B, Weafo Instrument Co., Shanghai, China). Para medir los niveles de ansiedad, se cuantificó el tiempo en la periferia (s) de la caja, según este paradigma un mayor tiempo en la periferia indica mayores niveles de ansiedad del animal. Para medir la actividad locomotora de las ratas se cuantificó la distancia recorrida (m), la velocidad media (m/s) y velocidad máxima (m/s) que presenten los animales. Estos últimos se utilizaron para verificar que los animales que fueron sometidos a estrés crónico no presentan alteración de la actividad locomotora, en comparación al grupo control. A través del análisis de la grabación de video realizada con el programa ANY-maze (Stoelting Co., IL, USA) se determinó la distancia recorrida (m), la velocidad promedio (m/s), velocidad máxima (m/s) y el tiempo en la periferia (s).

8. Laberinto en cruz elevado

Para medir conductas similares a la ansiedad se utilizo el paradigma de laberinto en cruz elevado, este laberinto está formado por dos brazos abiertos (60 cm de largo x 15 cm de ancho), dos brazos cerrados (60 cm de largo x 15 cm de ancho x 30 cm de alto) y una plataforma central (15 x 15 cm) elevada 100 cm sobre el nivel del suelo. La iluminación fue de 300 ± 10 luxs en los brazos abiertos y 210 ± 10 luxs en los brazos cerrados. Las ratas fueron depositadas individualmente en el centro del laberinto frente a un brazo abierto. La prueba duró 5 minutos. Para medir los niveles de ansiedad, se cuantifico el tiempo (s) y número de entradas al brazo abierto, según este paradigma un mayor tiempo y número de

entradas en el brazo abierto indica menores niveles de ansiedad del animal. También se registró el número de entradas a los brazos cerrados, el número total de entradas y se determinó la relación entre las entradas al brazo abierto y las entradas totales ((número de entradas brazo abierto / número total de entradas) x 100). Una relación mayor indica menores niveles de ansiedad.

9. Prueba de Interacción social

Para medir la motivación de las ratas para relacionarse con sus pares se realizó la prueba de interacción social. Las ratas fueron colocadas en un campo abierto (70x70x40 cm) con una caja perforada (25x15cm) situada en una zona de interacción durante 2.5 minutos y se midió el tiempo que paso el animal en la zona de interacción mediante registro en video y utilizando el software Any-Maze (Stoelting Co., Illinois, EE.UU.). Posteriormente, otra rata Sprague-Dawley macho se colocó por 15 minutos dentro de la caja perforada y se evaluó el tiempo que la rata experimental pasó interactuando socialmente con la rata nueva en la zona de interacción (Francis et al., 2015). En cada experimento se midió el tiempo promedio de interacción.

10. Ingesta de sacarina

Para medir la conducta de anhedonia en los animales se utilizó la prueba de ingesta de sacarina, que consiste en dejar a las ratas con la posibilidad de elegir entre dos botellas, una que contiene agua normal, y otra que contiene sacarina al 0,02%. Las botellas estuvieron disponibles 12 horas. La ingesta de sacarina se mide como la cantidad consumida en gramos por 100 g del peso animal. La preferencia por la sacarina se calcula como la razón entre el consumo de sacarina y el consumo total (sacarina + agua) (Larsen et al, 2010).

11. *Nado forzado*

Para medir conductas similares a la depresión se utilizó la prueba de nado forzado que consiste en dejar individualmente a la rata en un recipiente de plástico transparente (25 cm de diámetro, 46 cm de profundidad) que contiene 30 cm de agua (25°C) durante un periodo de 5 min. Su comportamiento fue grabado mediante un registro en video utilizando el software Any-Maze (Stoelting Co., Illinois). Se evaluó la conducta de flote, escalada y nado. En este paradigma se interpreta que los animales con menor tiempo de escalada y nado, y mayor flote tienen una menor conducta de lucha y escape, que se relaciona a conductas similares a la depresión.

12. *Inmunohistoquímica de PV+*

Para la extracción de los cerebros, los animales fueron anestesiados con isoflurano (Lab Baxter, USA), una vez bajo anestesia profunda fueron perfundidos de forma intracardiaca con 60 mL de suero fisiológico, NaCl 0.9% p/v frío, seguido por 180 mL de paraformaldehido (PFA) al 4% en solución tampón fosfato salino (PBS) 1X pH 7.4. Luego de la extracción, los cerebros se mantuvieron durante dos días en PFA al 4%, posteriormente fueron criopreservados durante 72 horas en sacarosa al 30%. Utilizando un criostato (Kedee KD-2950, Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental Equipment Co. Ltd, Zhejiang, China) se realizaron cortes coronales de 50 μ m de grosor a -20°C. Se recolectaron 6 secciones entre las coordenadas estereotáxicas -3.24 and -6.84 mm respecto al punto Bregma (Paxinos y Watson, 1997). Luego de esto las secciones fueron almacenadas a -20°C en solución anticongelante hasta el momento de su uso. Los cortes fueron incubados con un anticuerpo primario: anti-PV-19 monoclonal hecho en ratón (Sigma#P3088, 1:6000) disuelto en una solución compuesta por Tritón X-100 0.4% y azida de sodio 0.02% por 72 h a 4°C. Previamente se bloqueó la peroxidasa endógena, con una

solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 0.3% y se realizó un bloqueo con suero de albumina bovina (BSA) al 2%, ambos disueltos en PBS 1x. Luego los cortes fueron lavados 5 veces por 2 minutos en PBS 1x e incubados con el anticuerpo secundario pan-específico biotinilado anti mouse/anti-rabbit/anti-goat IgG (H+L) (1:600; Vector Laboratories, USA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras ser lavados 4 veces por dos minutos con PBS 1x, fueron incubados en Avidina–Biotina (1:600, ABC kit; Vector Laboratories, USA) por una hora. La inmunoreactividad de PV se visualizó revelando las secciones con una solución DAB– H_2O_2 (Kit DAB, Vector Laboratories, USA) por tres minutos. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas con alcohol al 75, 90 y 95 %, para luego ser montadas con Entellan (Merck). Las observaciones fueron capturadas con un microscopio Nikon (Nikon Eclipse 50i, Japón) equipado con una cámara fotográfica digital (Nikon, CMOS, Ville, NY, USA).

13. Cuantificación de células PV+

Las imágenes se obtuvieron con una cámara fotográfica digital integrada al microscopio Nikon (objetivo 4X) y el programa Micrometric SE Premium 4. Para cuantificar la densidad de neuronas GABAérgicas PV+ en las secciones se utilizó el programa ImageJ 1.48 (NIH, Maryland, USA), se minimizó la resolución de la imagen a 8 bits y finalmente se identificó y cuantificó las células inmunoreactivas en la región correspondiente a la corteza auditiva primaria (ver ANEXO, Figura 2). Además, se cuantificó la densidad en las diferentes capas de A1: Capa I (0-175 μm), capa II y III (175-500 μm), capa IV (500-700 μm) y capas V-VI (700-1200 μm) (ver ANEXO, Figura 3). Adicionalmente, como control se cuantificó la densidad de PV+ en la corteza visual primaria de las ratas control y CUS.

14. Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis entre los grupos experimentales (control y estrés) en relación a la actividad locomotora, ansiedad, interacción social, ingesta de sacarina, escalada, flote, densidad de neuronas PV+ y niveles de corticosterona se utilizó el t- test no pareado y la prueba Mann-Whitney. La ganancia de peso se analizó utilizando ANOVA de dos vías y mediciones repetidas. Además, para este último parámetro se utilizó un test post-hoc de Bonferroni. Se utilizó el coeficiente de Spearman para evaluar la asociación entre la densidad de neuronas PV+ y la concentración de corticosterona. Los resultados serán graficados en el software GraphPad Prism 6.0. Los datos serán presentados como promedios con el respectivo error estándar medio (SEM). Los niveles de probabilidad menores o igual a 0.05 serán considerados estadísticamente significativos.

IV. RESULTADOS

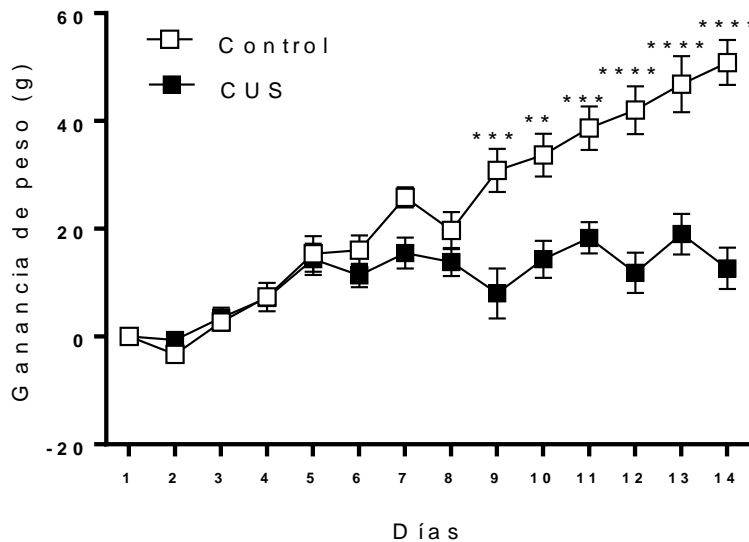
1. Efecto del CUS en los marcadores fisiológicos del estrés

1.1 Efecto del CUS en la ganancia de Peso

Como se observa en la Fig. 1a, al finalizar el estrés crónico impredecible existe una diferencia significativa entre los grupos estresados y no estresados ($F(1, 70) = 98,04$; $p < 0,0001$). Además, hubo interacción entre días y grupos experimentales ($F(13, 70) = 8,004$; $p < 0,0001$).

Al analizar el efecto del estrés crónico impredecible, se observa una disminución significativa de la ganancia de peso del grupo estresado (Control = $50,83 \pm 4,167$ g, Estresados = $12,66 \pm 3,853$ g; $p < 0,001$) (Fig. 1 a partir del día 9 (DPN 68) (Control = $8,0 \pm 4,662$ g, Estrados = $30,83 \pm 4,028$ g; $p < 0,0001$) (Figura 1a).

(a)



(b)

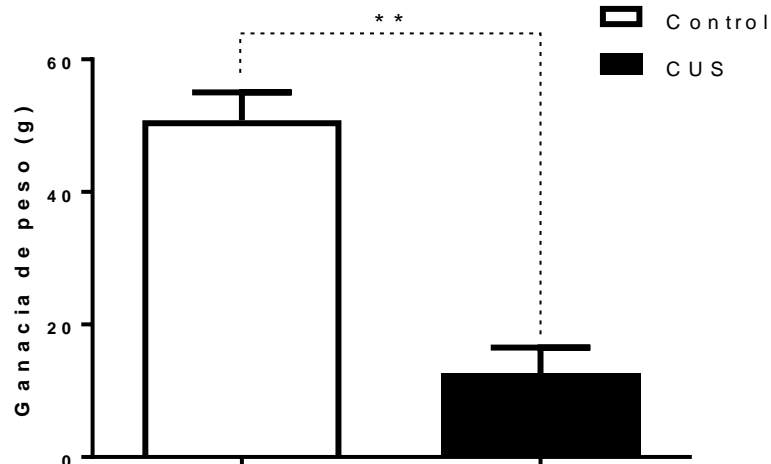


Figura 1: Efecto del CUS en la ganancia de peso de ratas. a) Ganancia de peso (g) diaria durante el estrés, desde el DPN 59 al DPN 73. b) Ganancia de peso promedio (g) de los grupos al finalizar el estrés, DPN 73. Todos los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6); (*) representa diferencias significativas entre Control y CUS.

1.2 Efecto del CUS en los niveles plasmáticos de corticosterona

Como se observa en la Fig. 2, al finalizar el estrés crónico impredecible existe una diferencia significativa entre los grupos estresados y no estresados ($F(2, 12) = 62,02$; $p < 0,0001$). Además, hubo interacción entre el tiempo y grupos experimentales ($F(2, 12) = 5,841$; $p = 0,0169$).

Además, se observa que el grupo estresado presenta mayores niveles plasmáticos de corticosterona que el grupo control al finalizar el protocolo de estrés crónico impredecible, cuando son expuestos a un estrés agudo por restricción de movimiento (Control = $169,5 \pm 18,08$ g, Estresados = $253,5 \pm 23,24$ g; $p = 0,0082$) (Figura 2).

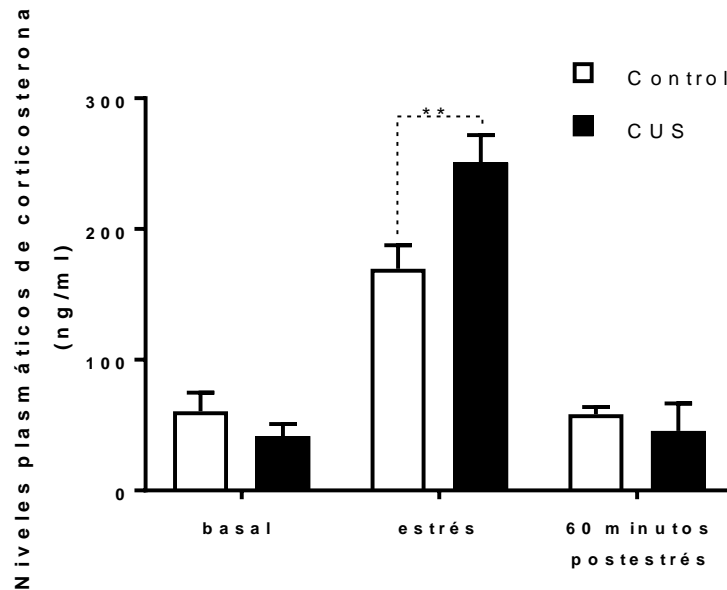


Figura 2: Niveles plasmáticos de corticosterona en ratas después de 14 días de CUS. Las muestras fueron colectadas en tres ocasiones, en 0 minutos (estado basal), después de la exposición a un estrés por restricción de movimiento de duración de 30 minutos y 60 minutos después de terminado el estrés por restricción de movimiento. Todos los datos están representados como Media \pm SEM; (**) representa diferencias significativas entre Control y CUS.

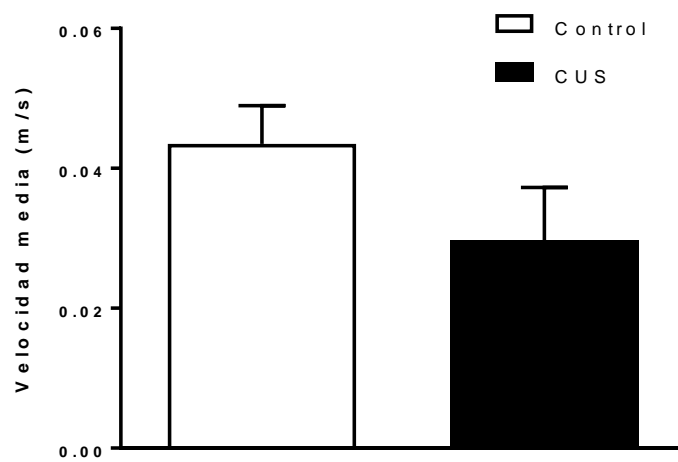
2. Efecto del CUS sobre pruebas conductuales

2.1 Actividad locomotora en Campo Abierto

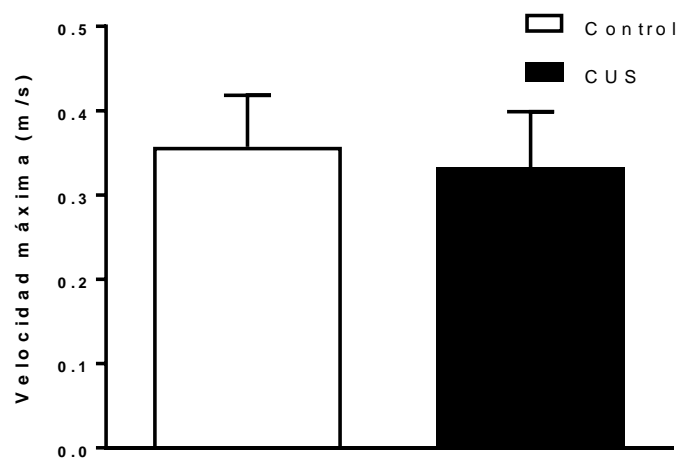
Como se observa en la Fig. 3a, no existen diferencias por efecto del CUS en la velocidad promedio analizada en la prueba de campo abierto de los grupos (Control= $0,0435 \pm 0,005457$ m/s; CUS= $0,02967 \pm 0,007614$ m/s; $p= 0,1385$).

Al analizar la velocidad máxima (Ver Fig. 3b) de los grupos en la prueba de campo abierto, tampoco se observa diferencias entre el grupo control y CUS (Control= $0,357 \pm 0,06138$ m/s; CUS= $0,3332 \pm 0,0655$ m/s; $p= 0,8182$).

(a)



(b)



(c)

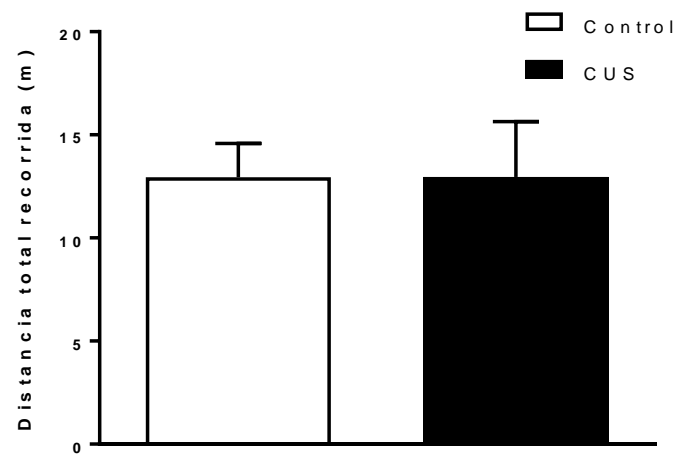


Figura 3: Efecto del CUS en la actividad locomotora en la prueba de campo abierto. a) Velocidad promedio (m/s). b) Velocidad máxima (m/s). c) Distancia Total Recorrida (m). Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

Finalmente, al igual que en los demás parámetros para analizar la actividad locomotora de los animales, no se evidenció diferencia entre los el grupo control y CUS respecto a la distancia total recorrida durante la prueba (Ver Fig. 3c). (Control= $12,95 \pm 1,64$ m; CUS= $12,95 \pm 2,694$ m; $p= 0,5887$).

2.2 Conductas tipo ansiosas en el Campo Abierto

En la Fig. 4, se observa que el CUS disminuye significativamente el tiempo de permanencia en el centro del campo abierto (Control= $102,1 \pm 20,09$ s; CUS= $35,88 \pm 13,75$ s, $p= 0,0152$).

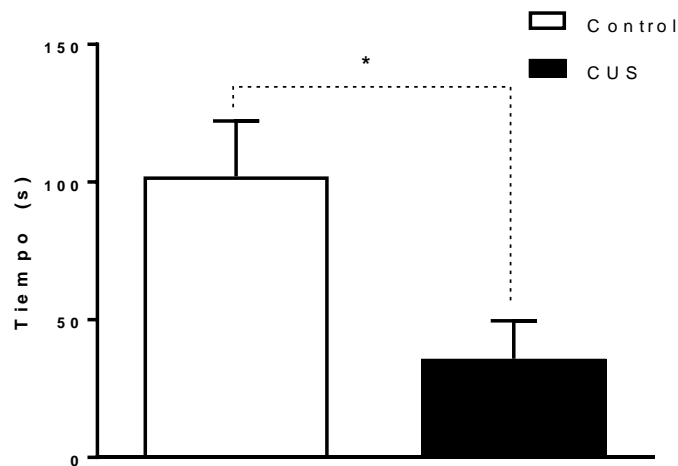
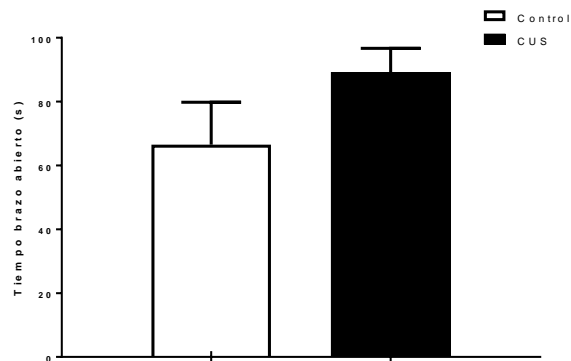


Figura 4: Efecto del estrés crónico impredecible sobre las conductas tipo ansiosas en el en el Campo Abierto. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

2.3 Conductas tipo ansiosas en Laberinto Elevado en Cruz

En la Fig. 5a, se observa que el estrés crónico no reduce el tiempo de permanencia en el brazo abierto del laberinto elevado en cruz (Control= $66,52 \pm 13,28$ s; CUS= $89,22 \pm 7,501$ s; $p= 0,2403$). No existen diferencias entre los grupos CUS y control (Control= $40,55 \pm 5,53$; CUS= $48,58 \pm 2,934$; $p= 0,3723$) en la razón del número de entradas al brazo abierto con respecto al total de entradas al laberinto (Fig. 5b).

(a)



(b)

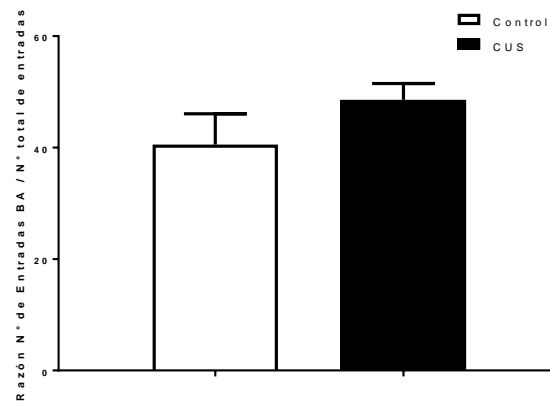
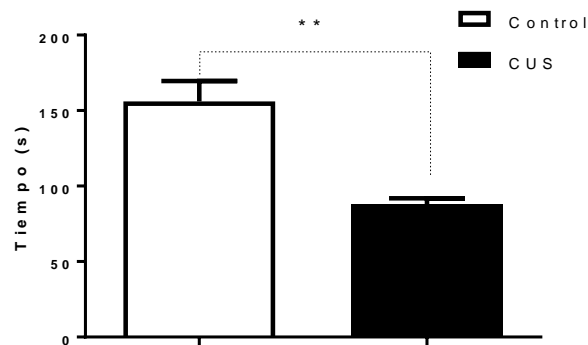


Figura 5: Efecto del estrés crónico impredecible sobre las conductas tipo ansiosas en el laberinto elevado en cruz: a) Tiempo en el brazo abierto (s). b) Razón N° entradas al brazo abierto, respecto al n° total de entradas. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

2.4 Conductas similares a la depresión en la prueba de nado forzado

En la Fig. 6a se observa que el estrés crónico impredecible disminuye significativamente el tiempo en la conducta de escalada (Control= $156,1 \pm 13,57$ s; CUS= $88,08 \pm 3,804$ s; $p= 0,0061$). Además, se observa que el grupo CUS tiene mayor tiempo de flote que el grupo control (Fig. 6b) (Control= $128,3 \pm 15,08$ s; CUS= $188,1 \pm 2,739$ s; $p= 0,0061$).

(a)



(b)

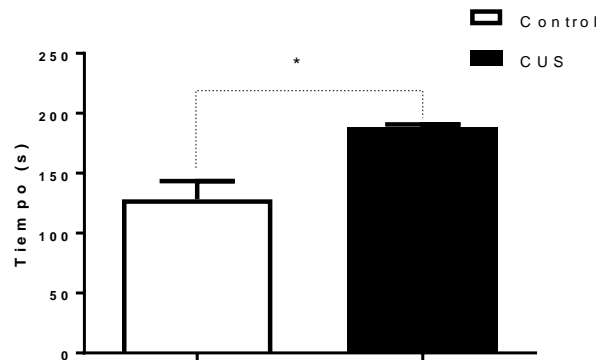


Figura 6: Efecto del estrés crónico impredecible sobre las conductas similares a la depresión en la prueba de nado forzado: a) Tiempo en conducta de escalada (s). b) Tiempo en conducta de flote (s). Los datos están representados como Media \pm SEM ($n = 6$).

2.5 Conductas similares a la depresión en la prueba de interacción social y consumo de sacarina

En la Fig. 7a se observa que el grupo estresado presenta significativamente un menor tiempo de interacción social que el control (Control= $399,3 \pm 35,21$ s; CUS= $66,3 \pm 35,59$ s; $p= 0,0043$). Además, no se observa diferencias significativas en la preferencia de sacarina entre el grupo control y CUS (Fig. 7b) (Control= $85,34 \pm 2,05$ %; CUS= $72,41 \pm 10,43$ %; $p= 0,0173$).

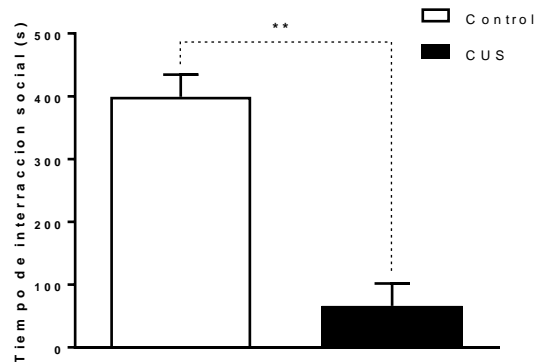


Figura 7a: Efecto del estrés crónico impredecible sobre la conducta de interacción social. Tiempo que el animal permanece interactuando. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

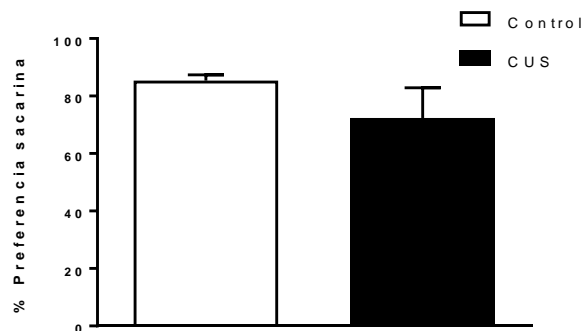


Figura 7b: Efecto del estrés crónico impredecible sobre la preferencia por sacarina. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

3. Efecto del CUS sobre la densidad de neuronas PV+

En la figura 8a y 8b se observa una disminución significativa en la densidad de neuronas positivas para parvalbumina en A1 en el grupo CUS (Control = $85,7 \pm 2,196$ número de células/mm²; CUS = $68,42 \pm 1,176$ número de células/mm²; $p < 0,0001$).

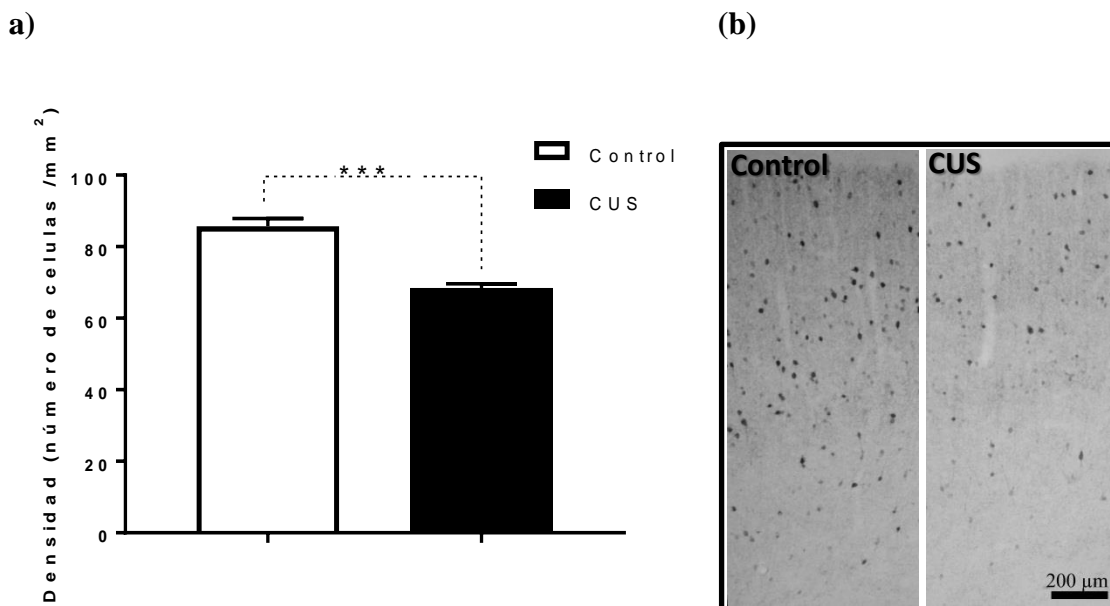


Figura 8: Efecto del CUS en la densidad de neuronas positivas para parvalbumina en la corteza auditiva primaria. a) Densidad de las neuronas PV+ en A1. b) Imagen representativa de la inmunohistoquímica de PV+ para el grupo control y CUS. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

Como se observa en la Fig. 9a y 9b no existen diferencias significativas por efecto del CUS en la densidad de neuronas positivas para parvalbumina en la capa 2/3 de A1 (Control = $82,49 \pm 3,765$ número de células/mm²; CUS = $80,64 \pm 2,053$ número de células/mm²; $p = 0,6707$).

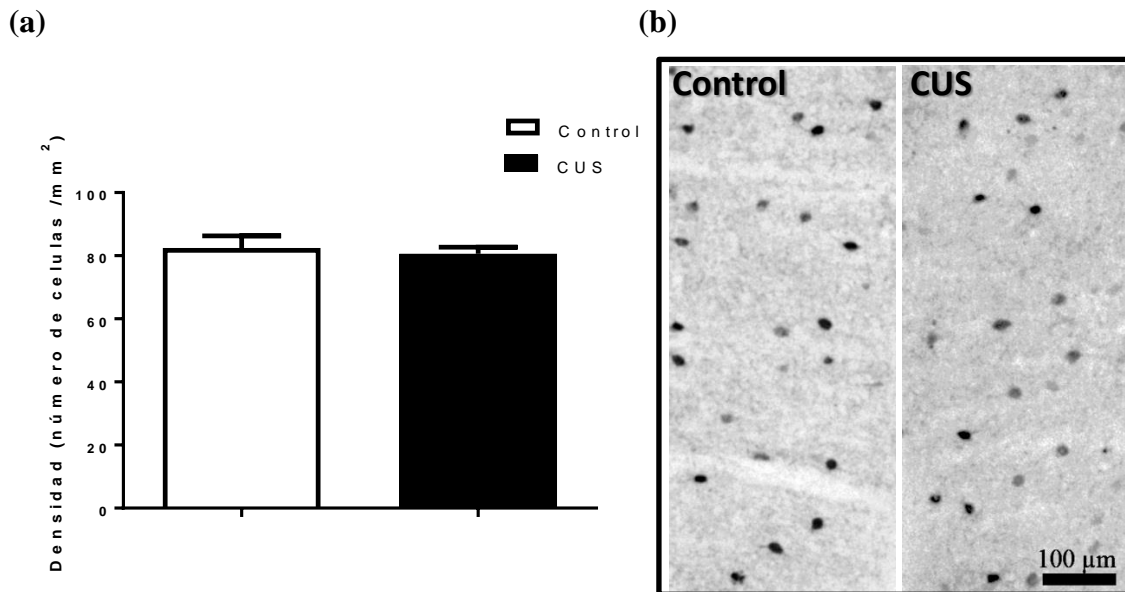


Figura 9: Efecto del CUS en la densidad de neuronas positivas para parvalbumina en la capa II/III de la corteza auditiva primaria. a) Densidad de las neuronas PV+ en la capa II/III de A1. b) Imagen representativa de la inmunohistoquímica de PV+ en la capa II/III para el grupo control y CUS. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

En la figura 10a y 10b se observa que no existe diferencia significativa entre el grupo control y CUS en la densidad de neuronas positivas para parvalbumina en la capa 4 de A1 (Control = $100,8 \pm 4,778$ número de células/mm²; CUS = $92 \pm 2,308$ número de células/mm²; p = 0,0908).

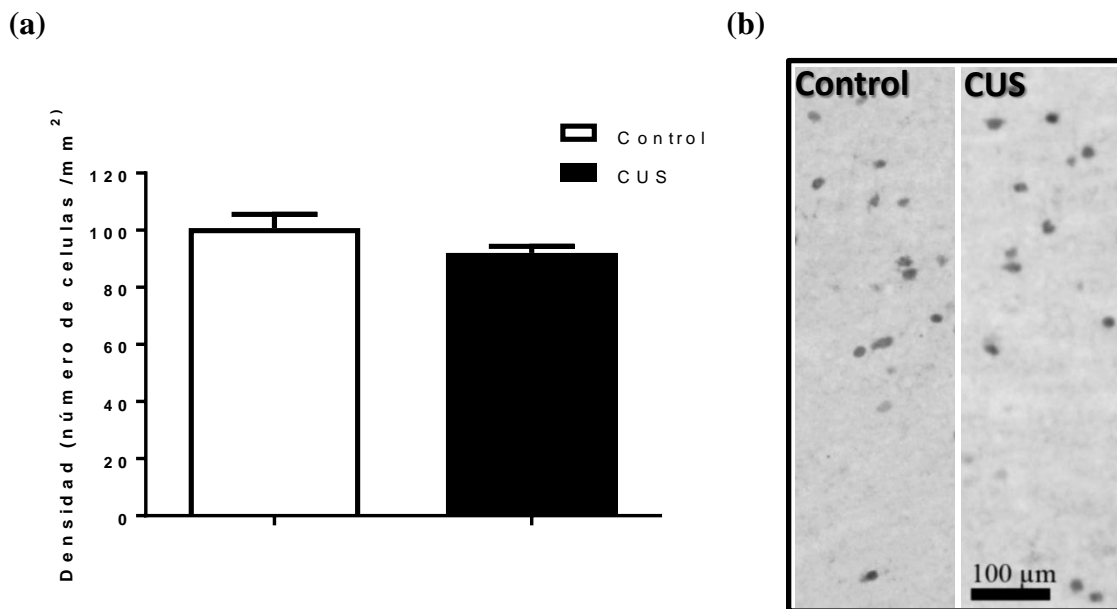


Figura 10: Efecto del CUS en la densidad de neuronas positivas para parvalbumina en la capa IV de la corteza auditiva primaria. a) Densidad de las neuronas PV+ en la capa IV de A1. b) Imagen representativa de la inmunohistoquímica de PV+ en la capa IV para el grupo control y CUS. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

En la capa 5 de A1 (Fig. 11a y 11b) se observa que existe diferencia significativa entre el grupo control y CUS en la densidad de neuronas positivas para parvalbumina (Control = $116,3 \pm 3,137$ número de células/mm²; CUS = $74,97 \pm 2,325$ número de células/mm²; $p < 0,0001$).

Finalmente en la figura 12a y 12b se observa que existe diferencia significativa entre el grupo control y CUS en la densidad de neuronas positivas para parvalbumina en la capa 6 de A1 (Control = $64,3 \pm 2,602$ número de células/mm²; CUS = $49,6 \pm 2,295$ número de células/mm²; $p = 0,0005$).

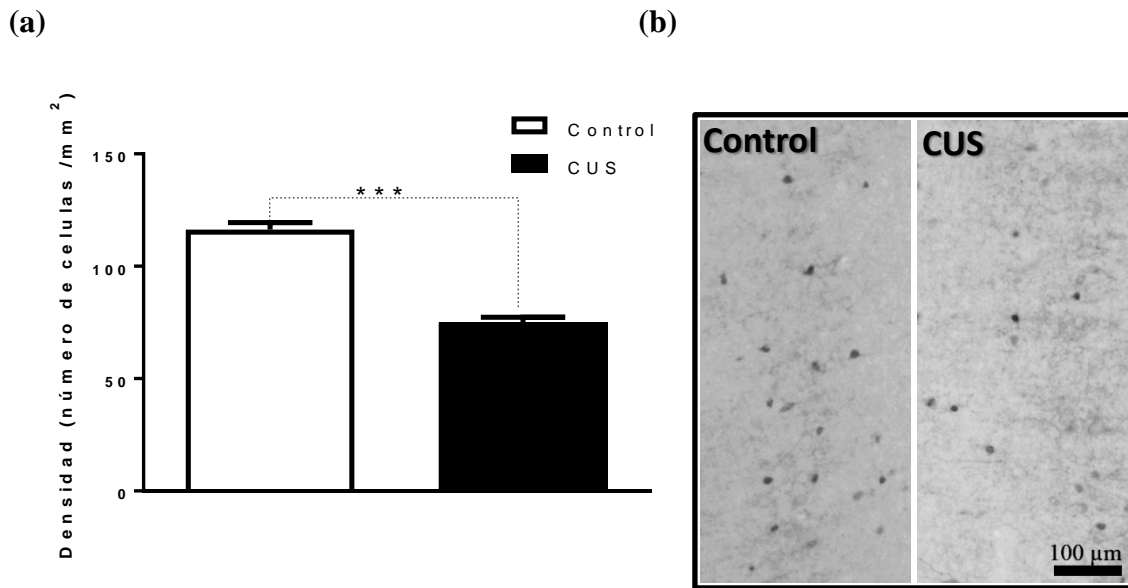


Figura 11: Efecto del CUS en la densidad de neuronas positivas para parvalbumina en la capa V de la corteza auditiva primaria. a) Densidad de las neuronas PV+ en la capa V de A1. b) Imagen representativa de la inmunohistoquímica de PV+ en la capa V para el grupo control y CUS. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

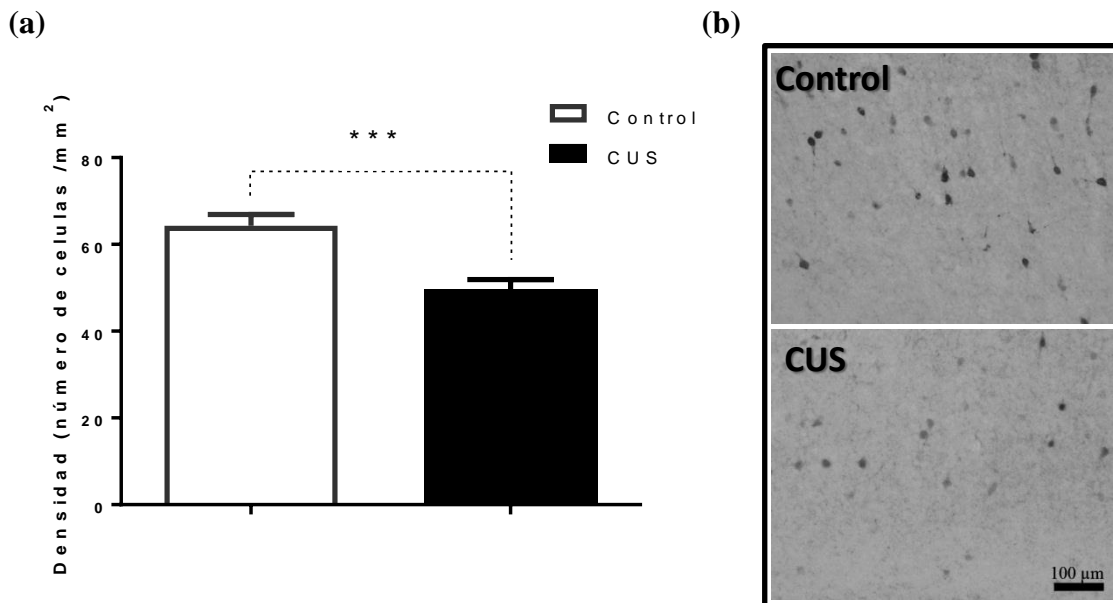


Figura 12: Efecto del CUS en la densidad de neuronas positivas para parvalbumina en la capa VI de A1. a) Densidad de las neuronas PV+ en la capa VI de A1. b) Imagen

representativa de la inmunohistoquímica de PV+ en la capa VI para el grupo control y CUS. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

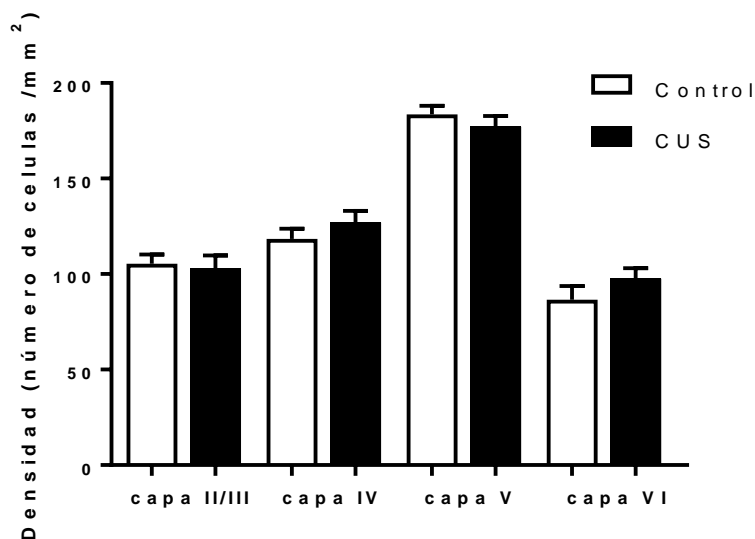


Figura 13: Efecto del CUS en la densidad de neuronas positivas para parvalbumina en la corteza visual primaria. Densidad de las neuronas PV+ en las diferentes capas de la corteza visual. Los datos están representados como Media \pm SEM (n = 6).

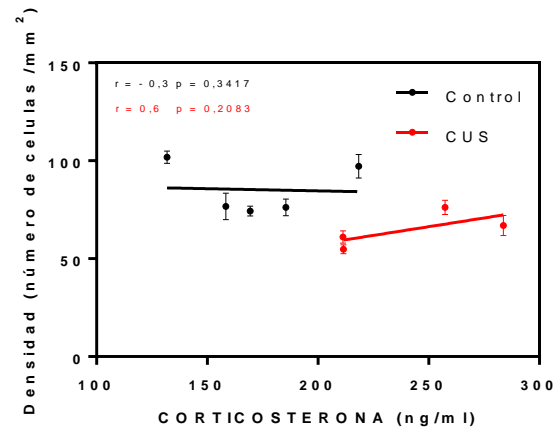
En las diferentes capas de la corteza visual primaria no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y CUS (Fig. 13) (Control = $112,3 \pm 4,647$, número de células/mm²; CUS = $118,8 \pm 3,314$, número de células/mm²; p = 0,4082).

En la figura Fig. 14a se observa que no existe correlación entre los niveles de corticosterona plasmática y la densidad de neuronas PV+ tanto para control y CUS (r = -0,3 p=0,3417; r=0,6 p=0,2083). En la figura Fig. 14b se observa que en el grupo control se correlaciono significativamente los niveles de corticosterona con la densidad de PV+ (r=-0,9; p=0,0417), en el caso del grupo CUS no existe correlación entre los niveles de

corticosterona plasmática y la densidad de neuronas PV+ ($r = -0,4$ $p = 0,3750$). No se encontró correlaciones significativas en las otras capas de A1 (no se muestran las figuras)

4. Correlación entre densidad de neuronas PV+ y los niveles de corticosterona plasmática.

(a)



(b)

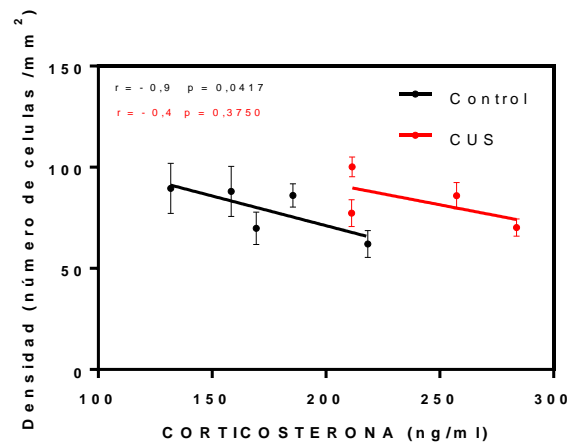


Figura 14: Correlación entre los niveles de corticosterona plasmática y la densidad de PV en grupos control y CUS. a) Correlación entre los niveles de corticosterona plasmática y la densidad de PV+ en A1. b) Correlación entre los niveles de corticosterona plasmática y la densidad de PV+ en la capa II/III de A1. Los datos están representados como Media \pm SEM.

V. DISCUSIÓN

1. Respuesta exacerbada del eje HPA en el estrés crónico impredecible

Tal como ha sido demostrado en investigaciones anteriores utilizando similares paradigmas de estrés (Willner, 1997; Castro et al., 2012; Larsen et al., 2010; Sandi et al., 2008; Jacinto et al., 2013), en esta tesis se encontró que el CUS disminuyó significativamente la ganancia de peso. Además, se comprobó que el estrés crónico aumentó significativamente los niveles de corticosterona plasmática, después de la exposición a un estrés agudo, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Jacinto et al., 2013 y Pérez et al., 2013. Este resultado sugiere que las ratas que fueron expuestas al estrés crónico tuvieron una respuesta más exacerbada de su eje HPA frente a un nuevo estresor agudo, comparado con los animales controles.

La disminución de la ganancia de peso en los animales estresados estaría determinada por dos factores. El primero, provocado por el aumento de la corticosterona plasmática, se debe a la alteración de los mecanismos de retroalimentación negativa. Es conocido que varios procesos metabólicos son mediados por los glucocorticoides, estos aumentan la glucogenólisis hepática y el metabolismo neuronal (Herman et al., 2003), lo que podría relacionarse con la disminución de la ganancia de peso. El segundo mecanismo está dado por un aumento en la liberación de glutamato en áreas límbicas de animales expuestos a estrés crónico (Bagley & Moghaddam, 1997; Reznikov et al., 2007). Esto incrementaría la demanda energética proporcionada por el catabolismo lipídico, con la consiguiente disminución en la ganancia de peso. Con lo expuesto anteriormente, se demuestra que el protocolo de estrés crónico impredecible utilizado en esta investigación fue efectivo sobre los marcadores fisiológicos del estrés.

2. Actividad locomotora en animales expuestos a estrés crónico impredecible

No existieron diferencias significativas entre los animales de los grupos control y estrés en la velocidad media, ni velocidad máxima, ni tampoco en la distancia total recorrida durante el desarrollo de la prueba de campo abierto. Lo anterior demuestra que el protocolo de estrés utilizado no afectó la actividad locomotora de los animales, esto indica que los cambios observados a nivel del comportamiento, no pudieron ser atribuidos a un daño locomotor en los individuos.

3. Conductas similares a la ansiedad en animales expuestos a CUS

En la prueba de campo abierto, se observa que el grupo estrés permanece significativamente menos tiempo en el centro en comparación con el grupo control, similar al resultado obtenido por Jacinto et al, 2013 y Peêgo et al, 2008 con un protocolo de estrés similar. Estos resultados indican que el estrés crónico indujo el fenotipo similar a la ansiedad en las ratas estresadas para esta prueba.

En el laberinto elevado en cruz no existen diferencias significativas en el tiempo de permanencia en el brazo abierto y razón del N° de entradas al brazo abierto/ número total de entradas entre el grupo control y CUS, indicando que para esta prueba, el estrés no indujo un fenotipo similar a la ansiedad.

4. Conductas similares a la depresión observadas en animales expuestos a CUS

En la prueba de nado forzado, el grupo estrés presentó significativamente menor tiempo en conducta de escalada y mayor tiempo de flote, respecto del grupo control. En la prueba de nado forzado, la conducta de flote es una medida del comportamiento que refleja la falta de persistencia en la conducta dirigida al escape (Lucki, 1997, Cryan et al, 2002), que se interpreta como una conducta de tipo depresiva que puede reducirse mediante

tratamiento antidepresivo (Porsolt et al., 1978). En consideración, se demostró que el CUS produjo conductas tipo depresivas en la prueba de nado forzado.

Por otro lado, la prueba de interacción social en ratas permite modelar las alteraciones sociales persistentes que acompañan a la depresión en humanos (Berton et al., 2006; Tsankova et al., 2006; Krishnan et al., 2007). En este sentido, el CUS provocó una disminución significativa en el tiempo de interacción social respecto del grupo control, demostrando que este protocolo de estrés indujo conductas tipo depresivas.

Finalmente, la prueba del consumo de sacarina permite medir el comportamiento anhedónico, en donde una baja preferencia de consumo, está asociado con uno de los principales síntomas depresivos. En este estudio, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y estrés en la prueba de preferencia por sacarina. Posiblemente, esto se debe a que el protocolo de estrés utilizado tuvo una duración de 14 días, y según un estudio no publicado de nuestro laboratorio, la conducta anhedónica en esta prueba aparece en la cuarta semana de estrés.

5. Influencia del CUS en la densidad de células PV+

El principal hallazgo en este estudio fue que el estrés crónico provocó una disminución del número de células PV+ en la corteza auditiva primaria de ratas. Esta disminución solo se encontró en las capas V y VI, lo que indica una susceptibilidad específica por capa en la expresión de PV. Estos datos apoyan la noción de que el estrés crónico lleva a una disminución en la neurotransmisión inhibitoria en la corteza auditiva primaria (Pérez et al, 2013).

La reducción de células PV+ podría explicarse por la expresión de la proteína PV bajo los niveles de inmunodetección (Czéh et al., 2005). En ese sentido, estudios han

demostrado que las neuronas pierden su capacidad de expresar PV en condiciones de estrés crónico (Wang y Fawcett, 2012; Filipović et al., 2013; Zlatković et al. 2014).

El factor causal de la disminución de la expresión de PV, podría ser la desregulación del sistema redox, que conduce al estrés oxidativo. La sobreproducción de superóxido se ha observado en ratas con aislamiento social (Schiavone et al., 2009), llevando a una disminución en GAD-67, la principal enzima que sintetiza GABA en el cerebro. Adicionalmente, se ha demostrado que el aumento de superóxido conduce a cambios en la expresión de PV en un modelo de esquizofrenia y a una disminución de PV en neuronas de disparo rápido en ratones envejecidos (Behrens et al., 2007; Dugan et al., 2009).

Se ha sugerido que PGC1 α , un coactivador transcripcional importante en la regulación del metabolismo celular, está involucrado en la expresión de PV en la corteza cerebral. Los ratones knock-out para PGC1 α muestran una expresión reducida de PV en células GABAérgicas, llevando a una disminución de la neurotransmisión inhibitoria (Lucas et al., 2010). Dado que PGC1 α también participa en la neuroprotección contra el estrés oxidativo, su disminución podría generar una menor expresión de PV en neuronas GABAérgicas.

Otro posible mecanismo que podría explicar la disminución de PV, se relaciona con la inhibición perisomática que estas neuronas proporcionan a las células piramidales. La activación continua de receptores de glucocorticoides no genómicos en células piramidales durante el estrés crónico, puede contribuir al aumento sostenido de Ca⁺² en la transmisión GABAérgica pudiendo causar lesiones a la red de neuronas PV + (Hu et al., 2010, Karst et al., 2005). A su vez, la red inhibitoria afecta el ritmo de las oscilaciones de los LFP, lo que conduce a déficits cognitivos que son comunes en los trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés (Marin, 2012).

Es importante destacar que el efecto del estrés crónico sobre las neuronas PV observado en este estudio y lo descrito en modelos de envejecimiento, coinciden en la disminución de PV+, pero difieren en su localización en la corteza auditiva. En condiciones de estrés crónico, la disminución ocurrió en las capas más profundas (V y VI) de la corteza auditiva, mientras que ratas envejecidas muestran una disminución de PV+ en las capas más superficiales (I a IV) (Caspary et al., 2008, Del Campo et al., 2012).

A nivel clínico, estudios de Resonancia Magnética Funcional, Resonancia Magnética por Espectroscopía y Magnetoencefalografía en pacientes con depresión mayor, una enfermedad neuropsiquiátrica relacionada con el estrés crónico, han demostrado un deterioro en el procesamiento a nivel de la corteza auditiva primaria (Michael et al., 2004, Tollkötter et al., 2006). Considerando que en este estudio se utilizó un estrés crónico impredecible como modelo de comportamientos tipo depresivos, la disfunción auditiva observada en modelos animales y en humanos, podría atribuirse a una susceptibilidad de las neuronas PV+ al estrés crónico.

El estrés crónico induce atrofia dendrítica y disminuye el tono inhibitorio en A1 de ratas, lo cual está correlacionado con el deterioro de la atención auditiva (Pérez et al., 2013). En ese sentido, la susceptibilidad al estrés crónico de las neuronas PV+ en la capa V y VI, podría estar alterando el sistema eferente córtico-coclear, originado en la capa V y VI de la corteza auditiva, el cual proyecta eferentes a los colículos inferiores y al complejo olivar superior, conectándose a través del sistema olivococlear con el órgano receptor auditivo (Terreros, et al 2013). El funcionamiento del sistema eferente auditivo ha sido relacionado con alteraciones en el comportamiento, tales como el déficit atencional. La atención juega un rol fundamental en la selección de estímulos sensoriales, a través de un mecanismo que involucra al sistema eferente olivococlear medial (OCM) (Kauramäki et al.,

2012). Si bien actualmente no existe una fuerte evidencia que permita relacionar el déficit atencional con déficit de la percepción auditiva, la literatura científica lo ha relacionado íntimamente con desórdenes de procesamiento auditivo (Freyaldenhoven et al., 2005). En este sentido, el deterioro en la atención auditiva por estrés crónico, podría ser explicado en parte por una alteración del sistema eferente cortico olivococlear, producto de la disfunción de la transmisión GABAérgica, específicamente de las neuronas PV+ de las capas V y VI de la corteza de A1.

Con respecto a la correlación entre el nivel de corticosterona plasmática y la densidad de PV+, se encontró asociación en las capas 2/3 de A1 en animales control. Allí se observa una disminución de PV+ al aumentar los niveles de corticosterona. Sin embargo, no se encontró esta relación en animales estresados ni en las otras capas, sugiriendo que los efectos del aumento de corticosterona sobre la densidad de PV+ en A1 no son lineales y que existen otros factores determinantes.

VI. CONCLUSIONES

El estrés crónico impredecible, aplicado durante dos semanas en ratas adultas, produjo una disminución de las células positivas para parvalbumina en la corteza auditiva primaria. Adicionalmente, el estrés generó un aumento en los niveles de corticosterona y disminución de la ganancia de peso. En el comportamiento produjo conductas similares a la depresión.

Estos resultados nos confirman que el cerebro es altamente sensible a los efectos del estrés crónico impredecible, particularmente el sistema inhibitorio de la corteza auditiva primaria, caracterizado por una alteración del balance excitación/inhibición. Los efectos de este desbalance podrían explicar el deterioro en la atención auditiva observada en modelos animales y la alteración en el procesamiento auditivo en pacientes con depresión.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Bartos M, Vida I, Jonas P. (2017). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci.* 8(1):45-56
- Behrens, M.M., Ali, S.S., Dao, D.N., Lucero, J., Shekhtman, G., Quick, K.L., and Dugan, LL. (2007). Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking neurons is mediated by NADPHoxidase. *Science* 318, 1645–1647.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, et al. (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress *Science* 311864–868
- Bose, M., Muñoz-Llancao, P., Roychowdhury, S., Nichols, J. a, Jakkamsetti, V., Porter, B., Atzori, M. (2010). Effect of the environment on the dendritic morphology of the rat auditory cortex. *Synapse (New York, N.Y.)*, 64(2), 97–110.
- Caspary DM, Ling L, Turner JG, Hughes LF. (2008). Inhibitory neurotransmission, plasticity and aging in the mammalian central auditory system. *J Exp Biol.* Jun; 211(Pt 11):1781-91
- Castro J. E., Diessler S., Varea E., Márquez C., Larsen M. H., Cordero M. I., et al. (2012). Personality traits in rats predict vulnerability and resilience to developing stress-induced depression-like behaviors, HPA axis hyper-reactivity and brain changes in pERK1/2 activity. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1209–1223
- Cardin J. A., Carlén M., Meletis K., Knoblich U., Zhang F., Deisseroth K., et al. (2009). Driving fast-spiking cells induce gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459, 663–667 10.1038/nature08002
- Celio, M. R. Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid containing neurons of the rat cerebral cortex. (1986). *Science* 231:995-7
- Celio, M. R. & Calbindin, D. (1990). 28k and Parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, 35:375-475.
- Conrad, CD., Wright, R. (2008). Enriched environment prevents chronic stress-induced spatial learning and memory deficits. *Behavioural Brain Research*, 187, 41-47.
- Cook, S. C., y Wellman, C. L. (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Journal of Neurobiology*, 60, 236–248

Cryan, J.F., Markou, A. & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 238–245

Czeh, B, Ma'ria Simon, M van der Hart, B Schmelting, M Hesselink y E Fuchs. (2005). Chronic Stress Decreases the Number of Parvalbumin-Immunoreactive Neurons in the Hippocampus: Prevention by Treatment with a Substance P Receptor (NK1) Antagonist *Neuropsychopharmacology* 30, 67–79,1

Dagnino-Subiabre A (2013). Effects of chronic stress on the auditory system and fear learning: an evolutionary approach. *Reviews in the Neurosciences.* 24(2):227-237.

Dagnino-Subiabre A, Pérez MA, Terreros G, Cheng MY, House P, Sapolsky MR. (2012). Corticosterone Treatment Impairs Auditory Fear Learning and the Dendritic Morphology of the Rat Inferior Colliculus. *Hearing Research.* 294(1-2):104-113.

Dagnino-Subiabre A, Muñoz-Llancao P, Terreros G, Wyneken U, Díaz-Véliz G, Porter B, Kilgard MP, Atzori M, Aboitiz F. (2009). Chronic stress induces dendritic atrophy in the rat medial geniculate nucleus: effects on auditory conditioning. *Behavioral Brain Research.* 203(1):88-96.

Dagnino-Subiabre A, Terreros G, Carmona-Fontaine C, Zepeda R, Orellana JA, Díaz-Véliz G, Mora S, Aboitiz F. (2005). Chronic stress impairs acoustic conditioning more than visual conditioning in rats: morphological and behavioural evidence. *Neuroscience.* 135(4):1067-74.

Danbolt NC. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65:1-105

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, 1–19.

Del Campo HN, Measor KR, Razak KA. (2012) Parvalbumin immunoreactivity in the auditory cortex of a mouse model of presbycusis. *Hear Res.* 294(1-2):31-9.

Dugan, L.L., Ali, S.S., Shekhtman, G., Roberts, A.J., Lucero, J., Quick, K.L., and Behrens, M.M. (2009). IL-6 mediated degeneration of forebrain GABAergic neurons and cognitive impairment in aged mice through activation of neuronal NADPH oxidase. *PLoS One* 4, e5518

Freund, T. F. & Katona, I. (2007). Perisomatic inhibition. *Neuron* 56, 33–42

Fagiolini M., Hensch T. K. (2000). Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* 404, 183–186 10.1038/35004582

Filipović, D., Zlatković, J., Gass, P., and Inta, D. (2013). The differential effects of acute vs. chronic stress and their combination on hippocampal parvalbumin and inducible heat shock protein 70 expression. *Neuroscience* 236, 47–54.

Fox K., Wong O. L. (2005). A comparison of experience-dependant plasticity in the visual and somatosensory system. *Neuron* 48, 465–477

Francis TC, Chandra R, Friend DM, Finkel E, Dayrit G, Miranda J., ... Lobo MK (2015). Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes Mediate Depression-Related Outcomes to Social Defeat Stress. *Biological Psychiatry*, 77(3), 212–222.

Freyaldenhoven MC, Thelin JW, Plyler PN, Nabelek AK, Burc hfield SB. (2005). Effect of stimulant medication on the acceptance of background noise in individuals with attention deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Audiol*; 16(9): 677-86.

Hensch T. K. (2004). Critical period regulation. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 549–579

Hensch T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 877–888 10.1038/nrn1787

Hensch T. K., Fagiolini M., Mataga N., Stryker M. P., Baekkeskov S., Kash S. F. (1998). Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science* 282, 1504–1508

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM (2003): Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24:151–180.

Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Henningsen K, Jayatissa MN, Wiborg O, Jensen K (2011): Hippocampal GABAergic dysfunction in a rat chronic mild stress model of depression, *Hippocampus* 21: 422–433.

Hu W, Zhang M, Czéh B, Flügge G, Zhang W (2010). Stress impairs GABAergic network function in the hippocampus by activating nongenomic glucocorticoid receptors and affecting the integrity of the parvalbumin-expressing neuronal network. *Neuropsychopharmacol* 35:1693-707.

Jacinto, L. R. Joana S. Reis, Nuno S. Dias, João J. Cerqueira, José H. Correia and Nuno Sousa. (2013). Stress affects theta activity in limbic networks and impairs novelty-induced exploration and familiarization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(127), 1-11.

Karst, H., Berger, S., Turiault, M., Tronche, F., Schütz, G., and Joëls, M. (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 19204–19207.

Kauramäki J, Jääskeläinen IP, Hänninen JL, Auranen T, Nummenmaa A, Lampinen J, Sams M. (2012). Two-stage processing of sounds explains behavioral performance variations due to changes in stimulus contrast and selective attention: an MEG study. *PLoS One*; 7(10): e46872.

- Kawaguchi, Y. & Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex* 7, 476–486
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, et al. (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions *Cell* 131391–404
- Larsen, M.H., Mikkelsen, J.D., Hay-Schmidt, A., Sandi, C., (2010). Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *J. Psychiatr. Res.* 44 (13), 808—816.
- Liu, R. J., Aghajanian G. K. (2008). Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (1), 359-364.
- Lucas EK, Markwardt SJ, Gupta S, Meador-Woodruff JH, Lin JD, Overstreet-Wadiche L, Cowell RM. (2010). Parvalbumin deficiency and GABAergic dysfunction in mice lacking PGC-1alpha. *J Neurosci.*;30:7227–7235. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0698-10.2010
- Lucki, I. (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav. Pharmacol.* 8, 523–532
- Lund, J. S., and Lewis, D. A. (1993). Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: Golgi and immunocytochemical characteristics. *J. Comp. Neurol.* 328, 282–312.
- Ma L, Wai Li, Sibin Li, Xuejiao Wang & Ling Qin (2017): Effect of chronic restraint stress on inhibitory gating in the auditory cortex of rats, *Stress*, DOI: 10.1080/10253890.2017.1323861
- Marín O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 107–120
- Markram, H. et al. (2004). Neurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Rev. Neurosci.* 5, 793–807
- McMullen NT, Smelser CB, de Venecia RK (1994). A quantitative analysis of parvalbumin neurons in rabbit auditory neocortex. *J Comp Neurol.* 349: 493–511.
- Michael N, Ostermann J, Sörös P, Schwindt W, Pfliegerer B. (2004). Altered habituation in the auditory cortex in a subgroup of depressed patients by functional magnetic resonance imaging. *Neuropsychobiology.* 49(1): 5-9.
- Ouellet L, de Villers-Sidani E. (2014). Trajectory of the main GABAergic interneuron populations from early development to old age in the rat primary auditory cortex. *Front Neuroanat.* Jun 2;8:40

Paxinos, G. and Watson, C. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York

Peˆgo J. M.,P. Morgado, L. G. Pinto, J. J. Cerqueira, O. F. X. Almeida and N. Sousa. (2008). Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 27, pp. 1503–1516

Pérez, M. Á., 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.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*;47:379–91.

Radley, J. J., Sisti, H. M., et al. (2004). Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 125 (1), 1-6.

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.

Sandi, C., Cordero, M.I., Ugolini, A., Varea, E., Caberlotto, L., et al., (2008). Chronic stress-induced alterations in amygdala responsiveness and behavior—modulation by trait anxiety and corticotropin-releasing factor systems. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1836—1848.

Schiavone, S., Sorce, S., Dubois-Dauphin, M., Jaquet, V., Colaianna, M., Zotti, M., Cuomo, V., Trabace, L., and Krause, K.H. (2009). Involvement of NOX2 in the development of behavioral and pathologic alterations in isolated rats. *Biol. Psychiatry* 66, 384–392

Selye H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138:32.

Selye H. (1956). *The stress of life*. New York. McGraw-Hill Book Co.

Smith, S. M., y Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience*, 8(4), 383.

Sohal V. S., Zhang F., Yizhar O., Deisseroth K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698–702 10.1038/nature07991

Somogyi P, Klausberger T (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562:9–26.

Ströhle A, Holsboer F. (2003). Stress responsive Neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry. Suppl.* 3: 207-S214.

Tafet, G. y Bernardini, R. (2003). Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression . *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27 (2003) 893– 903

Tafet GE, Smolovich J. (2004). Psychoneuroendocrinological studies on chronic stress and depression. *Ann N Y Acad Sci.* 1032:276-8

Tallon-Baudry C., Bertrand O., Peronnet F., Pernier J. (1998). Induced γ -band activity during the delay of a visual short term memory task in humans. *J. Neurosci.* 18, 4244–4254

Terreros G, Wipe B, Leon A, Délano PH. Desde la corteza auditiva a la cóclea: Progresos en el sistema eferente auditivo. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello* 2013; 73: 174-88.

Tollkötter M, Pfliegerer B, Soros P, Michael N. (2006). Effects of antidepressive therapy on auditory processing in severely depressed patients: A combined MRS and MEG study. *J Psych Re.* 40: 293-306

Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. (2006). Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action *Nat Neurosci* 9:519–525

Ulrich-Lai, Y.M., y Herman, J.P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 397–409.

Van Brederode, J. F. M.; Helliesen, M.K. & Hendrickson, A.E. (1991). Distribution of the Calcium-binding proteins Parvalbumin and Calbindin-D28k in the sensorimotor cortex of the rat. *Neuroscience*, 44:157-171

Vyas, A., Bernal, S., et al. (2003). Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Research*, 965 (1-2), 290-294.

Vyas, A., Mitra, R., et al. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *Journal of Neuroscience* 22 (15), 6810-6818.

Wang, Y., Caspary, D., and Salvi, R. J. (2000). GABA-A antagonist causes dramatic expansion of tuning in primary auditory cortex. *Neuroreport* 11, 1137–1140.

Wang, D. and Fawcett, J.(2012). The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res.* 349, 147–160.

Willner P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*;134:319–29.

Xu X, Roby KD, Callaway EM (2010). Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol* 518:389–404.

Yuste R. (2005). Origin and classification of neocortical interneurons. *Neuron* 48, 524–527
10.1016/j.neuron.2005.11.012

Zlatković, J., Todorović, N., Bošković, M., Pajović, S.B., Demajo, M., and Filipović, D. (2014). Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Mol. Cell. Biochem.* 393, 43–57.

VIII. ANEXOS

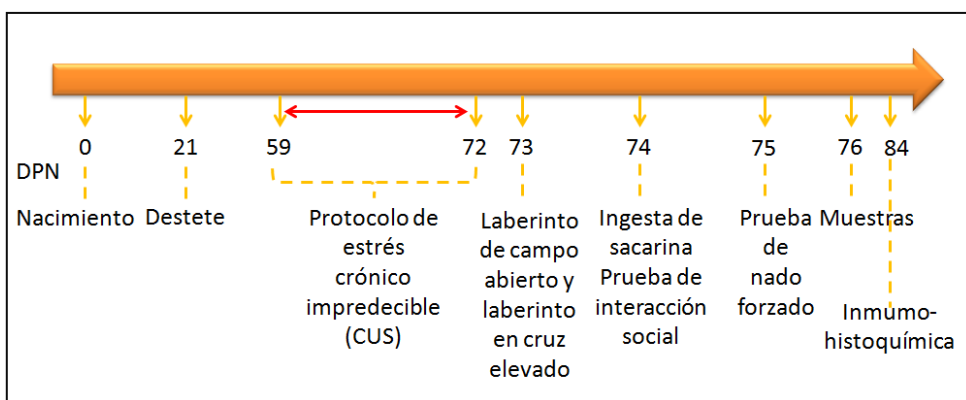


Figura 15: Diseño experimental que se utilizará para los grupos experimentales.

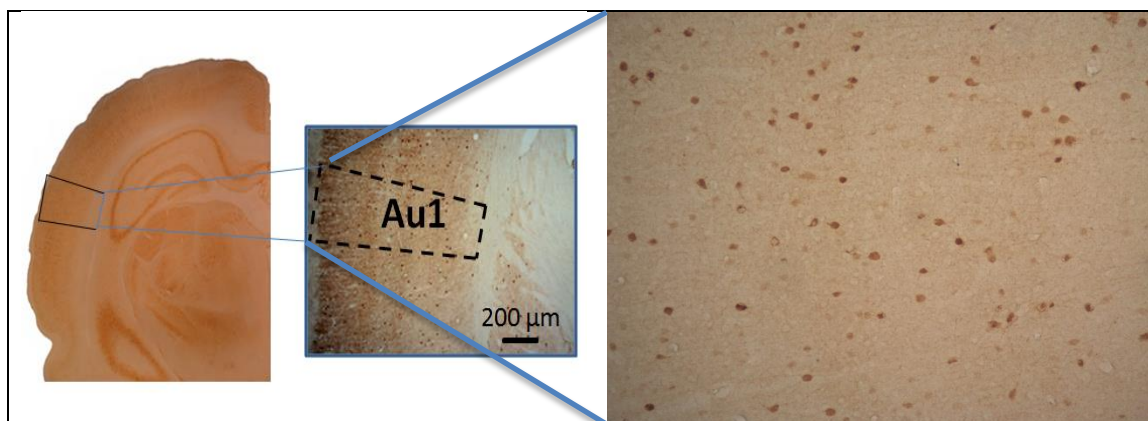


Figura 16: Microfotografía de una sección de cerebro mostrando neuronas GABAérgicas PV+ y área magnificada de la corteza auditiva primaria (A1).

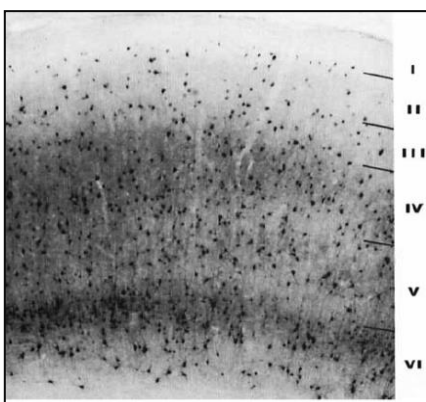


Figura 17: Microfotografía de una sección de cerebro que muestra neuronas GABAérgicas PV+ y las diferentes capas de la corteza auditiva primaria (A1)