

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

**EFECTO DEL ESTRÉS MATERNO DURANTE LA LACTANCIA
TEMPRANA SOBRE LAS CONDUCTAS SIMILARES A LA
ANSIEDAD Y LA DEPRESIÓN EN RATAS PREPÚBERES**

Sandra Reyes Román

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

Director de Tesis:

Prof. Dr. Alexies Dagnino Subiabre, PhD

Laboratorio de Neurobiología del Estrés

Valparaíso, Diciembre 2022

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUMEN..... | 4 |
| 2 ABSTRACT..... | 5 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 6 |
| 3.1 <i>Concepto de estrés.</i> | 6 |
| 3.2 <i>Estrés peri natal</i> | 7 |
| 4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN..... | 10 |
| 5 HIPÓTESIS | 10 |
| 6 OBJETIVOS..... | 10 |
| 6.1 <i>Objetivo general</i> | 10 |
| 6.2 <i>Objetivos específicos</i> | 10 |
| 7 METODOLOGÍA | 11 |
| 7.1 <i>Bioética:</i> | 11 |
| 7.2 <i>Sujetos</i> | 11 |
| 7.3 <i>Protocolo de estrés materno</i> | 11 |
| 7.4 <i>Diseño experimental</i> | 12 |
| 7.5 <i>Marcadores Fisiológicos de estrés</i> | 13 |
| 7.5.1 <i>Ganancia de peso</i> | 13 |
| 7.5.2 <i>Peso de las glándulas adrenales</i> | 13 |
| 7.6 <i>Estudios Conductuales en ratas prepúberes.</i> | 13 |
| 7.6.1 <i>Conductas similares a la depresión</i> | 14 |
| 7.6.1.1 <i>Prueba de preferencia a la sacarosa</i> | 14 |
| 7.6.1.2 <i>Interacción Social</i> | 14 |
| 7.6.1.3 <i>Nado Forzado</i> | 15 |
| 7.6.2 <i>Conductas similares a la ansiedad</i> | 16 |
| 7.6.2.1 <i>Prueba de Campo Abierto</i> | 16 |
| 7.7 <i>Análisis estadístico</i> | 17 |
| 8 RESULTADOS..... | 19 |
| 8.1 <i>Marcadores Fisiológicos de estrés</i> | 19 |
| 8.1.1 <i>Peso de las glándulas adrenales</i> | 19 |
| 8.1.2 <i>Ganancia de peso</i> | 19 |
| 8.2 <i>Estudios Conductuales en ratas prepúberes.</i> | 20 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 8.2.1 | Conductas similares a la depresión. | 20 |
| 8.2.1.1 | Prueba de preferencia a la sacarosa..... | 20 |
| 8.2.1.2 | Prueba de interacción social..... | 21 |
| 8.2.1.3 | Nado forzado..... | 23 |
| 8.2.2 | Conductas similares a la ansiedad..... | 24 |
| 8.2.2.1 | Prueba de campo abierto. | 24 |
| 9 | DISCUSIÓN. | 26 |
| 9.1 | <i>Marcadores Fisiológicos de estrés</i> | 26 |
| 9.2 | <i>Conductas similares a la depresión.</i> | 27 |
| 9.3 | <i>7.3 Conductas similares a la ansiedad.</i> | 30 |
| 10 | CONCLUSIÓN..... | 30 |
| 11 | INNOVACIÓN E IMPACTO | 31 |
| 12 | BIBLIOGRAFÍA..... | 32 |

1. RESUMEN

El cerebro inmaduro es susceptible al estrés pudiendo desarrollar distintas patologías psiquiátricas a lo largo de la vida. La lactancia suele ser un periodo estresante para las madres debido a la demanda de cuidados del recién nacido, presión de su entorno sociocultural sumado a un sistema laboral que no brinda los resguardos legales para la maternidad. El presente estudio tuvo como objetivo investigar el efecto del estrés materno durante la lactancia temprana sobre el comportamiento de las crías hembras y machos durante la infancia. Se usó el paradigma de inestabilidad social basado en el modelo residente-intruso. Seis ratas *Sprague-Dawley* fueron expuestas junto a su camada a una rata hembra virgen e intrusa durante los días 2 al 8 post parto. Se registraron los pesos de las camadas desde el día 21 al 28 y se evaluó a una cría hembra y un macho de cada camada en el día post natal 24 para detectar comportamientos similares a la ansiedad y la depresión. Las crías macho del grupo sometido a estrés postnatal tuvieron una mayor ganancia de peso corporal, destacando un dimorfismo sexual. Además, se evidenciaron alteraciones conductuales en la interacción social espontánea, mostrando las hembras un comportamiento agresivo, mientras que los machos disminuyeron significativamente su interacción física en esta prueba. Estos resultados sugieren que el estrés postnatal temprano se manifestó de distinta manera en ambos sexos, evidenciando la necesidad de contar con modelos animales que permitan el estudio de las bases neurobiológicas de las alteraciones neuropsiquiátricas infantiles a nivel preclínico tanto en el sexo femenino como masculino.

2 ABSTRACT

The immature brain is susceptible to stress and can develop different psychiatric pathologies throughout life. Breastfeeding is usually a stressful period for mothers due to the demand for newborn care, pressure from their sociocultural environment added to a labor system that does not provide legal safeguards for maternity. The present study aimed to investigate the effect of maternal stress during early lactation on the behavior of female and male pups during infancy. The social instability paradigm based on the resident-intruder model was used. Six Sprague-Dawley rats and their litter were exposed to an intrusive virgin female rat on days 2 to 8 postpartum. Litter weights were recorded from day 21 to day 28, and one female and one male pup from each litter were tested on postnatal day 24 for anxiety- and depression-like behaviors. The male pups of the group subjected to postnatal stress had a greater gain in body weight, highlighting a sexual dimorphism. In addition, behavioral alterations in spontaneous social interaction were evidenced, with females showing aggressive behavior, while males significantly decreased their physical interaction in this test. These results suggest that early postnatal stress manifested itself differently in both sexes, evidencing the need for animal models that allow the study of the neurobiological bases of childhood neuropsychiatric disorders at a preclinical level in both males and females.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 *Concepto de estrés.*

El estrés es una reacción fisiológica de los organismos para adaptarse a una situación amenazante (Cabral, *et al.*, 2016) y que como resultado originan un cambio en el comportamiento, produciendo un estado de alerta, vigilancia, atención enfocada y procesamiento cognitivo que permiten al individuo ejercer control sobre la situación y adaptarse a ella. Este cambio en el comportamiento está comandado por estructuras límbicas que incluyen hipocampo, amígdala y corteza prefrontal medial (CPFm), que generan la activación de eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), produciendo liberación de hormona liberadora de corticotropina (CRH) y vasopresina desde el núcleo paraventricular hipotalámico a la pituitaria anterior que libera corticotropina (ACTH) hacia el torrente sanguíneo. La ACTH estimula la corteza suprarrenal para secretar corticosteroides, cortisol en humanos y corticosterona en ratas y ratones. Los corticosteroides llegan a todos los órganos mediante la circulación, permitiendo coordinar las funciones cerebrales y corporales para la respuesta y adaptación al estrés (De Kloet, *et al.*, 2005). Las respuestas suprarrenales al estrés reflejan la activación del sistema simpático-adrenal y el eje HPA y buscan adaptar al individuo frente a situaciones de emergencia (Goldstein, 2010). La adaptación al estrés es un proceso dinámico en que se incrementan o deprimen las funciones vitales para mantener la estabilidad del individuo frente a situaciones desafiantes, concepto conocido como alostasis. A largo plazo, la respuesta fisiológica repetitiva constituye la carga alostática (McEwen & Stellar, 1993), e involucra cambios metabólicos y desgaste de órganos y tejidos,

puede predisponer a enfermedad, generando una variedad de trastornos clínicos, como disfunciones metabólicas, inmunes y psicopatologías (Mac Ewen, 2004).

A nivel cerebral, los corticoesteroides operan uniéndose a receptores de mineralocorticoides (MR) y glucocorticoides (GR), que co-existen en neuronas localizadas en estructuras límbicas (De Kloet, *et al.*, 2005) y pueden mediar una respuesta rápida (no genómica) o lenta (genómica) al estrés (Joëls *et al.*, 20013). La respuesta rápida involucra principalmente MR de membrana, que al ser activados, alteran la función de canales activados por ligando y voltaje-dependientes, afectando la excitabilidad neuronal (Groc *et al.*, 2008). Por otro lado, la respuesta lenta al estrés involucra GR citoplasmáticos que, al ser activados, son translocados al núcleo y actúan como factores de transcripción regulando la expresión de genes, afectando así, funcional y estructuralmente las propiedades de las neuronas (Joëls *et al.*, 2013). El equilibrio entre MR y GR determina las respuestas de afrontamiento al estrés (Lan *et al.*, 2017).

3.2 Estrés peri natal

El ambiente perinatal puede inducir cambios estructurales y funcionales en el sistema nervioso central (SNC) (Catalani *et al.*, 2011). En las primeras semanas de vida, la vulnerabilidad del SNC a los glucocorticoides es alta debido a que la vida media de la corticosterona se prolonga hasta 3 veces lo observado en la vida adulta (Catalani *et al.*, 2011). Cuando estos se administran directamente en forma transitoria en el periodo postnatal temprano, se ha observado hiporeactividad del eje HPA ante estímulos estresantes entre los días postnatales 20 y 25, retraso en la aparición del ritmo circadiano en la actividad del eje HPA, niveles basales de corticosterona más bajos en adultos, disminución en la cantidad de

MR en la hipófisis, hipotálamo e hipocampo y disminución de rendimiento en pruebas de aprendizaje y memoria espacial en la adultez (Catalani *et al.*, 2011).

La corticosterona materna se excreta en la leche, si bien el aumento es menor que el encontrado en plasma luego de ocurrido un evento estresante, existe un *peak* en los niveles de corticosterona en leche materna a los 50 minutos luego de ocurrido el suceso (YE, 1984).

Si la corticosterona producida por el lactante es baja, la hormona procedente de la madre, que se puede ver aumentada por acontecimientos medioambientales, es capaz de influir directamente en la maduración del eje HPA de la rata en desarrollo (Catalani *et al.*, 2011).

La corticosterona puede actuar además indirectamente produciendo efectos en la descendencia al influir en el comportamiento materno (Catalani *et al.*, 2011).

El conflicto social de colocar una rata en la caja de una lactante residente, representa un estrés emocional relevante, que resulta en activación del eje HPA de ambas ratas (Neumann *et al.*, 2001). Si bien se sabe que existe una hiporreactividad del sistema neuroendocrino frente al estrés en hembras lactantes, esta se ve disminuida durante la lactancia temprana en presencia de la camada (Dechamps *et al.*, 2003).

De acuerdo a la investigación de Brummelte *et al.* (2008), el cortisol materno afecta el comportamiento y la actividad endocrina de la descendencia. Este hallazgo es dosis dependiente y sexo específico, observándose en machos expuestos a altos niveles de glucocorticoides maternos durante el postparto, conductas similares a la ansiedad. Además, en la descendencia expuesta durante el periodo prenatal, se observaron conductas similares a la depresión, evidenciando una ventana temporal crítica para el desarrollo de conductas que indican ansiedad y depresión en la edad adulta.

Por otra parte, existe evidencia que demuestra que el estrés prenatal, genera conductas similares a la depresión y ansiedad en ratas macho prepúberes y no en hembras (Iturra et al., 2017). En el estudio realizado por Lan et al., el 2017, en que se estudiaron los niveles de expresión génica de MR y GR en áreas límbicas de fetos sometidos a estrés prenatal, se encontró que las hembras tenían aumentados los niveles de MR en la amígdala e hipocampo en esta etapa del desarrollo, lo que podría explicar el motivo de esta respuesta sexoespecífica. Una de las regiones implicadas en la fisiopatología de la depresión es el núcleo Accumbens (NAc), que forma parte del estriado ventral. El NAc recibe aferencias glutamatérgicas provenientes desde el hipocampo ventral, CPFm, la amígdala basolateral (BLA) y otras estructuras como el tálamo (Bagot et al, 2015). Correia et al. (2016), observaron que la activación selectiva del circuito BLA-NAc mediante optogenética, reducía la evocación de la memoria de miedo, constituyendo un circuito de resiliencia frente al estrés.

4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El estrés materno durante la lactancia genera conductas similares a la ansiedad y la depresión en las crías? Además, ¿serán estas conductas observables durante la infancia o pre-pubertad?

5 HIPÓTESIS

El estrés social en el periodo de lactancia genera conductas similares a la ansiedad y a la depresión en las crías de manera sexo específica.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Estudiar el efecto del estrés materno durante la lactancia temprana sobre el comportamiento de las crías durante la infancia.

6.2 Objetivos específicos

En un modelo de estrés por inestabilidad social durante la lactancia temprana determinar en las crías machos y hembras:

- 1.- Marcadores fisiológicos del estrés.
- 2.- Conductas similares a la ansiedad y depresión.

7 METODOLOGÍA

7.1 Bioética:

Esta investigación fue aprobada por el Comité de Bioética de la Universidad de Valparaíso, Acta de Evaluación Bioética Código 040-2014 para el proyecto Anillo de Ciencia y Tecnología 1403. El estudio se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Estrés de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Los protocolos se diseñaron respetando las reglas de las 3 R de la bioética reduciendo así el número de animales a utilizar. Además, se implementaron todas las medidas para minimizar su sufrimiento.

7.2 Sujetos

Se cruzaron 12 ratas hembra *Sprague-Dawley* vírgenes de 120 +/- 10 días de edad con peso de 272.1 +/- 22 grs con machos reproductores de la misma especie obtenidos de camadas criadas en el bioterio del Laboratorio de Neurobiología del Estrés de la Universidad de Valparaíso. Estos se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad ambiental controlada ($20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $55 \pm 5\%$ respectivamente), comida (Rat Chow, LabDiet® 5012) y aguadisponibles *ad libitum*. El ciclo circadiano se mantuvo 12/12 (la luz se encendió a las 8:00 am). Del total de ratas, 6 se utilizaron como controles y las otras 6 se sometieron al protocolo de estrés post natal (EPN).

7.3 Protocolo de estrés materno

Las ratas control se mantuvieron durante el periodo post parto hasta el destete en la sala de maternidad sin sufrir ningún tipo de intervención que pudiese estresarlas.

Las ratas sometidas al protocolo de estrés, fueron expuestas junto a su camada, a una rata hembra intrusa diferente durante los días 2 a 8 post parto, durante 10 minutos diarios entre las 9:00 y las 11:00 de la mañana.

El diseño experimental que se presenta a continuación refleja el orden en el que se realizaron las pruebas.

7.4 *Diseño experimental*

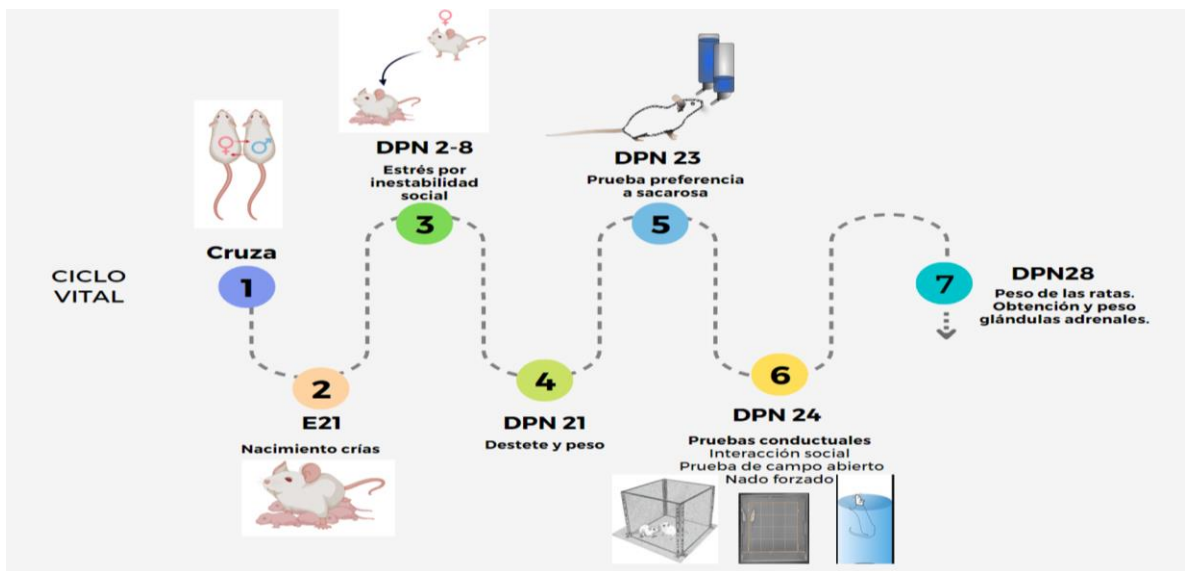


Figura 1.- Esquema del diseño experimental. E: edad gestacional, DPN: días post natal, Orden en el que se realizaron las pruebas: 1.- Prueba de preferencia a la sacarosa, 2.-Prueba de interacción social, 3.- Prueba de campo abierto, 4.- Nado forzado.

7.5 Marcadores Fisiológicos de estrés

7.5.1 Ganancia de peso.

Para monitorear los efectos del protocolo de EPN sobre el peso de las ratas infantas, se pesaron las camadas de 12 o más crías los DPN 21 (destete) y DPN 28. Camadas menores a 12 crías no fueron consideradas porque su peso se ve aumentado al destete por la mayor disponibilidad de leche materna desde el nacimiento.

7.5.2 Peso de las glándulas adrenales.

El día post natal (DPN) 28 el animal fue anestesiado con isoflurano hasta verificar la presencia de paro respiratorio, posteriormente se realizó una incisión en la zona abdominal que permitió la extracción de las glándulas. Antes de registrar el peso se retiró el exceso de tejido adiposo. Finalmente se calculó la proporción del peso de estas respecto al peso total del animal [Peso glándula adrenal (mg)/ peso corporal (g)].

7.6 Estudios Conductuales en ratas prepúberes.

De cada camada se escogió una hembra y un macho para las pruebas evitando así el efecto camada, es decir, que los individuos compartan gran parte de su carga genética y las características de su comportamiento sean producto de ello y no del estrés inducido a la madre durante la lactancia temprana.

Las crías fueron destetadas el DPN 21 y mantenidas con sus hermanos hasta el DPN 23, cuando los sujetos de estudio se aislaron para realizar la prueba de preferencia de sacarosa. Las pruebas se realizaron entre los DPN 23 y DPN 25.

Para el análisis de las pruebas se utilizó el software ANY-maze (Stoelting Co., Illinois, USA).

7.6.1 Conductas similares a la depresión

7.6.1.1 Prueba de preferencia a la sacarosa.

La prueba de preferencia a la sacarosa consiste en dejar a disposición de la rata 2 bebederos, uno con agua y otro con agua endulzada con sacarosa. En condiciones normales, la rata escogerá la botella con agua dulce para beber porque esta le produce placer. Contrariamente, animales sometidos a estrés crónico, muestran anhedonia, es decir, pérdida de la capacidad de sentir placer y por ello un menor consumo de agua con sacarosa. Este paradigma se ha utilizado experimentalmente para estudiar resiliencia y susceptibilidad al estrés, dado que aquellas ratas sometidas a estrés crónico que igualmente muestran marcada preferencia por el consumo de agua con sacarosa serían resilientes y, por el contrario, aquellas que consumen indistintamente agua o agua con sacarosa serían susceptibles a manifestar comportamientos similares a la depresión (Franklin *et al.*, 2012).

Dos días previos a la prueba (DPN 21 y 22) se habituó a las crías a consumir una solución dulce (5% sacarosa) durante una hora diaria. El DPN 23 tanto las crías control como las del grupo EPN fueron aisladas en cajas individuales y tuvieron a disposición una botella con agua y una con sacarosa al 5% durante 12 horas. El cálculo de preferencia de sacarosa se realizó en base al total de líquido ingerido.

7.6.1.2 Interacción Social

La prueba de interacción social (File y Hyde 1978) consiste en exponer entre sí a dos roedores hembra o dos roedores macho en un entorno novedoso, para disminuir su conducta

agresiva, y monitorear su comportamiento exploratorio y social por 5 a 15 minutos (Toth *et al.*, 2013). Una menor interacción con un animal del mismo sexo indica evitación o aversión social, lo que se relaciona a conductas similares a la ansiedad y depresión, que presentan alta comorbilidad con desórdenes afectivos (Toth *et al.*, 2013).

Para evaluar la interacción social espontánea se utilizó un protocolo modificado del propuesto por Malkesman y Weller. El DPN 24, luego de 12 horas de aislamiento las hembras y machos, control y EPN fueron evaluados en cuanto a la interacción social espontánea con otra cría de la misma edad, raza y sexo. Para ello se puso a ambas crías en una caja plástica limpia (50 x 40 x 31 cm) con aproximadamente 1 cm de cama de sustrato de papel. La interacción social fue videograbada durante 15 min y se analizaron los comportamientos prosociales (juego, olfateo y seguimiento), las conductas no sociales (tiempo en que no hubo interacción física entre las ratas) y las conductas agresivas (derrota social). El número y duración de las conductas se analizaron utilizando la opción manual del software ANY-maze.

7.6.1.3 Nado Forzado

Actualmente, se considera que esta prueba conductual determina el tipo de estrategia conductual que usan los roedores para afrontar una experiencia aguda de estrés (Molendijk & de Kloet, 2019). Sin embargo, la evidencia empírica ha mostrado que fármacos antidepresivos utilizados en roedores con comportamientos pasivos reducen el tiempo de inmovilidad en el nado forzado, aumentando el comportamiento activo relacionado con el escape (Slattery & Cryan, 2012).

Para la prueba de nado forzado se utilizó una versión modificada del protocolo de Porsolt. Se usó un cilindro acrílico (diámetro 25 cm, altura 46 cm) llenado hasta los 30 cm con agua a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, (Iturra *et al.*, 2018). La prueba duró 5 minutos, durante los cuales el comportamiento de los animales fue grabado para luego ser analizado con el programa ANY-maze en su modo manual. Las conductas medidas fueron el tiempo de escalada, buceo y nado consideradas como conducta activa, y el tiempo de flote que corresponde a aquel estado en el que el animal se mantiene inmóvil, realizando solo el mínimo esfuerzo para mantener la cabeza sobre la superficie del agua, con una posición vertical de al menos 10° respecto de esta, demostrando una conducta pasiva.

7.6.2 Conductas similares a la ansiedad

7.6.2.1 Prueba de Campo Abierto

La prueba de campo abierto es una de las pruebas etológicas más utilizadas para evaluar el comportamiento de ansiedad en roedores. Consiste en permitir a los animales explorar libremente una arena abierta rodeada de paredes. En esta situación, los roedores evitan el centro del campo, prefiriendo permanecer en la periferia, comportamiento conocido como tigmotaxis (Kuniishi *et al.*, 2017).

El aumento del tiempo de permanencia en el centro de la arena, así como de la relación locomoción central/total o la disminución de la latencia para entrar en la parte central son indicativos de ansiedad (Prut & Belzung, 2003).

El desencadenante de la conducta ansiosa en esta prueba se relaciona con la separación del individuo de su grupo social y al tamaño de la arena en relación con el entorno habitual del

animal, dado que los roedores habitan en grupos y en espacios pequeños, se explica lo estresante de la prueba para el sujeto experimental (Prut & Belzung, 2003).

Este procedimiento también permite medir la sedación o la actividad del individuo y se ha utilizado como una de las alternativas para controlar el adecuado desempeño de la locomoción del animal (Crestani *et al.*, 2010).

Una vez terminada la prueba de Interacción social las crías fueron sometidas a la prueba de campo abierto. Para ello se utilizó una caja negra de 40x40 cm, con una altura de igual dimensión, la temperatura de la habitación fue de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y con una iluminación al centro de la caja de $270 \text{ lux} \pm 5 \text{ lux}$ (Luxómetro modelo #LX-1010B, Weafo Instrument Co., Shanghai, China). La limpieza del aparato se realizó entre cada animal con etanol 5%.

La prueba tuvo una duración de 5 minutos y fue grabada para su posterior análisis con el programa ANY-maze.

7.7 *Análisis estadístico*

Los resultados se exploraron para determinar la normalidad (test de normalidad Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (test de Levene). Si se cumplen estos dos supuestos, se aplica estadística paramétrica (test de ANOVA).

Para el análisis, en todos los resultados se utilizó la prueba ANOVA de una vía y el test post hoc de Tukey. Las correlaciones se analizaron mediante la prueba de Pearson (paramétrico), o bien utilizando la prueba de Spearman (no paramétrico). Los resultados son mostrados como $\text{media} \pm \text{SEM}$. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos resultados con

un valor de probabilidad (p) menor a 0.05. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc.). Se consideró en todos los parámetros que se describen a continuación la presencia de cuatro grupos: controles (no estresados) hembras y machos (HC y MC correspondientemente); e hijos de madres sometidas a estrés crónico por inestabilidad social, hembras y machos (HEPN y MEPN respectivamente).

8 RESULTADOS

8.1 Marcadores Fisiológicos de estrés

8.1.1 Peso de las glándulas adrenales.

El protocolo de EPN no generó una diferencia significativa en el peso de las glándulas adrenales de ratas estresadas respecto de las ratas control ($p = 0.0573$), con medias: HC= 0.2468 ± 0.01305 , HEPN = 0.2157 ± 0.008974 , MC= 0.2385 ± 0.03082 , macho estrés MEPN= 0.1728 ± 0.01700 .

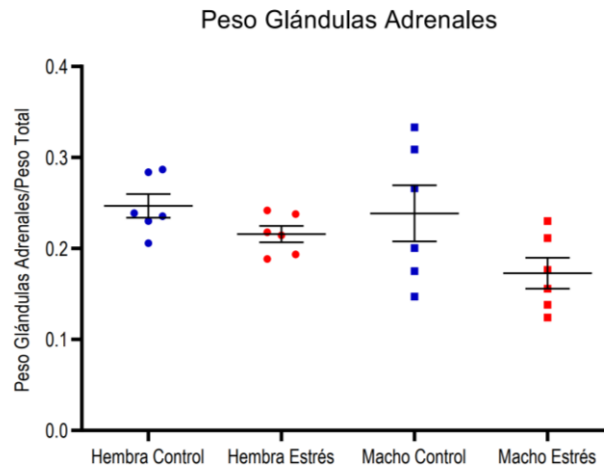


Figura 2.- Efecto del EPN sobre el peso corporal. Los datos son presentados en media \pm SEM.

8.1.2 Ganancia de peso.

La ganancia de peso fue significativa en los machos estresados ($p < 0.0001$) a diferencia de lo que se observa en hembras, con medias: HC= 87.11 ± 43.346 , HEPN= 93.61 ± 1.584 , MC= 90.31 ± 1.845 , MEPN= 104.5 ± 1.228 .

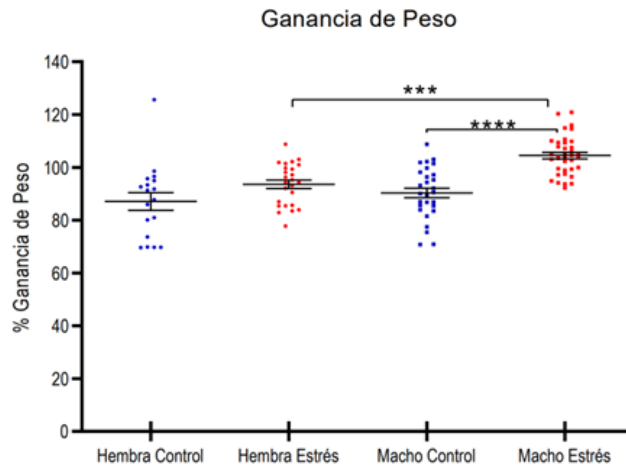


Figura 3.- Efecto del EPN sobre la relación peso de glándulas adrenales/peso total del animal. Los datos son presentados en media \pm SEM.

8.2 Estudios Conductuales en ratas prepúberes.

8.2.1 Conductas similares a la depresión.

8.2.1.1 Prueba de preferencia a la sacarosa.

No hubo diferencia significativa en el consumo de sacarosa entre los grupos control y EPN ($p = 0.0809$), con medias: HC=88.97 \pm 2.838, HEPN= 67.88 \pm 6.885, MC=89.35 \pm 2.352, MEPN= 77.45 \pm 6.173.

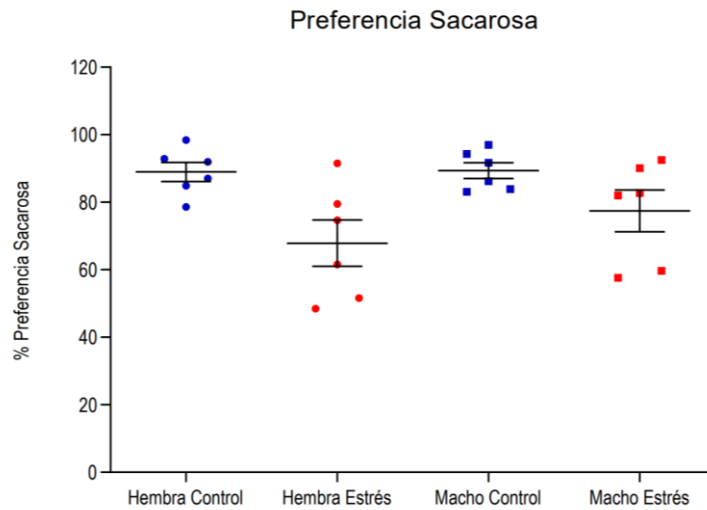


Figura 4.- Porcentaje de preferencia de ingesta de sacarosa respecto de la ingesta total de líquido. Los datos son presentados en media \pm SEM.

8.2.1.2 Prueba de interacción social

Se observó una disminución significativa en las conductas prosociales tanto de hembras como de machos estresados ($p < 0.0001$), con medias: HC= 224.6 ± 27.57 , HEPN= 563.17 ± 14.59 , MC= 269.8 ± 15.91 , MEPN= 40.95 ± 10.95 .

En cuanto al comportamiento no social los grupos mostraron medias de HC= 670.4 ± 30.52 , HEPN= 685.8 ± 10.49 , MC= 629.8 ± 15.78 , MEPN= 791.6 ± 34.38 , observándose un aumento significativo en las conductas no sociales de los machos ($p = 0.0013$), contrariamente a lo que ocurre con las hembras ($p = 0.9711$), existiendo diferencia estadísticamente significativa entre la conducta de hembras y machos estresados.

A

B

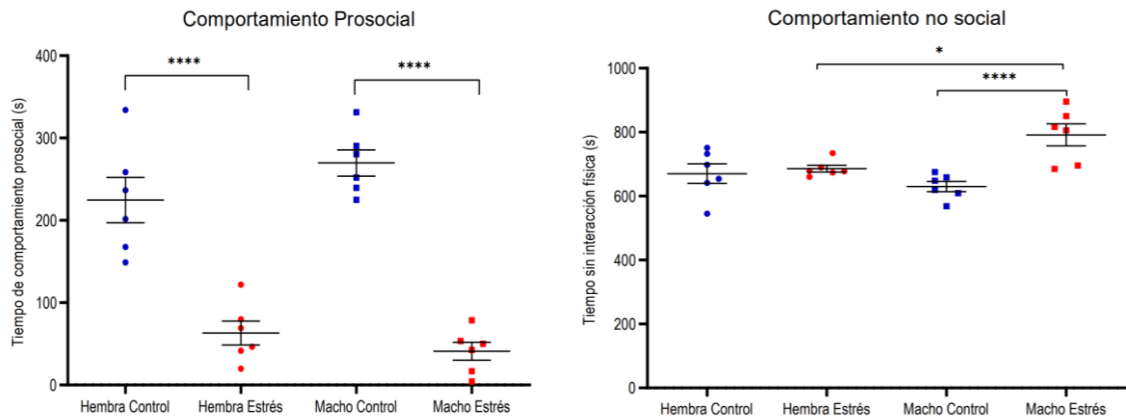


Figura 5.- Efecto de EPN sobre el tiempo de interacción social. A. Comportamiento prosocial. B. Comportamiento no social. Los datos son presentados en media \pm SEM.

El resultado mas interesante de esta tesis es que por primera vez se observó que las ratas infantiles desarrollan derrota social con un conespacífico, muy similar al modelo de estrés por derrota social en roedores adultos en que solo se observa este fenómeno en los macho. Hubo un aumento significativo en el número de derrotas sociales exhibidos por ratas hembras estresadas ($p < 0.0001$), los grupos mostraron medias de: HC= 0.3333 ± 0.3333 , HEPN= 22.00 ± 2.352 , MC= 0.000 ± 0.000 , MEPN= 9.667 ± 4.752 , con significancia estadística en el grupo de las hembras en comparación con machos sometidos a EPN ($p = 0.0111$). No hubo diferencia significativa en el número de derrotas en los machos infantiles, pero la mitad de los machos generaron este comportamiento de derrota social.

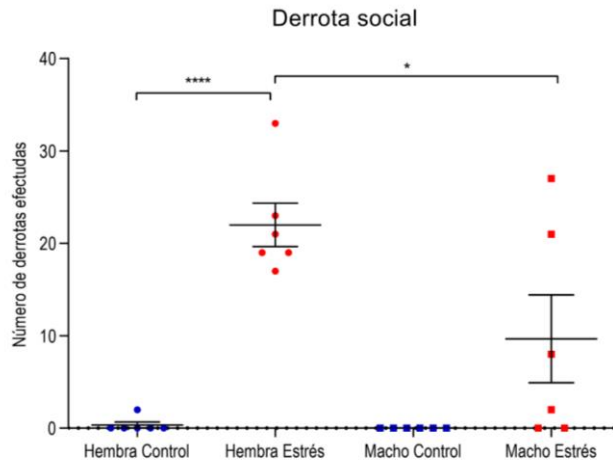


Figura 6.- Efecto de EPN sobre conductas agresivas, representando el número de derrotas sociales realizadas por los sujetos durante la prueba.

8.2.1.3 Nado forzado

La prueba de nado forzado no mostró diferencias significativas entre ratas control y estresadas ($p=0.6176$). El tiempo de inmovilidad obtuvo medias de: HC= 28.85 ± 12.02 , HEPN= 38.83 ± 13.99 , MC= 23.63 ± 11.52 , MEPN= 45.33 ± 12.40 .

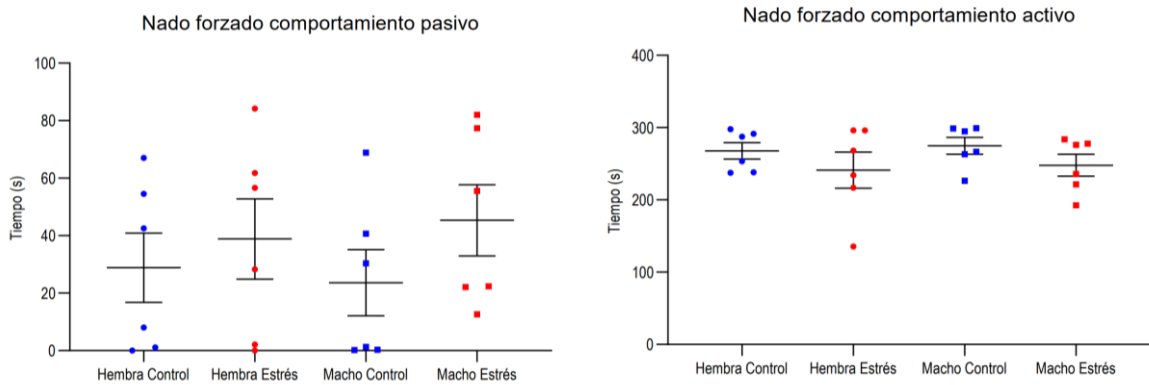


Figura 6.- Efecto del EPN en la movilidad en la prueba de nado forzado. A: comportamiento pasivo (inmovilidad). B: comportamiento activo (nado, buceo y tiempo de escalada). Los datos son presentados en media \pm SEM.

8.2.2 Conductas similares a la ansiedad.

8.2.2.1 Prueba de campo abierto.

No se observó diferencia estadísticamente significativa en el tiempo en que las ratas permanecieron en la periferia del campo ($p < 0.0923$), con medias: HC=269.9 ± 8.295, HEPN= 249.4 ± 14.77, MC=285.1 ± 4.469, MEPN= 201.2 ± 43.17, así como tampoco en el centro ($p = 0.804$), con medias: HC= 29.08 ± 8.672, HEPN= 50.58 ± 14.72, MC= 12.28 ± 3.810, MEPN= 98.43 ± 42.86.

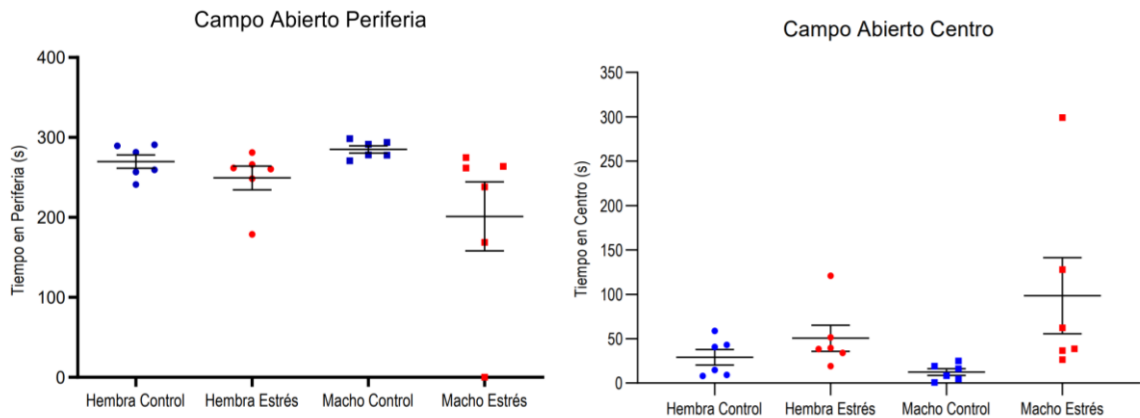
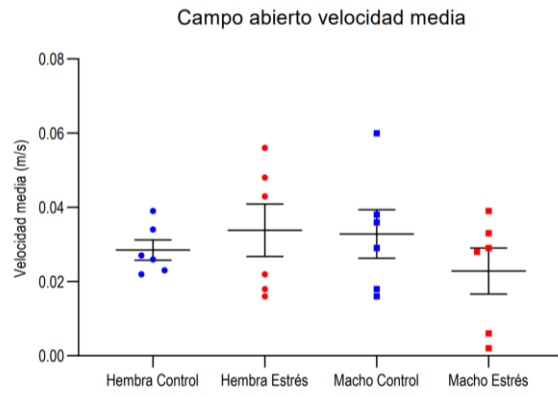


Figura 5.- Representación del tiempo en la periferia y en el centro del campo en los grupos estudiados.

En cuanto a la velocidad de desplazamiento y la distancia recorrida, tampoco mostraron diferencias significativas entre los grupos con $p = 0.5479$ y $p = 0.5274$ respectivamente. Las medias para la velocidad de desplazamiento son: HC= 0.02850 ± 0.002717, HEPN= 0.03383 ± 0.007035, MC= 0.03283 ± 0.006565, MEPN= 0.02283 ± 0.006183 y para la distancia recorrida: HC= 8.513 ± 0.7965, HEPN= 10.20 ± 2.112, MC= 9.845 ± 1.992, MEPN= 6.810 ± 1.817.

A



B

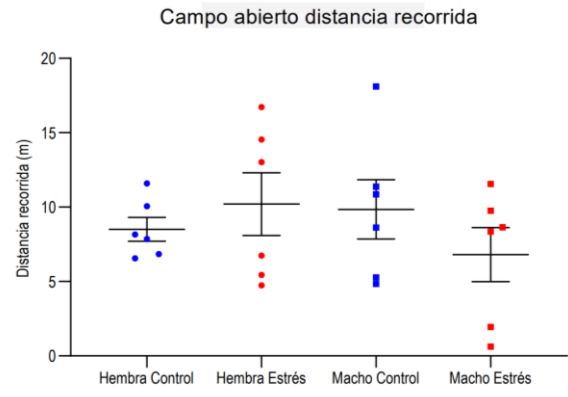


Figura 5.- Efecto del EPN en la actividad locomotora. A: velocidad media de desplazamiento. B: distancia total recorrida. Los datos son presentados en media \pm SEM.

9 DISCUSIÓN.

El estudio del efecto del estrés materno durante la lactancia temprana sobre el comportamiento de las crías durante la prepubertad, permitió identificar diferencias sexoespecíficas en el comportamiento de los sujetos, además de validar un modelo de estrés materno que permitiera realizar esta investigación.

9.1 Marcadores Fisiológicos de estrés

Si bien no hubo diferencia en el peso de las glándulas adrenales, se observó un aumento de peso significativo en machos sometidos a EPN, destacando una diferencia sexo específica en la ganancia de peso del grupo estresado.

Este aumento de peso se podría explicar por la alteración que sufre el eje HPA frente al aumento secreción de glucocorticoides producida por el EPN temprano, afectando permanentemente la retroalimentación negativa de los glucocorticoides en la hipófisis, induciendo hipercortisolismo dependiente de adrenocorticotropina (Campana *et al.*, 2021). Más aun considerando la vida media aumentada de la corticoesterona durante la vida post natal temprana y su excreción en la leche materna (Catalani *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado la influencia del estrés sobre procesos inflamatorios y metabólicos (Charmandari *et al.*, 2005, Antoni *et al.*, 2006), que aumentan el estrés oxidativo, cuya exposición puede programar el perfil metabólico infantil para que sea susceptible a un exceso de ganancia de peso y obesidad posterior (Young *et al.*, 2012). Sumado a esto, Tamashiro *et al.*, evidenciaron que descendientes de madres estresadas son hiperleptinémicos e hiperinsulinémicos al destete, reforzando el resultado de esta investigación.

A diferencia de otros estudios en que se ha observado un mayor aumento de peso en hembras (Murphy et al., 2017), en la presente investigación se observó un aumento de peso mayor en machos sometidos al protocolo de estrés. Sin embargo, existen pocos estudios realizados en este grupo etario en que aún no están presentes ciclos hormonales relacionados al desarrollo gonadal.

9.2 Conductas similares a la depresión.

En el presente estudio no se encontraron diferencias en la prueba de preferencia a la sacarosa. Sin embargo, es interesante observar que en el grupo de sujetos sometidos a EPN, se observa mayor dispersión en los resultados, pudiendo corresponder a sujetos con fenotipo resiliente en comparación a otros susceptibles a esta prueba, situación que ha sido reportada por distintas investigaciones en las que se han identificado individuos con la capacidad de afrontar y adaptarse eficazmente al estrés crónico (Żurawek *et al.*, 2013).

Al igual que en el estudio realizado por Iturra-Mena y colaboradores el año 2018 en ratas prepúberes, las mayores diferencias se encontraron en la prueba de interacción social, lo que reafirma que este paradigma es un indicador más sensible en la respuesta hedónica para este grupo etario, sugiriendo la presencia de anhedonia motivacional, lo que podría ser resultado de una alteración en el funcionamiento de estructuras mesocorticolímbicas como el NAc y su papel en el sistema dopaminérgico.

El resultado de la interacción social fue diferente entre hembras y machos. Si bien las hembras estresadas mostraron tiempos similares de interacción física con respecto al grupo control, se pudo observar un aumento en las conductas agresivas sumado a una disminución

en las conductas prosociales. La CPFm tiene un rol preponderante en el control de las conductas agresivas (Siever, 2008). Un desequilibrio entre su función reguladora debido a desbalance de los sistemas glutamatérgicos/gabaérgicos e hipersensibilidad de la amígdala podrían contribuir a anomalías en este circuito, además de una disminución en los niveles de serotonina o aumento de catecolaminas (Siever, 2008). Se sabe que en hembras existe una maduración más temprana de la corteza prefrontal en comparación con los machos (Cullity et al., 2019; Gennatas et al., 2017), regulando su conducta, sin embargo, es posible que estresores tempranos en la vida post natal alteren la maduración de esta estructura cerebral.

Por otra parte, los machos estresados, disminuyeron el tiempo de interacción física con sus pares. Existen reportes que relacionan los estresores en la vida temprana en machos, con desordenes del espectro autista y déficit atencional durante la infancia sumado a depresión en la vida adulta, mientras que en el sexo femenino estos cambios se observan frente a fluctuaciones hormonales, por lo que son más evidentes en la adolescencia y adultez (Hodes & Epperson, 2019). Cabe destacar que en humanos, la prevalencia del autismo es mayor en el sexo masculino siendo de 4-5:1, sin embargo, en los último años, se han descrito diferencias en la conducta de niñas y niños en el espectro autista, siendo en el sexo femenino subdiagnosticado debido a la presencia de funciones cognitivas más altas, destacando la mayor conciencia en la necesidad de interactuar con sus pares y la tendencia a imitar a otros, lo que enmascara la condición al desarrollar estrategias compensadoras (Lay *et al.*, 2015).

En lo que respecta al trastorno por déficit atencional e hiperactividad, en la práctica clínica, existe claramente un mayor número de individuos de sexo masculino afectados. En trabajos experimentales se ha observado que, en respuesta al estrés, las hembras liberan más

catecolaminas en el SNC que los machos. Dado que las catecolaminas estimulan la actividad de la Na⁺ K⁺ ATPasa de membrana, tanto el valor del potencial de membrana como el umbral de activación aumentan, explicando el mayor éxito en responder y adaptarse a una situación estresante de las hembras debido a su mayor producción de noradrenalina en el sistema nervioso central (Mourek J & Pokorný, 2022). En niñas con déficit atencional, se han observado niveles más bajos de hiperactividad y tasas más bajas de otros comportamientos de externalización predominando el comportamiento de desatención (Gaub & Carlson 1997).

Además, estudios en niños criados en orfanatos, aun cuando se han entregado los cuidados básicos como alimentación y vivienda, han demostrado alteraciones conductuales diferenciadas por sexo, mientras en el sexo femenino se ha descrito ansiedad y depresión, en los varones se ha observado impulsividad. Los estudios de imágenes reportan alteraciones en la amígdala, pero no existe diferenciación por sexo en estos últimos (Hodes & Epperson, 2019).

Finalmente, en el nado forzado no hubo diferencia entre los distintos grupos, observándose dispersión de los resultados tanto en ratas control como estresadas. Si bien la prueba original está descrita en ratas adultas a una temperatura de 25°C (Porsolt *et al.*, 1978), para ratas prepúberes se realizó un protocolo diferente en que el agua estaba a 33°C, como ha sido descrito en estudios anteriores realizados en ratas de la misma edad (Iturra *et al.*, 2018) con la finalidad de evitar la hipotermia. Esta diferencia pudo generar que la prueba fuera menos aversiva para los sujetos, por lo que la misma podría no ser sensible para esta edad.

9.3 7.3 Conductas similares a la ansiedad.

En la prueba de campo abierto no hubo diferencia de significancia estadística para la distancia recorrida, velocidad de desplazamiento ni tiempo en el centro y en la periferia, sin embargo, al igual que lo sucedido en la prueba de preferencia a la sacarosa, se observó una dispersión de datos en los grupos sometidos a EPN a diferencia de los grupos control, por lo que es posible que existan individuos resilientes y susceptibles a conductas similares a la ansiedad frente al estrés (Żurawek et al., 2013).

10 CONCLUSIÓN

El EPN generó comportamientos similares a la depresión de ratas prepúberes, cuyas mayores diferencias se observaron en el aumento de peso y en la interacción social de los individuos, mostrando anhedonia motivacional. Las manifestaciones fueron diferentes entre hembras y machos, evidenciándose mayor agresividad en las primeras y disminución en los tiempos de interacción física en los últimos. Esto reafirma la necesidad de considerar individuos de ambos sexos en las investigaciones en modelos animales infantes/prepúberes, que permitan dilucidar de mejor manera los mecanismos que subyacen a desordenes psiquiátricos de mayor prevalencia en la población infantil y posibiliten la realización de estudios farmacológicos preclínicos específicos para este grupo.

11 INNOVACIÓN E IMPACTO

El periodo postparto puede ser extremadamente fatigante y estresante para las madres, lo que se evidencia principalmente en el periodo post natal temprano, durante el cual desarrolla una conducta de atención centrada en el recién nacido, desplazando situaciones cotidianas que le eran prioritarias. Existen factores socioculturales como las creencias y actitudes del entorno familiar y de amistad de la madre, que actúan como estresores durante la lactancia lo que puede sumarse a un sistema laboral que no brinda los resguardos legales para la maternidad. Existen pocos estudios sobre las alteraciones psiquiátricas que genera el estrés materno temprano durante la infancia (prepubertad). Dado que la fisiología del cerebro infantil es distinta a la del adulto, el contar con modelos animales que permitan la investigación en este grupo etario cobra relevancia, pues podría dar luces sobre los mecanismos a través de los cuales se desarrollan ciertas alteraciones psiquiátricas hasta llegar a la vida adulta. Por otra parte, la farmacología antidepresiva conocida hasta ahora, podría tener efectos distintos en el cerebro infantil y además diferenciado de acuerdo al sexo, lo que abre líneas de investigación en esta área.

12 BIBLIOGRAFÍA

Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav.* 2007 Jul 24;91(4):449-58. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.04.011. Epub 2007 Apr 14. PMID: 17543357.

Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, Dhabhar FS, Sephton SE, McDonald PG, Stefanek M, Sood AK. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2006 Mar;6(3):240-8. doi: 10.1038/nrc1820. PMID: 16498446; PMCID: PMC3146042.

Bagot, R. C., Parise, E. M., Peña, C. J., Zhang, H.-X., Maze, I., Chaudhury, D., Nestler, E. J. (2015). Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. *Nature Communications*, 6(1). doi: 10.1038/ncomms8062

Bali A, Jaggi AS. An Integrative Review on Role and Mechanisms of Ghrelin in Stress, Anxiety and Depression. *Curr Drug Targets.* 2016;17(5):495-507. doi: 10.2174/1389450116666150518095650. PMID: 25981609.

Brummelte, S., Lieblich, S. E., & Galea, L. A. M. (2012). Gestational and postpartum corticosterone exposure to the dam affects behavioral and endocrine outcome of the offspring in a sexually-dimorphic manner. *Neuropharmacology*, 62(1), 406–418. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.017

Brunton, P. J., & Russell, J. A. (2010). Prenatal Social Stress in the Rat Programmes Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress in the Adult Offspring: Sex-Specific

Effects. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(4), 258–271. doi:10.1111/j.1365-2826.2010.01969.x

Cabral JCC, Veleda GW, Mazzoleni M, Colares EP, Neiva-Silva, Lucas N, Vera Torres das. Stress and Cognitive Reserve as independent factors of neuropsychological performance in healthy elderly. *Ciência & Saúde Coletiva* 21 (2016) (11): 3499-3508.

Campana, G., Loizzo, S., Fortuna, A. et al. Early post-natal life stress induces permanent adrenocorticotropin-dependent hypercortisolism in male mice. *Endocrine* 73, 186–195 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12020-021-02659-4>

Catalani, A., Alemà, G. S., Cinque, C., Zuena, A. R., & Casolini, P. (2011). Maternal corticosterone effects on hypothalamus–pituitary–adrenal axis regulation and behavior of the offspring in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(7), 1502–1517. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.10.017

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:259-84. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816. PMID: 15709959.

Correia, S. S., McGrath, A. G., Lee, A., Graybiel, A. M., & Goosens, K. A. (2016). Amygdala-ventral striatum circuit activation decreases long-term fear. *eLife*, 5, e12669. doi:10.7554/eLife.12669

Crestani, C. C., Alves, F. H. F., Correa, F. M. a, Guimarães, F. S., & Joca, S. R. L. (2010). Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. *Behavioral and Brain Functions* : BBF, 6, 30. doi:10.1186/1744-9081-6-30

Cullity, E. R., Madsen, H. B., Perry, C. J., & Kim, J. H. (2019). Postnatal developmental trajectory of dopamine receptor 1 and 2 expression in cortical and striatal brain regions. *Journal of Comparative Neurology*, 527, 1039– 1055. <https://doi.org/10.1002/cne.24574>

De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), 463–475. doi:10.1038/nrn1683

Deschamps, S., Woodside, B., & Walker, C.-D. (2003). Pups Presence Eliminates the Stress Hyporesponsiveness of Early Lactating Females to a Psychological Stress Representing a Threat to the Pups. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(5), 486–497. doi:10.1046/j.1365-2826.2003.01022.x

Franklin, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron*, 75(5), 747–61. doi:10.1016/j.neuron.2012.08.016

Gennatas, E. D., Avants, B. B., Wolf, D. H., Satterthwaite, T. D., Ruparel, K., Ciric, R., Hakonarson, H., Gur, R. E., & Gur, R. C. (2017). Age-related effects and sex differences in gray matter density, volume, mass, and cortical thickness from childhood to young adulthood. *Journal of Neuroscience*, 37, 5065– 5073. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3550-16.2017>

Goldstein D. S. (2010). Adrenal responses to stress. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(8), 1433–1440. doi:10.1007/s10571-010-9606-9

Groc, L., Choquet, D., & Chaouloff, F. (2008). The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nature Neuroscience*, 11(8), 868–870. doi:10.1038/nn.2150

Gaub M, Carlson CL. Gender differences in ADHD: a meta-analysis and critical review. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997 Aug;36(8):1036-45. doi: 10.1097/00004583-199708000-00011. Erratum in: *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1997 Dec;36(12):1783. PMID: 9256583.

Hodes GE, Epperson CN. Sex Differences in Vulnerability and Resilience to Stress Across the Life Span. *Biol Psychiatry*. 2019 Sep 15;86(6):421-432. doi: 10.1016/j.biopsych.2019.04.028. Epub 2019 May 7. PMID: 31221426; PMCID: PMC8630768.

Jeong JY, Lee DH, Kang SS. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2013 Dec;28(4):288-96. doi: 10.3803/EnM.2013.28.4.288. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24396694; PMCID: PMC3871039.

Joëls, M., Pasricha, N., & Karst, H. (2013). The interplay between rapid and slow corticosteroid actions in brain. *European Journal of Pharmacology*, 719(1-3), 44–52. doi:10.1016/j.ejphar.2013.07.015

Kuniishi H, Ichisaka S, Yamamoto M, Ikubo N, Matsuda S, Futora E, Harada R, Ishihara K, Hata Y. Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats. *Neurosci Res.* 2017 Oct;123:27-35. doi: 10.1016/j.neures.2017.04.012. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28450152.

Lai MC, Lombardo MV, Auyeung B, Chakrabarti B, Baron-Cohen S. Sex/gender differences and autism: setting the scene for future research. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2015 Jan;54(1):11-24. doi: 10.1016/j.jaac.2014.10.003. Epub 2014 Oct 16. PMID: 25524786; PMCID: PMC4284309.

Lan, N., Chiu, M. P. Y., Ellis, L., & Weinberg, J. (2017). Prenatal alcohol exposure and prenatal stress differentially alter glucocorticoid signaling in the placenta and fetal brain. *Neuroscience*, 342, 167–179. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.08.058

McEwen, B. S., & Stellar, E. (1993). Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Archives of Internal Medicine*, 153(18), 2093–2101. <https://doi.org/10.1001/archinte.1993.00410180039004>

Mc Ewen, B. S. (2004). Protection and Damage from Acute and Chronic Stress: Allostasis and Allostatic Overload and Relevance to the Pathophysiology of Psychiatric Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1032(1), 1–7. doi:10.1196/annals.1314.001

Molendijk ML, de Kloet ER. Coping with the forced swim stressor: Current state-of-the-art. *Behav Brain Res.* 2019 May 17;364:1-10. doi: 10.1016/j.bbr.2019.02.005. Epub 2019 Feb 6. PMID: 30738104.

Mourek J, Pokorný J. ADHD - What Is the Meaning of Sex-dependent Incidence Differences? *Prague Med Rep.* 2022;123(4):215-224. doi: 10.14712/23362936.2022.20. PMID: 36416460.

Neumann, I. D., Toschi, N., Ohl, F., Torner, L., & Krömer, S. A. (2001). Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin. *European Journal of Neuroscience*, 13(5), 1016–1024. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01460.x

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 1978 Feb 15;47(4):379-91. doi: 10.1016/0014-2999(78)90118-8. PMID: 204499.

Siever LJ. Neurobiology of aggression and violence. *Am J Psychiatry.* 2008 Apr;165(4):429-42. doi: 10.1176/appi.ajp.2008.07111774. Epub 2008 Mar 17. PMID: 18346997; PMCID: PMC4176893.

Slattery, D. A., & Cryan, J. F. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols.* doi:10.1038/nprot.2012.044

Toth, Iulia; Neumann, Inga D. (2013). Animal models of social avoidance and social fear. *Cell and Tissue Research*, 354(1), 107–118. doi:10.1007/s00441-013-1636-4

van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev.* 2004;25:426–457.

YEH, K.-Y. (1984). Corticosterone Concentrations in the Serum and Milk of Lactating Rats: Parallel Changes after Induced Stress*. *Endocrinology*, 115(4), 1364–1370. doi:10.1210/endo-115-4-1364

Young BE, Johnson SL, Krebs NF. Biological determinants linking infant weight gain and child obesity: current knowledge and future directions. *Adv Nutr*. 2012 Sep 1;3(5):675-86. doi: 10.3945/an.112.002238. PMID: 22983846; PMCID: PMC3648749.

Zurawek D, Faron-Górecka A, Kuśmider M, Kolasa M, Gruca P, Papp M, Dziedzicka-Wasylewska M. Mesolimbic dopamine D₂ receptor plasticity contributes to stress resilience in rats subjected to chronic mild stress. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Jun;227(4):583-93. doi: 10.1007/s00213-013-2990-3. Epub 2013 Feb 3. PMID: 23377023; PMCID: PMC3663201.