



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

**EFECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA SOBRE LA ATENCIÓN  
AUDITIVA Y MEMORIA DE RATAS ESTRESADAS**

**NOMBRE ALUMNA  
CATHERINE PÉREZ VALENZUELA**

**Proyecto de Tesis para optar al grado de  
Licenciado en Ciencias Biológicas Mención Biología o Química**

**Director de Tesis:  
Prof. Dr. ALEXIES DAGNINO SUBIABRE**

**Comisión de Evaluación de la Tesis:  
Prof. Dr. MARCOS FUENZALIDA NUÑEZ  
Prof. Dr. RAMÓN SOTOMAYOR ZÁRATE**

**VALPARAÍSO, CHILE  
2013**

**Dedicada a mis padres y hermanos  
por su apoyo incondicional.**

## **Agradecimientos**

Aprovecho esta instancia para agradecer con todo lo que soy a mi familia. Gracias a mis padres Cosme y María, por ser parte de mi vida, por el apoyo y esfuerzo que emplearon en mí, y por el amor que día a día me brindan.

Agradezco los 4 hermanos que la vida me dio, Robert, Sebastián, Valeria y Cristóbal, en quienes puedo confiar y me han alegrado la vida desde que tengo memoria.

Agradezco el apoyo de mi Tía Nancy, y mi primo Juan, quienes hicieron mi vida más comfortable mientras estudiaba.

Gracias a mi profe tutor, Alexies Dagnino, por permitir que conozca un poco más la ciencia, gracias por su comprensión y apoyo, y por ser un gran ser humano que además de enseñar de ciencia, se preocupa de formar personas.

Agradezco a los amigos ajenos al mundo de la ciencia, Amin, Jun, Fer, que me hacen recordar que en la vida hay muchas cosas importantes, que nunca se debe olvidar lo necesario que es, reír, jugar y ver anime jajajajaja.

Agradezco a los compañeros que conocí en la carrera, Erick, Valeria, Jacqueline, Pamela, Victor, Maca M, quienes fueron muy importantes durante los largos tiempos que pase en la Universidad, alegrando los días de estudios, y en donde he podido encontrar grandes personas, que se fueron transformando en grandes amigos.

Agradezco a todos los profesores que me fueron formando académicamente a lo largo de la Licenciatura.

Agradezco a Felipe y Valentín, quienes me ayudaron a realizar los experimentos, y quienes me apoyaron en esta tesis.

Agradezco a mis compañeros de Laboratorio, Miguel, Paz, Maca G, Feña (infiltrada), Valentín (otra vez) que hacen del laboratorio un gran lugar.

Finalmente agradezco a todas las ratitas que dieron su vida (ya sea con o sin su consentimiento) para que esta tesis se pudiera llevar a cabo.

## Índice

Resumen.....	5
Marco Teórico.....	6
Planteamiento del Problema.....	9
Hipótesis y Objetivos.....	10
Materiales y Métodos.....	11
Resultados.....	19
Discusión.....	31
Conclusiones.....	37
Financiamiento.....	38
Referencias.....	39

## Resumen

El estrés crónico afecta varios núcleos del sistema límbico induciendo alteraciones en la memoria y el procesamiento de las emociones. Además, el estrés crónico produce atrofia dendrítica en varios núcleos del sistema auditivo afectando el aprendizaje auditivo. Una patología relacionada con el estrés es la depresión y la reboxetina es un fármaco antidepresivo para tratar esta enfermedad. En esta tesis se analizó el efecto de la reboxetina sobre la atención auditiva de ratas estresadas crónicamente. Ratas *Sprague-Dawley* fueron entrenadas en la "Tarea de elección de dos Alternativas" (2-ACT), un paradigma conductual usado para cuantificar la atención auditiva en ratas. Aquellos animales que obtuvieron un rendimiento superior al 70% de ensayos correctos en la tarea de atención fueron asignadas a 6 grupos experimentales: Control, Estrés, Control + Vehículo, Estrés + Vehículo, Control + Reboxetina, Estrés + Reboxetina. Los animales del grupo Estrés fueron sometidos a un protocolo de estrés por restricción de movimiento, los grupos de vehículo y reboxetina fueron inyectados diariamente con suero fisiológico y reboxetina (0.7 mg/kg/día) respectivamente. El efecto del estrés crónico y la reboxetina sobre la atención auditiva se analizó a través de un "Difference Score" (DS). El valor del DS de las respuestas correctas (DS-RC) se obtuvo restando el número de ensayos correctos obtenidos en 50 ensayos de la prueba de 2-ACT, después del periodo de estrés menos el número de ensayos correctos obtenido antes del estrés. El estrés crónico deterioró significativamente la atención auditiva (DS-RC: Control,  $9.50 \pm 3.63$ ; Estrés,  $-3.00 \pm 1.69$ ;  $p < 0.05$ ), el tratamiento con reboxetina previno este efecto. La reboxetina también tuvo un efecto ansiolítico y deterioró la consolidación de la memoria espacial medida a través del laberinto en Y. Los resultados de esta tesis entregan información importante del efecto del estrés y la reboxetina sobre conductas cognitivas complejas como la atención y la memoria.

## **Marco teórico**

### ***Estrés y sus Patologías***

El concepto de estrés fue creado en el año 1936 por el científico Hans Selye y lo definió como la respuesta biológica producida en todos los animales por cambios ambientales que son percibidos como amenazas (estresores) (Goldstein and McEwen, 2002). A través de esta respuesta biológica los animales se adaptan a los estresores permitiéndose la evolución de las especies.

Hans Selye describió clínicamente al estrés como “Síndrome de Adaptación General” o “Síndrome de Estrés” (Selye, 1936). El estrés está asociado a la activación de varios sistemas neuroendocrinos, por ejemplo, el sistema límbico-hipotalámico-pituitario-adrenal (L-HPA), los cuales producen la energía necesaria, a través de la activación de la glucogenolisis, para que se generen las respuestas al estrés, tales como la lucha y el escape (McEwen, 2002). Existen dos tipos de estrés, el Eustrés que es un tipo de estrés “positivo”, en donde el estresor no es nocivo y el individuo es capaz de controlarlo, generando una respuesta adaptativa (Lazarus, 1974; Tafet y cols., 2003). El estrés negativo o Distrés es aquel estresor que es percibido como una amenaza incontrolable para el sujeto, lo cual, al prolongarse en el tiempo genera efectos negativos en la salud (Tafet y cols., 2003; Gibbons y cols., 2007).

La activación del eje L-HPA frente a un estresor, estimula la liberación de la hormona del estrés, el cortisol en humanos y la corticosterona en roedores (Ströhle y Holsboer, 2003; McEwen, 2007). La corticosterona se une a los receptores de glucocorticoides (RG) permitiendo la activación de las respuestas al estrés (Holsboer, 2000; Ströhle y Holsboer, 2003). Los RG se localizan en áreas límbicas del cerebro, como la amígdala y el hipocampo, además de estructuras corticales como la corteza prefrontal (Pariante, 2006). Estas áreas se ven afectadas morfológicamente y funcionalmente por el estrés crónico (Wellman, 2001; Vyas y cols., 2002), lo cual induce un deterioro del aprendizaje y la memoria, además de un aumento de la ansiedad (Luini y cols., 1994; McEwen y Chattarji, 2004; Dagnino-Subiabre y cols., 2005, 2009). En humanos, el estrés crónico o estrés psicosocial deteriora también el hipocampo y la corteza prefrontal (Pruessner, 2005; Liston y cols., 2009).

A nivel clínico, el estrés crónico es un factor de riesgo importante en el desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas como los trastornos depresivos y de ansiedad (Agid y

cols., 1999; Caspi y cols., 2003; Bishop y cols., 2004; Wang y cols., 2008). En este sentido, la depresión es una enfermedad crónica con una alta prevalencia en Chile (Ministerio de Salud de Chile), así como en el resto del mundo (Organización Mundial de la salud, OMS). Estudios post-mortem y de neuroimágenes en pacientes afectados con esta patología psiquiátrica, presentan una disminución del volumen de la corteza prefrontal y del hipocampo, afectando la actividad del eje L-HPA (Palazidou, 2012).

### ***Antidepresivos***

Los antidepresivos son medicamentos diseñados para disminuir los síntomas de la depresión, estos regulan las respuestas emocionales y cognitivas que presentan los pacientes depresivos (Price y cols., 2011). Existen diferentes tipos de antidepresivos según su acción a nivel sináptico, por ejemplo, los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAOs), los tricíclicos y aquellos que actúan sobre la recaptación de serotonina (ISRS), como la fluoxetina (Hall y cols., 1998), y los inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (ISRD) como la Reboxetina.

La Reboxetina fue el primer inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina utilizado como tratamiento para la depresión mayor (Hajos y cols., 2004). Este fármaco actúa uniéndose al transportador de noradrenalina impidiendo la recaptación de noradrenalina desde el espacio intersináptico (Page, 2003). Se piensa que el aumento de la noradrenalina en el espacio intersináptico inicia los mecanismos neuromoduladores que producen la mejora de los pacientes con depresión.

### ***Efectos del Estrés Crónico sobre el Sistema Auditivo***

Los núcleos encefálicos más importantes del sistema auditivo son el colículo inferior (CI), el cual se localiza a nivel mesencefálico y recibe aferencias del complejo olivarario, el lemnisco y los núcleos cocleares. Desde el CI se proyectan eferentes que llegan al núcleo geniculado medial (NGM) en el tálamo. Desde este núcleo se proyectan axones hacia la corteza auditiva primaria, donde se produce el procesamiento racional de la información acústica, y hacia la amígdala lateral, donde se produce el procesamiento emocional de los sonidos (Dagnino-Subiabre, 2013).

El estrés crónico produce atrofia dendrítica en las neuronas del colículo inferior, el principal núcleo del sistema auditivo (Dagnino-Subiabre y cols., 2005, 2009). Esta alteración morfológica se correlaciona con un deterioro del aprendizaje al miedo generado

por estímulos auditivos en ratas (Dagnino-Subiabre y cols., 2009). Ambos tipos de alteraciones se revierten 15 días del término del estrés, lo que indica un alto grado de plasticidad sináptica (PS) en el CI (Dagnino-Subiabre y cols., 2005). En pacientes depresivos se observó que el procesamiento de los estímulos auditivos en el cerebro estaba deteriorado, lo cual fue revertido cuando el tratamiento antidepresivo fue efectivo (Michael y cols., 2004, Tollkötter y cols., 2006).

### ***Efecto del Estrés Crónico sobre la Atención Auditiva***

La atención es una función cognitiva compleja que está asociada a un aumento de la actividad neuronal en la corteza auditiva primaria, la cual es requerida para procesar la información acústica que se atenderá y se disminuirá la actividad neuronal en las áreas del cerebro que son irrelevantes para la tarea que se desarrollará (Uchida y Mainen, 2003; Hromadka, 2007)

La atención tiene un papel muy importante en la cognición humana (Aboitiz y Cosmelli, 2009), siendo determinante en la forma que el individuo percibe, interpreta y responde a la información ambiental (Derryberry y Tucker, 1994). Los estímulos son percibidos de diferente forma dependiendo de la atención, la cual actúa como un foco que permite procesar con diferente intensidad cada estímulo sensorial (Broadbent, 1958; Posner, 1994). Los pacientes con trastornos depresivos y de ansiedad presentan un deterioro significativo de la atención (McNally, 1998; Mogg y Bradley, 1998).

Los modelos murinos permiten estudiar la neurobiología de la atención a través del uso de técnicas invasivas y de paradigmas conductuales de aprendizaje con estímulos acústicos (Hromádka, 2007). Estos estudios permiten mejorar la comprensión del proceso atencional y cómo este se ve influenciado en diferentes escenarios, por ejemplo, bajo el estrés crónico.



## **Planteamiento del problema**

Durante estos últimos 20 años el foco principal del estudio del estrés crónico sobre el sistema nervioso se ha orientado a analizar estructuras subcorticales límbicas y el procesamiento de las emociones. Sin embargo, es poco lo que se conoce respecto al efecto del estrés crónico a nivel de las cortezas sensoriales. En nuestro laboratorio tenemos evidencias que indican que el estrés crónico afecta la atención auditiva en ratas. En este contexto, es muy importante estudiar si este efecto puede ser prevenido por el fármaco antidepresivo reboxetina.

**Hipótesis:**

La reboxetina previene el efecto del estrés crónico sobre la atención auditiva en ratas *Sprague-Dawley*.

**Objetivo General:**

Determinar el efecto de la reboxetina sobre la atención auditiva de ratas controles y estresadas.

**Objetivo Específicos:**

1) Determinar el efecto de las inyecciones de vehículo sobre la atención auditiva de ratas controles y estresadas.

2) Determinar el efecto del antidepresivo reboxetina sobre la atención auditiva de ratas controles y estresadas.

## Materiales y Métodos

### 1.- Animales de experimentación

En todos los experimentos se usaron ratas *Sprague-Dawley* machos (21 a 22 días de vida y entre 150 -200 gr), las cuales se mantuvieron en grupos de tres, en cajas de 20x20x40 cms, con un ciclo circadiano de 12/12hrs de luz/oscuridad (luz encendida a las 8:00 AM), en una habitación con temperatura y humedad controlada ( $20 \pm 1$  ° C, 60%). Las habitaciones en donde se llevan a cabo los experimentos están aisladas de ruidos ambientales externos. Los animales tuvieron libre acceso a comida y agua y fueron pesados diariamente con una balanza digital (modelo WLC2/A1, Radwag, Polonia).

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 de Chile. Se realizaron los máximos esfuerzos para minimizar el número de animales que se usaron en cada grupo experimental y su sufrimiento.

### 2.- Diseño experimental

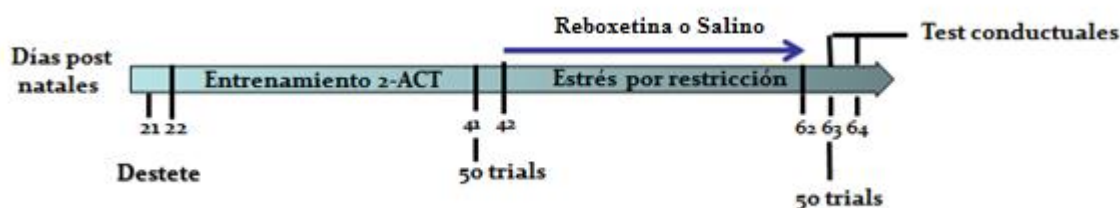
Se usaron 6 grupos experimentales, cada uno de ellos formado por 10 ratas (Tabla 1).

Grupo Experimental	N° de ratas	Tratamiento (dosis)
Control	10	-----
Estrés	10	-----
Control + Vehículo	10	Vehículo: inyección con NaCl (0.9 %)
Estrés + Vehículo	10	Vehículo: inyección con NaCl (0.9 %)
Control + Reboxetina	10	Inyección con Reboxetina (0,7 mg/kg/día)
Estrés + Reboxetina	10	Inyección con Reboxetina (0,7 mg/kg/día)

**Tabla 1.** Grupos experimentales usados en la tesis.

El esquema 1 muestra un resumen del diseño experimental usado. Todos los grupos experimentales fueron alimentados *ad libitum* con un alimento comercial de la marca Champion® (Champion S.A., Santiago, Chile). Los animales fueron entrenados en

el paradigma conductual “Elección de dos alternativa” (2-ACT) entre los días post natales 22 y 41 (Esquema 1). Tanto la reboxetina como la solución salina fueron administradas diariamente por vía intraperitoneal durante 21 días. Las inyecciones comenzaron aproximadamente el día 42 post natal, y en el caso de los grupos de estrés, se realizó en paralelo al protocolo de estrés (Esquema 1). Las pruebas conductuales de Campo Abierto y laberinto en Cruz Elevado se realizaron el día 63 post natal y el día 64 se desarrolló la prueba del Laberinto en Y.



**Esquema 1.** Diseño experimental. En el día 41 y el día 63 se aplicaron a todos los grupos 50 ensayos de la prueba 2-ACT, y se determinó el Difference Score (DS).

## 2.- Protocolo de estrés

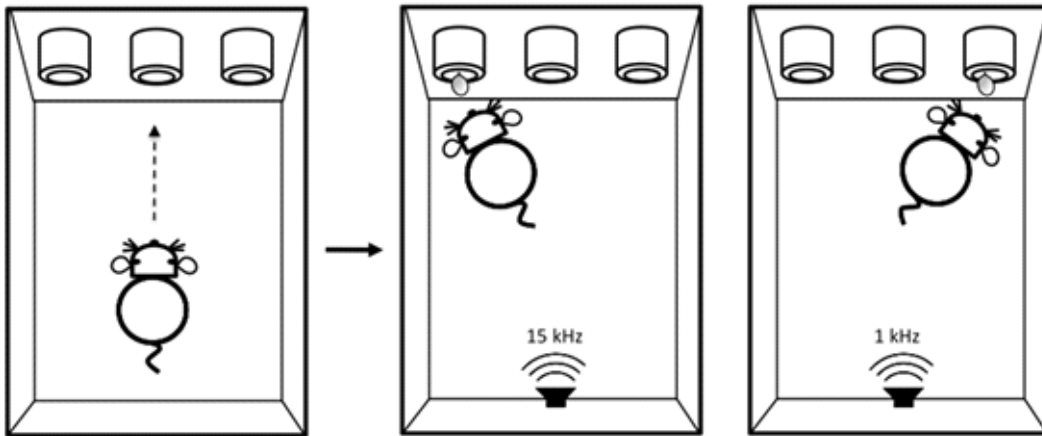
Se aplicó un protocolo de estrés por restricción de movimiento (Magarinos y. McEwen 1995), el cual se realizó dejando a las ratas en un restrictor de movimiento de acrílico (6 cm de diámetro x 20 cm de longitud), por un tiempo de seis horas diarias (inicio 10 A.M), durante 21 días. Este protocolo de estrés crónico se aplicó en las jaulas en donde se criaron los animales. El protocolo se inició aproximadamente cuando los animales tenían 42 días de edad. Los restrictores tienen agujeros en los extremos, lo que permite la ventilación de los animales.

Para evaluar el efecto del estrés sobre los animales de los grupos experimentales se analizó la ganancia de peso debido a que este es un muy buen marcador fisiológico de estrés (Depke y cols., 2008).

## 3.- Atención Auditiva

El protocolo de aprendizaje que se utilizó fue el paradigma conductual “Tarea de elección de dos alternativas”. Este paradigma se aplicó durante 18 días (Esquema 1). Las ratas se privaron de agua durante la noche, luego se pusieron individualmente en cajas de entrenamiento que estaban aisladas acústicamente, con una luz tenue de 210 luxs y un

ruido ambiental de 30 dB. Estas cajas de condicionamiento operante tienen en un lado tres puertos en donde la rata puede introducir su hocico (Esquema 2).



**Esquema 2:** Esquema del Paradigma conductual “Tarea de elección de dos Alternativas”. Este tipo de condicionamiento operante tiene 3 pasos, en el primero la rata decide introducir su hocico en el puerto central, después el sistema puede emitir al azar dos tipos de tonos, uno de alta frecuencia (15 kHz) y la rata aprende a ir a buscar la recompensa (gota de agua) al puerto de la izquierda, o un tono de baja frecuencia (1 kHz) y la rata aprende a ir a buscar la recompensa al puerto derecho.

La prueba conductual 2-ACT está formada por 3 pasos y en cada uno de ellos se puede estudiar independientemente el aprendizaje, la consolidación de la memoria y la atención auditiva. La primera etapa del 2-ACT ocurre durante la primera semana de entrenamiento, aquí la rata aprende a que la prueba comienza cuando el animal introduce su hocico en el puerto central de la caja de condicionamiento, esto induce a que el sistema controlado por el programa Packwin 2.0 (Panlab S.U.L, Barcelona, España) regule la emisión al azar de un tono durante 350 milisegundos. El sistema puede emitir dos tipos de tonos, uno de alta frecuencia, correspondiente a 15 kHz, u otro o de baja frecuencia, correspondiente a 1 kHz. Cada tono representó una pista para que la rata busque la recompensa (una gota de agua) en el lado izquierdo, si el tono emitido correspondió a 15 kHz. Si el tono emitido fue de 1 kHz, el animal aprendió a buscar la recompensa en el puerto derecho (Esquema 2). La recompensa cayó en el puerto correspondiente si hubo una respuesta correcta. La rata tuvo 10 segundos después de la emisión del tono para introducir el hocico en el puerto correcto. El programa reconoció los

ensayos correctos e incorrectos durante 50 ensayos. Durante la segunda semana de entrenamiento las ratas son entrenadas en 50 ensayos de 2-ACT hasta llegar a un 50 % de ensayos correctos, al final de esta semana ocurre la consolidación de la memoria relacionada con el 2-ACT. Al inicio de la última semana las ratas recuerdan la prueba 2-ACT y son entrenadas para mejorar su atención auditiva y aumentar su rendimiento en el 2-ACT.

A continuación se describe en detalle el protocolo de entrenamiento:

**Habitación:** las ratas fueron llevadas en sus jaulas (grupos de 3) al equipo de entrenamiento y permanecieron en el por diez minutos, luego fueron regresadas a la habitación donde se criaron. Posteriormente se llevó a cabo una segunda habitación, en la cual los animales se llevaron individualmente en cajas de transporte negras hasta el equipo de entrenamiento, en donde se expusieron manualmente a los tonos de 1 kHz y 15 kHz alternados.

**Condicionamiento:** Las ratas se privaron de agua durante la noche. En los primeros días de entrenamiento se les dio agua en el puerto central, y seguidamente se les expuso de forma manual a los dos tipos de tonos, dándoles gotas de agua en el puerto correspondiente a cada tono. Luego se les aplicó el programa 1 y 2 con el programa Pacwin 2.0. El programa 1 consistió en generar un tono de 15 kHz y la caída de agua en el puerto izquierdo, una vez que la rata introdujo el hocico en el puerto central. El programa 2 consistió en generar el sonido de 1 kHz y la caída de agua en el puerto derecho cuando la rata introdujo el hocico en el puerto central.

**Tarea:** Consistió en 50 ensayos de la prueba 2-ACT (programa Random 50). Al introducir la rata su hocico en el puerto central, el equipo emitió al azar un tono, el cual pudo ser de 1 o 15 kHz, cayendo una gota de agua (recompensa) cuando la rata logró introducir su hocico en el puerto correspondiente al tono emitido. El último día se seleccionaron las ratas que tuvieron un rendimiento sobre el 70% (de ensayos correctos) y se grabaron los ensayos para el análisis posterior. Todos los grupos experimentales fueron homogéneos respecto al rendimiento que tuvieron los animales en la prueba 2-

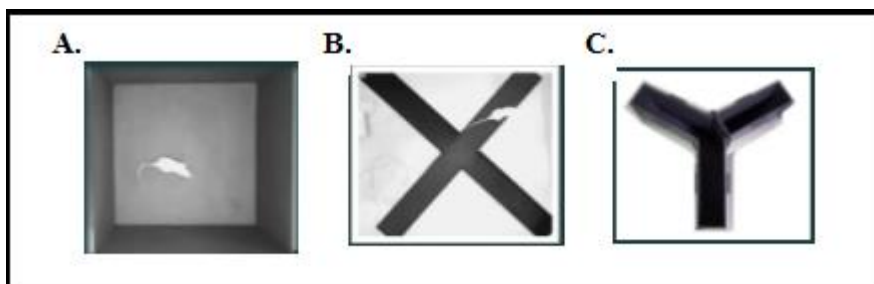
ACT. Los animales que tuvieron un rendimiento inferior al 70 % de ensayos correctos en el 2-ACT permanecieron vivos junto a sus hermanos hasta el final del experimento.

### **3.1.- Obtención de los datos**

Se aplicaron 50 ensayos un día antes y un día después del protocolo de estrés (Esquema 1). Se realizó una resta entre el número de ensayos correctos obtenidos por cada animal después del periodo de estrés, menos el número de ensayos correctos obtenidos antes del estrés, a esto se llamó Difference Score (DS). Por ejemplo, si una rata obtuvo un 70 % de ensayos correctos antes del periodo de estrés, lo cual corresponde a 35 ensayos correctos de 50 ensayos aplicados, y después del estrés crónico obtuvo un 50 % de ensayos correctos, entonces el DS para ese animal será de -20 % o -15 ensayos correctos. Este valor sería indicativo de un deterioro de la atención auditiva.

### **4.- Actividad Locomotora, Ansiedad y Memoria Espacial**

La evaluación de la actividad locomotora y la ansiedad cuantificadas a través de las pruebas de campo abierto y laberinto en cruz elevado fueron aplicadas 24 horas después del término del protocolo de estrés. En el día postnatal 65 se evaluó la memoria espacial a través del laberinto en Y (Esquema 1). El rendimiento de cada rata fue grabado por las cámaras IP (VIVOTEK, Sunnyvale CA, EE.UU.) que se fijaron encima de los laberintos. Los videos fueron adquiridos a través del programa Nuuo (Nuuo, Taipei, Taiwán) y analizados con el programa ANY-maze (Stoelting Co., Illinois, EE.UU.). En todos los experimentos los animales control y estrés fueron analizados al mismo tiempo. Luego de cada prueba los laberintos fueron limpiados con una solución de etanol al 5% para eliminar las pistas olfativas que dejan los animales.



**Figura 1.-** Fotos de los laberintos usados para cuantificar la actividad locomotora (A. Campo abierto), ansiedad (B. Laberinto en cruz elevado), y memoria especial (C. Laberinto en Y).

#### **4.1- Campo Abierto**

Este paradigma conductual se utilizó para analizar la actividad locomotora. Todo el procedimiento se realizó en una sala con temperatura controlada ( $21 \pm 1$  ° C). La rata se introdujo en el centro de una caja de acrílico negro (70 x 70 x 40 cm) (Fig. 1A) durante 5 minutos. El nivel de ruido en el centro del laberinto fue de 40 dB (sonómetro de precisión, modelo # 1100, Quest Technologies, Oconomowoc, WI) y se iluminó a  $300 \pm 20$  luxs (medidor digital de Lux, modelo # LX-1010B, Weafo Instrument Co., Shanghai, China). En los videos obtenidos se analizó la distancia total recorrida y la velocidad media a través del programa ANY-maze (Stoelting Co., Illinois, EE.UU.).

#### **4.2- Laberinto en Cruz Elevado**

Aproximadamente después de 10 segundos del término del análisis de la actividad locomotora se realizó la prueba del laberinto en cruz elevado. Este paradigma conductual estaba formado por dos brazos abiertos (60 cms de largo x 15 cms de ancho), dos brazos cerrados (60 cms de largo x 15 cms de ancho x 30 cms de alto) y una plataforma central (15 x 15 cms) (Fig. 1B). La iluminación fue de  $300 \pm 10$  luxs en los brazos abiertos y  $210 \pm 10$  luxs en los brazos cerrados. El laberinto se encontraba elevado 100 cms sobre el nivel del suelo. Las ratas fueron depositadas individualmente en el centro del laberinto frente a un brazo abierto. La prueba duró 5 minutos. Se registró el número de entradas a los brazos abiertos y cerrados, el número total de entradas y la relación entre las entradas al brazo abierto y las entradas totales (abierto / total x 100). La entrada del animal a cada uno de los brazos se contabilizó cuando este ingresó con sus cuatro extremidades.

#### **4.3- Laberinto en Y**

Este paradigma conductual se utilizó para cuantificar la memoria espacial de las ratas y se llevó a cabo al día siguiente de las pruebas de campo abierto y laberinto en cruz elevado. El laberinto en Y consistió en tres brazos iguales de acrílico negro (58 cms de largo x 19 cms de ancho y 38 cms de alto) los cuales están dispuestos en forma de una Y (Fig. 1C). En las paredes alrededor del laberinto en Y hay señales o pistas visuales, las ratas usan estas pistas para ubicarse espacialmente dentro del laberinto. Los tres



brazos fueron designados como inicio, nuevo y alterno, los animales de los grupos control y estrés fueron evaluadas al mismo tiempo. La prueba consistió en dos partes, durante la primera parte se bloqueó la entrada al brazo nuevo y se depositó la rata en el brazo de inicio, pudiendo explorar solo el brazo alterno e inicio durante 15 minutos. Luego se regresó al animal a la habitación donde se criaron usando una caja de transporte. Cuatro horas después la rata fue regresada al laberinto y se depositó nuevamente en el brazo de inicio, pero esta vez con acceso a todos los brazos, entonces la rata pudo explorar durante 5 minutos todos los brazos del laberinto en Y. Se registró el número de entradas al brazo nuevo, al brazo alterno y el total de entradas. Se determinó un % del Difference Score restando el porcentaje de entradas al brazo nuevo menos el porcentaje de entradas al alterno. Entonces una rata con buena memoria entra más veces al brazo nuevo respecto al alterno y su % DS será positivo. La entrada del animal en uno de los brazos se contabilizó cuando este ingresó con sus cuatro extremidades.

### **5.- Análisis Estadístico**

Los estudios de la actividad locomotora, la ansiedad, la memoria espacial, fueron analizados con el t-test de datos no pareados, al igual que el análisis del total del DS de las respuestas correctas (DS-RC), el DS de las latencias de RC (DS-L-RC) y el DS del ITI (DS-ITI).

La ganancia de peso y el análisis por bloques de ensayos del DS-RC, el DS-L-RC, y el DS-ITI fue a través de la estadística no paramétrica utilizando un análisis de varianza de mediciones repetidas (ANOVA de dos vías). Como post test se usó la prueba de Bonferroni.

- Se cuantificó la ganancia de peso de las ratas, en donde la variable dependiente fue el peso y las variables independientes fueron las distintas condiciones (control, estrés, control vehículo, estrés vehículo, control reboxetina y estrés reboxetina).
- Se cuantificaron las respuestas correctas en la prueba 2-ACT, en donde la variable dependiente fueron las RC y las variables independientes fueron las distintas condiciones (control, estrés, control vehículo, estrés vehículo, control reboxetina y estrés reboxetina).
- Se cuantificó el tiempo utilizado en cada respuesta correcta en los 50 ensayos (L-RC), en donde la variable dependiente fue la L-RC y las variables

independientes fueron las distintas condiciones (control, estrés, control vehículo, estrés vehículo, control reboxetina y estrés reboxetina).

- Se cuantificó el tiempo entre ensayos (ITI), en donde la variable dependiente fue el ITI y las variables independientes fueron las distintas condiciones (control, estrés, control vehículo, estrés vehículo, control reboxetina y estrés reboxetina).

Todos los datos se presentan como promedios y el error de medición estándar (SEM). Los niveles de probabilidad menores o igual a 0.05, fueron considerados estadísticamente significativos. Se usó el programa estadístico GraphPad.

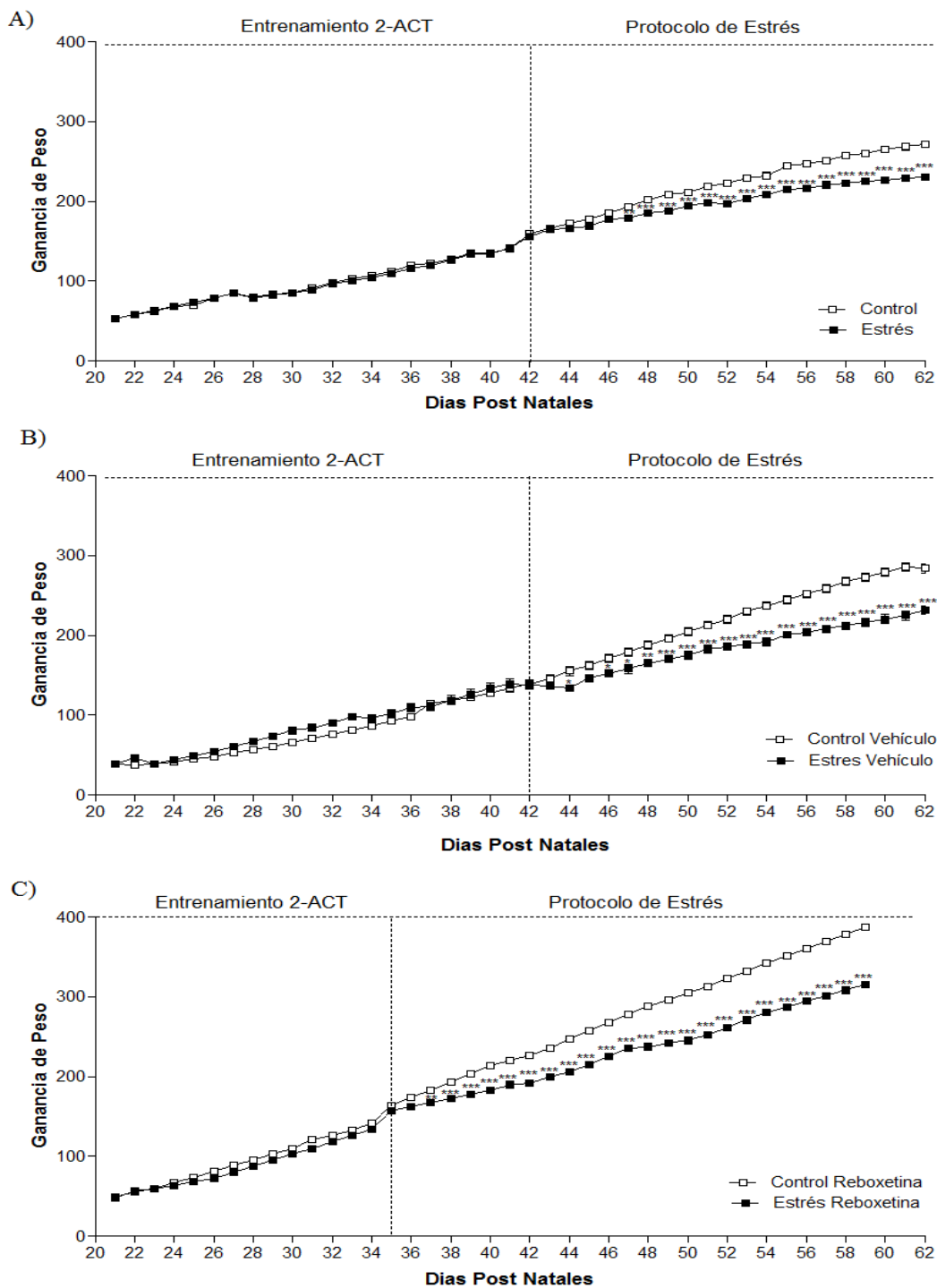
## Resultados

### ***Ganancia de peso***

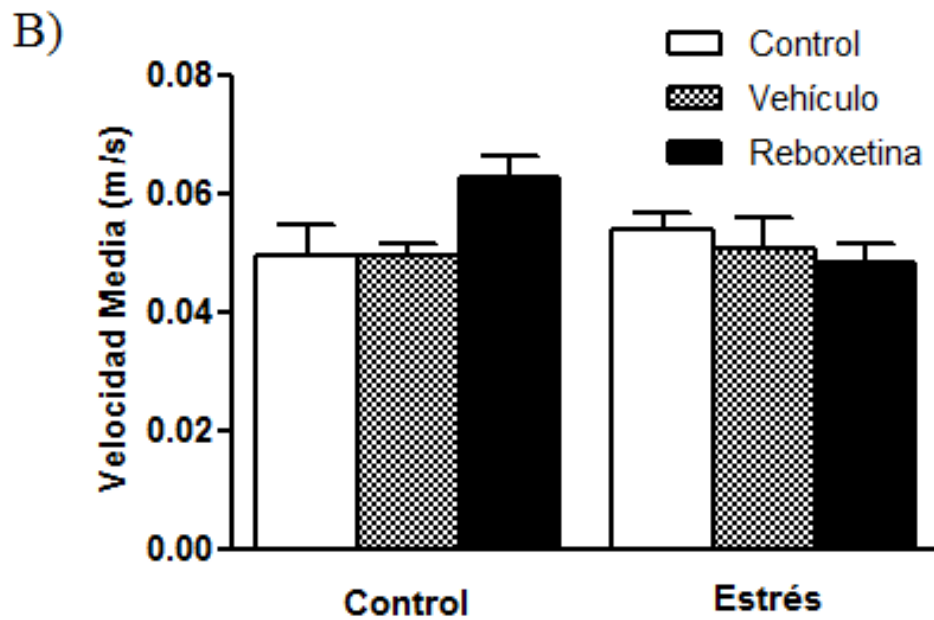
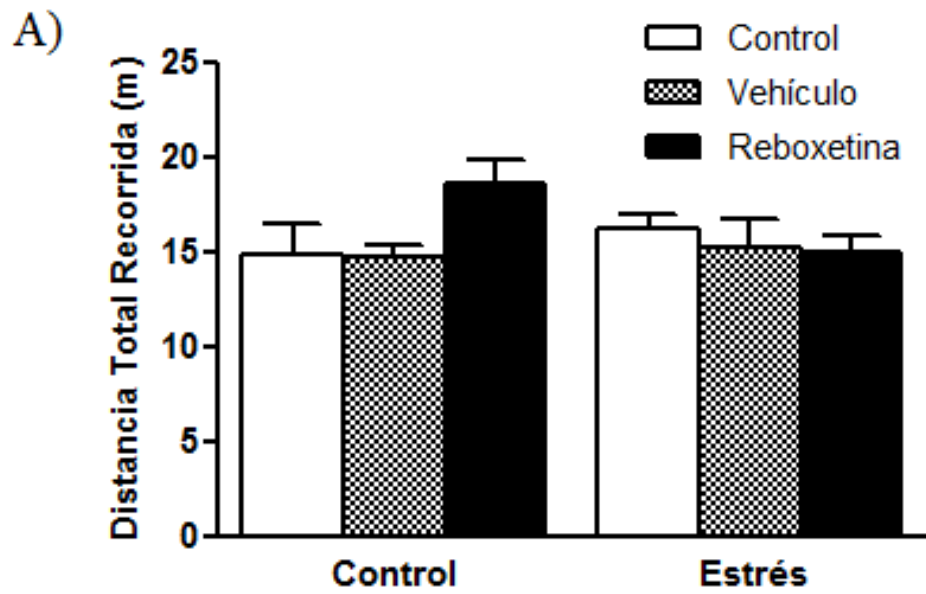
El entrenamiento en el paradigma 2-ACT no afectó la ganancia en los animales de los grupos experimentales. (Fig. 2A-C). El estrés por restricción de movimiento produjo una disminución en la ganancia de peso respecto a los controles (Fig. 2A). El análisis estadístico demostró que la disminución de la ganancia de peso comenzó desde el día 6 del protocolo de estrés en los grupos controles y vehículo (Fig. 2A,B), mientras que en el grupo de reboxetina este efecto comenzó en el día 3 del protocolo de estrés (Fig. 2C). El análisis estadístico mostró que la interacción entre el estrés y los días transcurridos fue significativa en todos los grupos experimentales (Control:  $F_{(41,738)} = 47.5$ ,  $p < 0.0001$ ; Vehículo:  $F_{(41,738)} = 53.7$ ,  $p < 0,0001$ ; Reboxetina:  $F_{(38,684)} = 276.3$ ,  $p < 0.0001$ ). El estrés crónico también tuvo un efecto significativo en cada grupo experimental (Control:  $F_{(1,738)} = 15.93$ ,  $p < 0,0001$ ; Vehículo:  $F_{(41,738)} = 7.12$ ,  $p = 0.016$ ; Reboxetina:  $F_{(1,684)} = 85.01$ ,  $p < 0.0001$ ).

### ***Actividad Locomotora***

El estrés crónico, las inyecciones con vehículo y reboxetina no afectaron la actividad locomotora. No hubo diferencia en la distancia recorrida total (Control:  $14.9 \pm 1.5$ , Estrés:  $16.3 \pm 0.8$ ,  $p > 0.05$ ; Control + Vehículo:  $14.7 \pm 0.6$ , Estrés + Vehículo:  $15.2 \pm 1.4$ ,  $p > 0.05$ ; Control + Reboxetina:  $18.6 \pm 1.2$ , Estrés + Reboxetina:  $15.0 \pm 0.9$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 3A), ni en la velocidad media (Control:  $0.049 \pm 0.005$ , Estrés:  $0.054 \pm 0.003$ ,  $p > 0.05$ ; Control +Vehículo:  $0.049 \pm 0.002$ , Estrés + Vehículo:  $0.051 \pm 0.05$ ,  $p > 0.05$ ; Control + Reboxetina:  $0.062 \pm 0.002$ , Estrés + Reboxetina:  $0.048 \pm 0.002$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 3B).



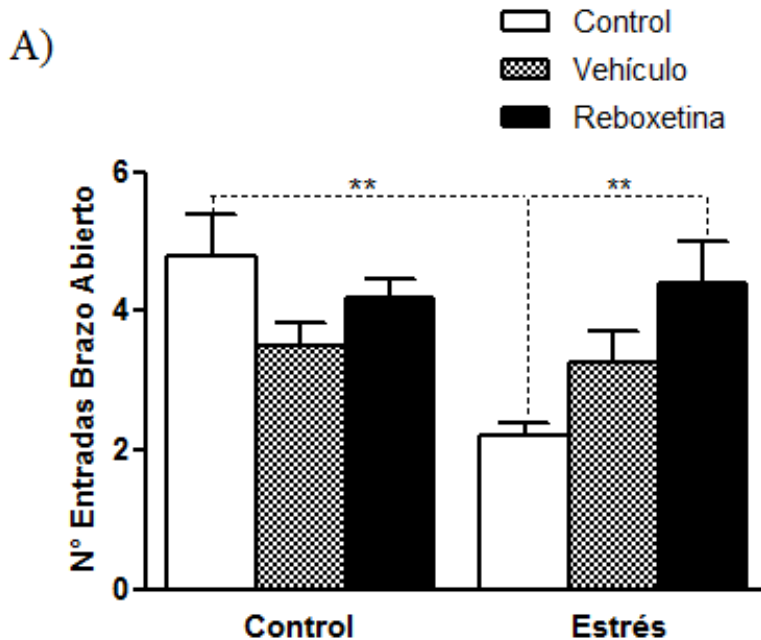
**Figura 2.-** Efecto del entrenamiento en el paradigma de lección de dos alternativa (2-ACT) y el estrés crónico sobre la ganancia de peso. A, grupo control; B, grupo vehículo; C. grupo reboxetina. Los datos están representados como promedio  $\pm$  SEM.

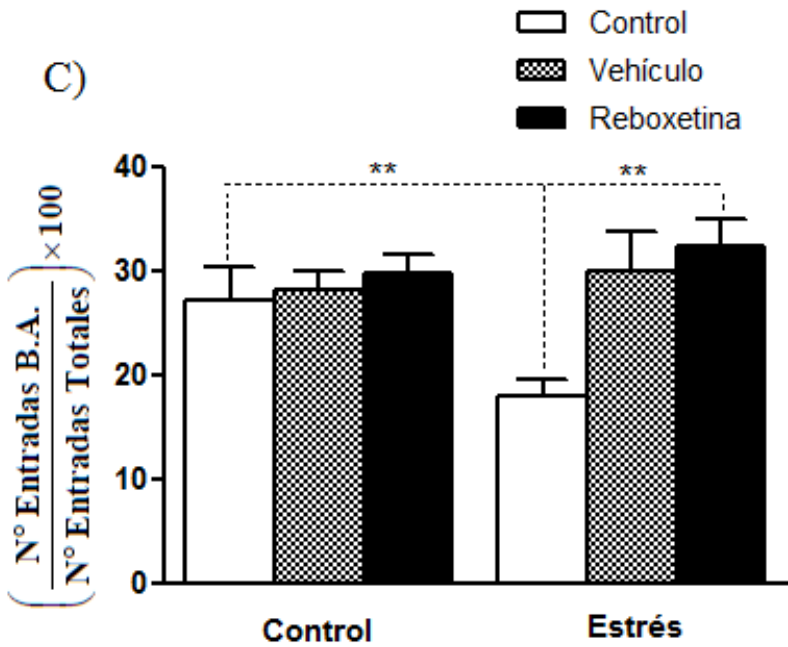
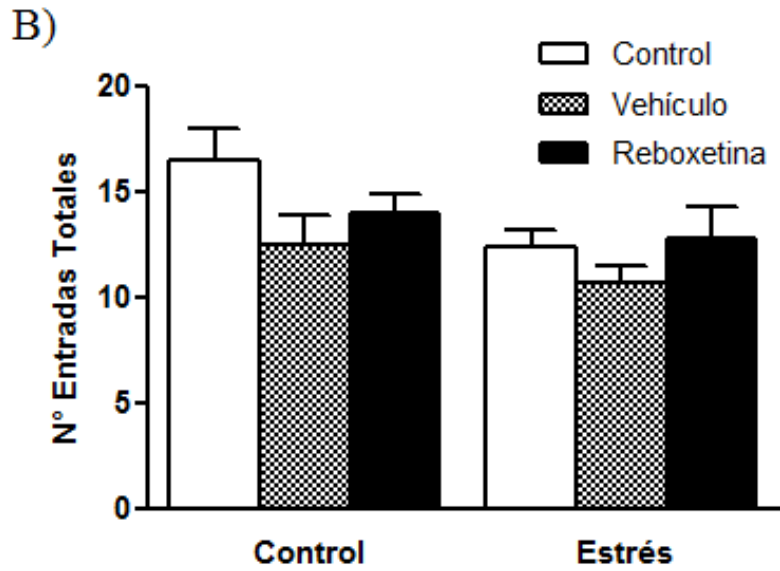


**Figura 3.-** Efecto del estrés crónico y los tratamientos sobre la actividad locomotora de los animales. A) Distancia recorrida y B) velocidad media en el laberinto de campo abierto. Los datos están representados como el promedio  $\pm$  SEM.

## Ansiedad

El estrés crónico disminuyó significativamente el número de entradas al brazo abierto del laberinto en cruz elevado (Control:  $4.8 \pm 0.6$ ; Estrés:  $2.2 \pm 0.2$ ;  $p < 0.05$ ), los animales de los grupos de vehículo y reboxetina no se vieron afectados (Control + Vehículo:  $3.50 \pm 0.32$ , Estrés + Vehículo:  $3.26 \pm 0.44$ ,  $p > 0.05$ ; Control + Reboxetina:  $4.18 \pm 0.28$ , Estrés + Reboxetina:  $4.40 \pm 0.59$ ,  $p > 0.05$ ) (fig. 4A). Los tratamientos con vehículo y reboxetina no afectaron el número de entradas totales a los brazos del laberinto (Control:  $16.50 \pm 1.44$ , Estrés:  $12.40 \pm 0.74$ ,  $p > 0.05$ ; Control + Vehículo:  $12.50 \pm 1.41$ , Estrés + Vehículo:  $10.71 \pm 0.78$ ,  $p > 0.05$ ; Control + Reboxetina:  $14.00 \pm 0.86$ , Estrés + Reboxetina:  $12.80 \pm 1.46$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 4B). El estrés crónico disminuyó significativamente la razón del número de entradas solo en el grupo control (Control:  $25.14 \pm 3.06$ , Estrés:  $17.85 \pm 1.48$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 4C).

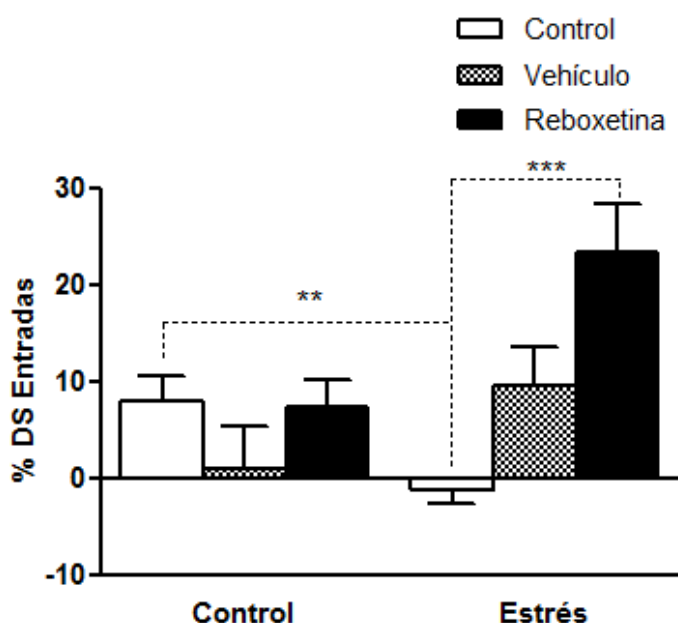




**Figura 4.-** Efecto del estrés sobre la ansiedad. A. Número de entradas al brazo abierto (B.A.) del laberinto en cruz elevado, B. Número total de entradas a los brazos del laberinto. C. Razón del número de entradas. Los datos están representados como el promedio  $\pm$  SEM.

### Memoria Espacial

El estrés crónico disminuyó significativamente el % DS de las entradas en el laberinto en Y (Control:  $7.96 \pm 2.48$ , Estrés:  $-1.30 \pm 1.41$ ,  $p < 0.05$ ), los animales del grupo vehículo no mostraron diferencias significativas (Control + Vehículo:  $0.99 \pm 4.31$ , Estrés + Vehículo:  $9.53 \pm 3.96$ ,  $p > 0.05$ ), pero el tratamiento con reboxetina tuvo un efecto positivo en el desempeño de las ratas estresadas (Control + Reboxetina:  $7.24 \pm 2.97$ , Estrés + Reboxetina:  $23.36 \pm 4.93$ ,  $p > 0.05$ ) (fig. 5).



**Figura 5.-** Efecto del estrés crónico sobre la memoria espacial de las ratas. Se muestra el %DS de las entradas obtenidos por los animales en el laberinto en Y. Los datos están representados como el promedio  $\pm$  SEM.

### Atención Auditiva

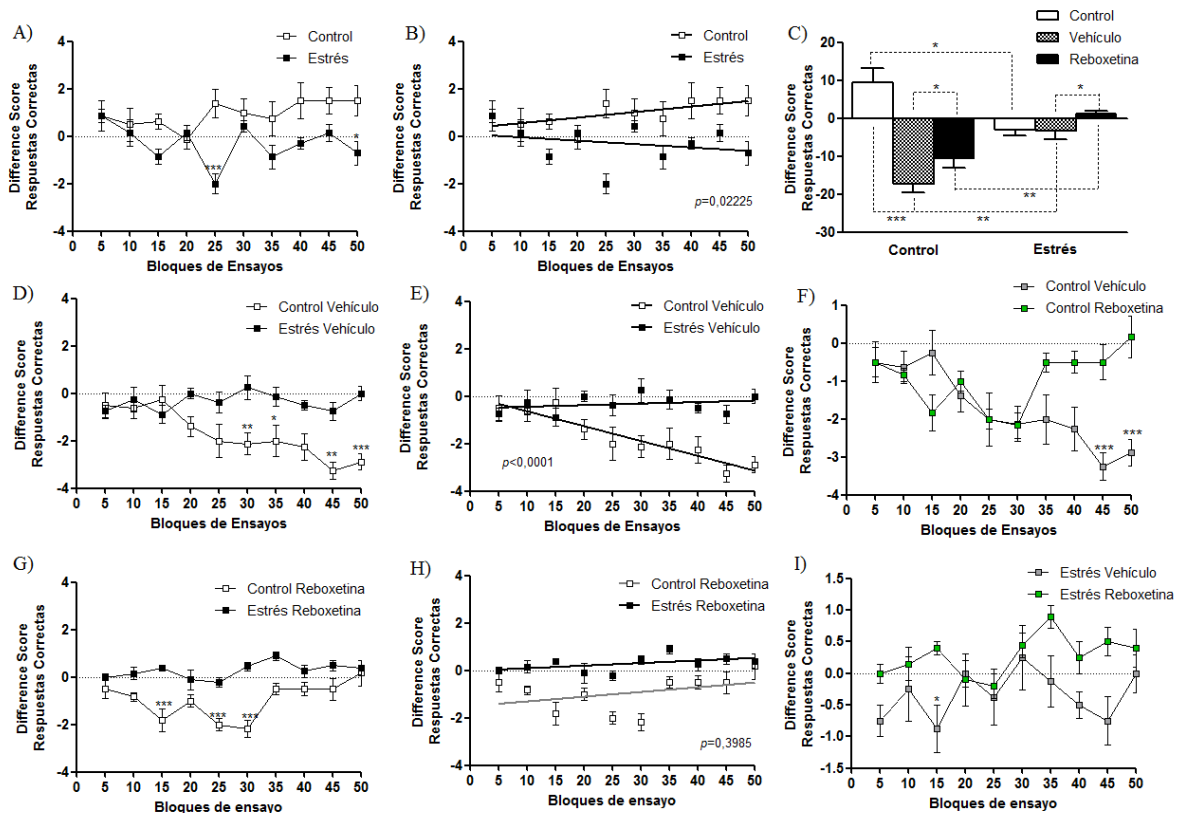
Existe una interacción significativa entre el estrés y los ensayos al comparar los resultados de los animales del grupo control y estrés crónico ( $F_{(9,162)} = 3.06$ ,  $p = < 0.01$ ) (Fig. 6A). También el estrés crónico como tratamiento disminuyó significativamente el número de respuestas correctas ( $F_{(1,162)} = 9.73$ ,  $p < 0.005$ ) (Fig. 6A). Al comparar las pendientes del DS-RC se encontró una diferencia significativa entre los grupos control y estrés crónico ( $F_{(1,196)} = 5.31$ ,  $< 0.05$ ) (Fig. 6B). El análisis del total de DS-RC demuestra que el estrés crónico disminuyó significativamente el DS-RC (Control:  $9.50 \pm 3.63$ , Estrés:  $-3.00 \pm 1.69$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 6C).



Al analizar los grupos Control + Vehículo y Estrés + Vehículo con el ANOVA de dos vías se observa un efecto significativo del estrés crónico ( $F_{(1,162)} = 3.01, p < 0.0004$ ) y de los ensayos ( $F_{(9,162)} = 2.74, p < 0.005$ ) respecto a los controles (Fig. 6D y 6E respectivamente). La interacción entre el tratamiento (estrés crónico) y los ensayos también tuvo un efecto significativo ( $F_{(9,162)} = 4.09, p < 0.0001$ ) (Fig. 6D). Las pendientes de los grupos fueron significativamente diferentes ( $F_{(1,196)} = 24.67, p < 0.0001$ ) (Fig. 6E) y el análisis del total de DS-RC mostró que los animales del grupo Estrés + Vehículo tuvieron un mejor rendimiento en la prueba 2-ACT comparado con los animales del grupo Control + Vehículo (Control + Vehículo:  $-17.25 \pm 2.28$ , Estrés + Vehículo:  $-3.37 \pm 2.26, p < 0.05$ ) (Fig. 6C).

Al comparar los resultados obtenidos los animales de los grupos de Control + Reboxetina y Estrés + Reboxetina mostraron una interacción significativa entre el estrés crónico y los ensayos ( $F_{(9,162)} = 3.86, p < 0.0001$ ) (Fig. 6G). También se observó un efecto significativo del tratamiento, que en este caso fue la reboxetina, ( $F_{(1,162)} = 28.07; p < 0.0001$ ) y los ensayos ( $F_{(9,162)} = 5.52, p < 0.0001$ ) (Fig. 6G). Al comparar las pendientes no se observó diferencia entre ambos grupos experimentales ( $F_{(1,196)} = 0.716, p = 0.39$ ) (Fig. 6H). El análisis del total del DS-RC mostró que el grupo Estrés + Reboxetina tuvo un mejor rendimiento en la prueba en relación a los animales del grupo Control + Reboxetina (Control + Reboxetina:  $-10.67 \pm 2.31$ , Estrés + Reboxetina:  $1.22 \pm 0.67, p < 0.0007$ ) (Fig. 6C).

Cuando se comparan separadamente los resultados de los grupos Control + Vehículo y Control + Reboxetina se observa que los últimos 10 ensayos el tratamiento con reboxetina mejoró significativamente el rendimiento de las ratas en la prueba 2-ACT (Interacción:  $F_{(9,196)} = 6.41, p < 0.0001$ ; Tratamiento (reboxetina):  $F_{(1,196)} = 5.53, p = 0.03$ ; DS-RC total: Control + Vehículo:  $-17.25 \pm 2.28$ , Control + Reboxetina:  $-10.67 \pm 2.31, p < 0.05$ ) (Fig. 6F). Un efecto similar se encontró al comparar los animales del grupo Estrés + Vehículo y Estrés + Reboxetina (Tratamiento (reboxetina):  $F_{(1,196)} = 6.99, p = 0.01$ ; DS-RC total: Estrés + Vehículo:  $-3.37 \pm 2.26$ , Estrés + Reboxetina:  $1.22 \pm 0.67, p < 0.05$ ) (Fig. 6I).

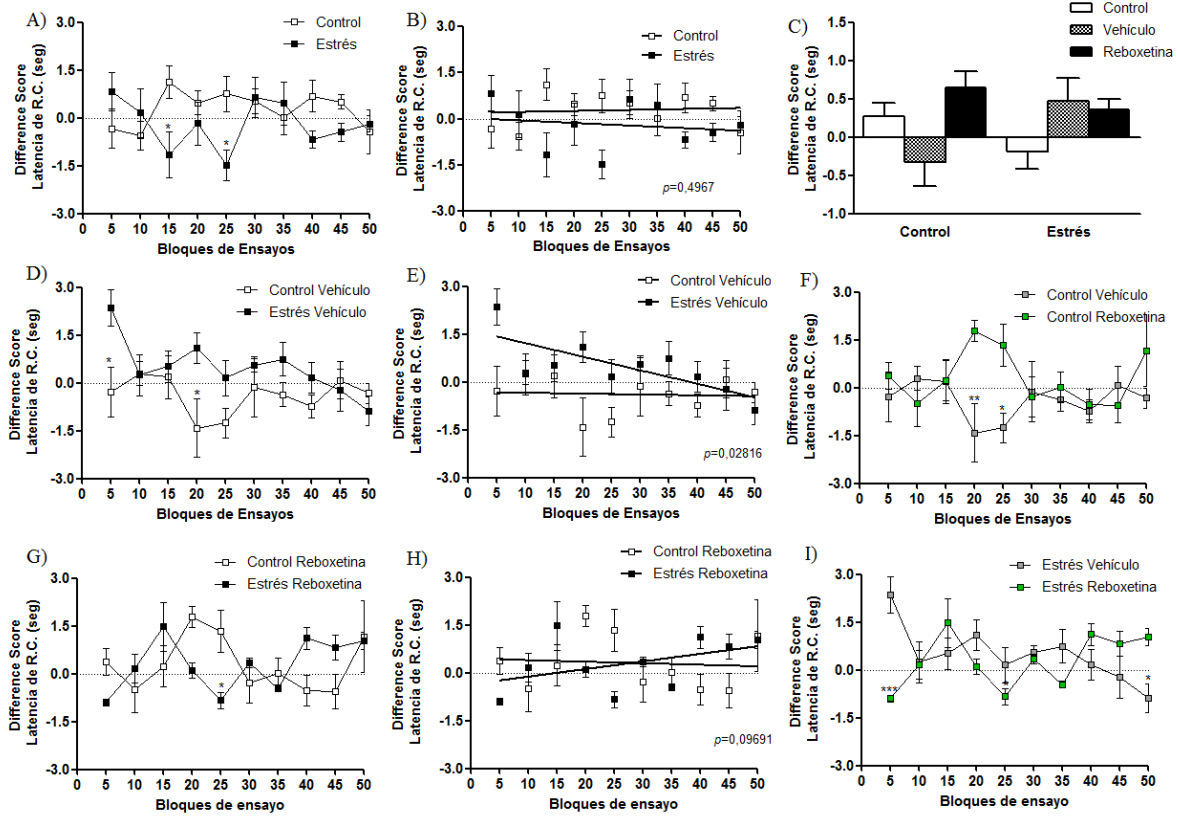


**Figura 6.-** Efecto del estrés crónico y los tratamientos sobre la atención auditiva. A.D.G, Difference Score de las respuestas correctas por bloques de ensayo en la prueba de atención. B.E.H, Análisis de regresión lineal. C, Total del Difference Score de las respuestas correctas de todos los grupos. F, Comparación del DS- RC de los grupos Control + Vehículo y Control + Reboxetina. I, Comparación del DS-RC de los grupos Estrés + Vehículo y Estrés + Reboxetina. Los datos están representados como el promedio  $\pm$  SEM.

### ***Latencia de las Respuestas Correctas en la Prueba de Atención)***

Existe una interacción significativa entre el tratamiento y los ensayos en todos los grupos experimentales (Control y Estrés:  $F_{(9,162)} = 2.67$ ,  $p = 0.006$ ; Control + Vehículo y Estrés + Vehículo:  $F_{(9,162)} = 2.26$ ,  $p = 0.02$ ; Control + Reboxetina y Estrés + Reboxetina:  $F_{(9,162)} = 3.35$ ,  $p = 0.0009$ ) (Fig. 7A,D,G). Al comparar las pendientes no se encontró diferencia en los grupos Control y Estrés ( $F_{(1,162)} = 0.46$ ,  $p = 0.49$ ) y en los Control + Reboxetina y Estrés + Reboxetina:  $F_{(1,162)} = 2.78$ ,  $p = 0.09$ , pero si hubo diferencia en las pendientes de los grupos Control + Vehículo y Estrés + Vehículo ( $F_{(1,162)} = 4.89$ ,  $p = 0.03$ ) (Fig. 7B,E,H). Al comparar el efecto del estrés crónico en el total de los DS-L-RC no se encontró diferencia (Control:  $0.28 \pm 0.17$ , Estrés:  $-0.19 \pm 0.22$ ,  $p > 0.05$ ; Control + Vehículo:  $-0.33 \pm 0.31$ , Estrés + Vehículo:  $0.48 \pm 0.29$ ,  $p > 0.05$ ; Control + Reboxetina:  $0.65 \pm 0.23$ , Estrés + Reboxetina:  $0.36 \pm 0.14$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 7C).

Al comparar individualmente los resultados de los grupos Control + Vehículo y Control + Reboxetina se observa que la reboxetina no produce un efecto significativo en la latencia de las respuestas correctas en la prueba de atención. Tratamiento (reboxetina):  $F_{(1,162)} = 4.09$ ,  $p > 0.05$ ; Interacción:  $F_{(9,162)} = 2.38$ ,  $p < 0.05$ , (Fig. 7F); DS-L-RC total: Control + Vehículo:  $-0.33 \pm 0.31$ , Control + Reboxetina:  $0.65 \pm 0.23$ ,  $p > 0.05$ , (Fig. 7C). Un efecto similar se encontró al comparar los animales del grupo Estrés + Vehículo y Estrés + Reboxetina (Interacción:  $F_{(9,162)} = 6.84$ ,  $p < 0.05$ , (Fig. 7I); DS-L-RC total: Estrés + Vehículo:  $0.48 \pm 0.29$ , Estrés + Reboxetina:  $0.36 \pm 0.14$ ,  $p > 0.05$ , (Fig. 7C).



**Figura 7.-** Efecto del estrés crónico y los tratamientos sobre la latencia de las respuestas correctas en la prueba de atención. A.D.G, Difference Score de la latencia de las respuestas correctas por bloques de ensayo. B.E.H, Análisis de regresión lineal. C, Total del DS-L-RC de todos los grupos. F, Comparación del DS-L-RC de los grupos Control + Vehículo y Control + Reboxetina. I, Comparación del DS-L-RC de los grupos Estrés + Vehículo y Estrés + Reboxetina. Los datos están representados como el promedio  $\pm$  SEM.

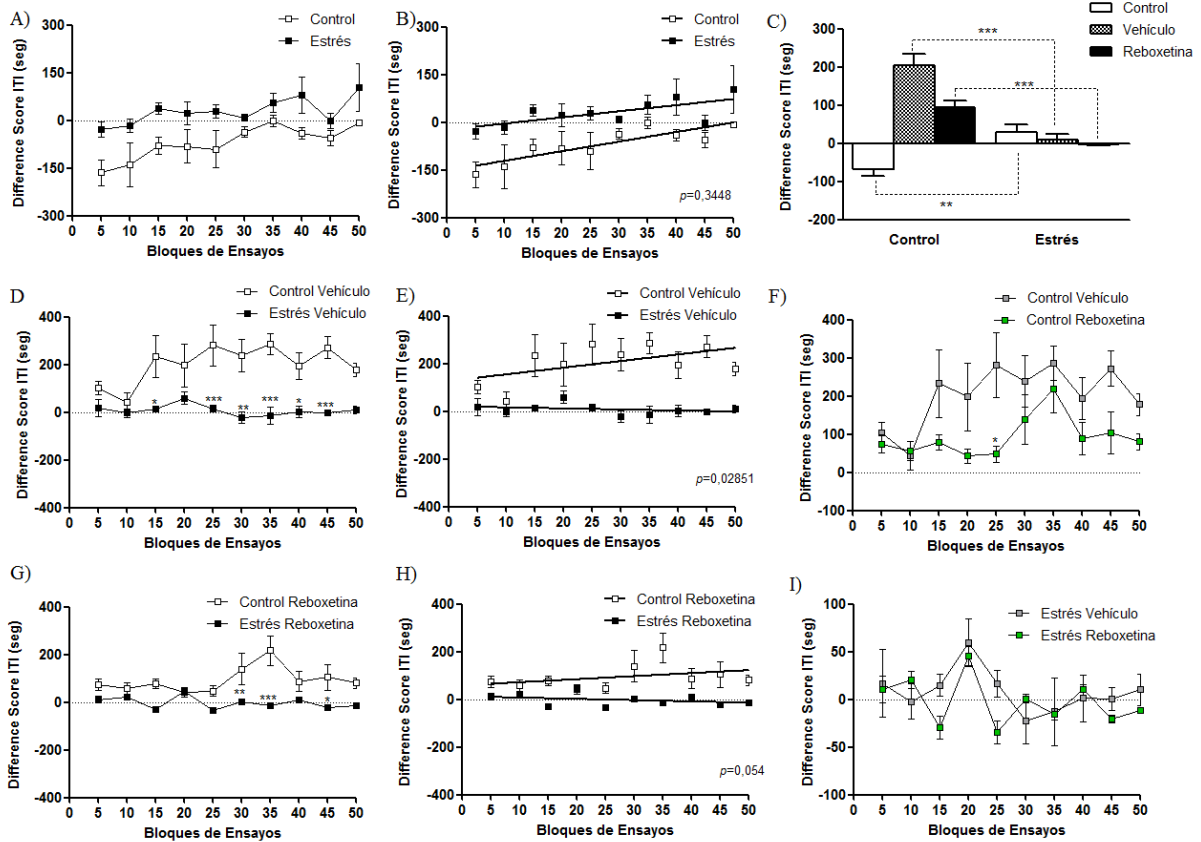
### **Tiempo Entre Ensayos (ITI)**

Al comparar el DS-ITI de los grupos Control y Estrés por bloques de ensayos se observó un efecto significativo de los ensayos ( $F_{(9,162)} = 3.41$ ,  $p = 0.0007$ ) y del tratamiento de estrés crónico ( $F_{(1,162)} = 13.64$ ,  $p = 0.002$ ) (Fig. 8A), siendo la interacción de ambos no significativa (Fig. 8A). El análisis de la regresión lineal mostró que las pendientes no fueron significativamente diferentes ( $F_{(1,162)} = 0.89$ ,  $p = 0.35$ ) (Fig. 8B). Al comparar el total del DS-ITI se observa que existe una diferencia significativa entre los grupos experimentales (Control:  $-68.93 \pm 18.03$ , Estrés:  $29.22 \pm 19.52$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 8C).

Los grupos Control + Vehículo y Estrés + Vehículo mostraron una interacción significativa entre los ensayos ( $F_{(9,162)} = 2.053$ ,  $p = 0.037$ ) y el tratamiento con vehículo ( $F_{(9,162)} = 2.053$ ,  $p = 0.037$ ) también fue significativo (Fig. 8D). Las pendientes de estos grupos experimentales fueron significativamente diferentes ( $F_{(1,162)} = 4.87$ ,  $p = 0.028$ ) (Fig. 8E), al igual que el total del DS-ITI (Control + Vehículo:  $203.20 \pm 30.26$ , Estrés + Vehículo:  $8.35 \pm 16.07$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 8C).

En los grupos Control + Reboxetina y Estrés + Reboxetina la interacción entre los ensayos y el tratamiento fue significativa ( $F_{(9,162)} = 2.72$ ,  $p = 0.005$ ) (Fig. 8G), al igual que el efecto del tratamiento ( $F_{(1,162)} = 28.75$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 8G). Al comparar las pendientes se observó que no fueron significativamente diferentes ( $F_{(1,162)} = 3.76$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 8H). Sin embargo, el análisis del total del DS-ITI si fue significativo entre estos grupos experimentales (Control + Reboxetina:  $93.55 \pm 17.64$ , Estrés + Reboxetina:  $-2.25 \pm 2.86$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 8C).

Al comparar individualmente los resultados de los grupos Control + Vehículo y Control + Reboxetina se observa que el tratamiento con reboxetina tuvo un efecto significativo ( $F_{(1,162)} = 9.80$ ,  $p = 0.005$ ) (Fig. 8G), disminuyendo el DS-ITI. Esto también se observó al comparar el total del DS-ITI (Control + Vehículo:  $203.20 \pm 30.26$ , Control + Reboxetina:  $93.55 \pm 17.64$ ,  $p < 0.005$ ) (Fig. 8C). En los animales del grupo Estrés + Vehículo y Estrés + Reboxetina no hay diferencia significativa (Tratamiento (reboxetina):  $F_{(9,162)} = 0.42$ ,  $p = 0.52$  (Fig. 8I); DS-ITI total: Estrés + Vehículo:  $8.35 \pm 16.07$ , Estrés + Reboxetina:  $-2.25 \pm 2.86$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 8C).



**Figura 8.-** Efecto del estrés crónico y los tratamientos sobre DS del tiempo entre ensayos. A.D.G, Difference Score del ITI por bloques de ensayo. B.E.H, Análisis de regresión lineal. C, Total del DS-ITI de todos los grupos. F, Comparación del DS-ITI de los grupos Control + Vehículo y Control + Reboxetina. I, Comparación del DS-ITI de los grupos Estrés + Vehículo y Estrés + Reboxetina. Los datos están representados como el promedio  $\pm$  SEM.

## **Discusión**

En esta tesis se demuestra que el tratamiento con reboxetina produce 3 efectos importantes en las ratas estresadas: un efecto ansiolítico, que previene el deterioro que induce el estrés crónico en la memoria espacial y la atención auditiva de las ratas. Estos dos últimos efectos no han sido descritos previamente en la literatura científica, el efecto de la reboxetina sobre la ansiedad fue descrito en parte mientras se desarrollaba esta tesis.

### ***Marcadores del Estrés***

#### ***Ganancia de Peso:***

El primer paso de esta investigación fue analizar si el protocolo de estrés que se usó tuvo un efecto significativo en las ratas. Analizamos dos marcadores de estrés crónico ampliamente usados, la ganancia de peso y la ansiedad. La figura 2 muestra que el estrés crónico disminuye significativamente la ganancia de peso de los animales, este efecto pudo haber ocurrido por el aumento de la actividad del eje HPA y del sistema simpático a nivel periférico. El estrés crónico produce un aumento de la liberación de la corticosterona desde las glándulas adrenales (Cook y Wellman, 2004), esta hormona cuando es aplicada en forma oral produce una disminución de la ganancia de peso en las ratas (Dagnino-Subiabre y cols., 2012). La corticosterona aumenta la secreción de insulina (la Fleur y cols., 2011), esto puede inducir en las ratas estresadas un aumento del gasto energético durante las respuestas de lucha y escape. La disminución de la glucosa plasmática podría aumentar el catabolismo de los lípidos y así aumentar el anabolismo de la glucosa y tratar de compensar la disminución de la glicemia que genera el estrés crónico. En este sentido, un aumento de la actividad del sistema simpático inducido por el estrés crónico aumenta la frecuencia cardíaca, este efecto al prolongarse en el tiempo tiene un gran costo energético, lo cual podría originar en parte la disminución de la ganancia de peso en las ratas estresadas respecto a los controles. También es posible que el aumento de liberación de adrenalina desde las glándulas suprarrenales inducido por el estrés active a los receptores beta 3 en el tejido adiposo y active la lipólisis, esto podría favorecer a la disminución de la ganancia de peso en los animales estresados.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que las ratas estresadas y controles tienen un consumo de alimento similar, esto descartaría que la disminución de la ganancia de peso pudiera haber ocurrido por una disminución del consumo de alimentos.

El tratamiento con reboxetina no previno el efecto del estrés crónico sobre la ganancia de peso. La reboxetina aumenta la concentración de noradrenalina en el cerebro ya que es un inhibidor de la recaptación de noradrenalina, este efecto podría potenciar el aumento de la actividad del eje HPA en las ratas estresadas ya que el núcleo paraventricular del hipotálamo recibe aferencias desde el locus coeruleus. Como resultado de esta alteración se podría aumentar la concentración plasmática de corticosterona y potenciar los efectos de esta hormona respecto a la disminución de la ganancia de peso que produce (Dagnino-Subiabre y cols., 2012).

Por otro lado, la mayoría de los estresores activan el hipotálamo a través de los aferentes noradrenérgicos que llegan desde el locus coeruleus, dentro del hipotálamo está el núcleo paraventricular que, junto al complejo amigdaloides, regulan el apetito (Yu y Kim, 2012). La insulina y la leptina son hormonas que regulan el apetito a través de receptores que tienen en el núcleo arcuato ubicado en el hipotálamo (Yu y Kim, 2012). Si el estrés crónico aumenta la liberación de corticosterona y esta hormona aumenta la secreción de insulina (la Fleur y cols., 2011), entonces es posible que en las ratas estresadas tanto la insulina y la leptina contribuyan al aumento de la actividad del eje HPA y la disminución de la ganancia de peso.

### ***Actividad Locomotora y Ansiedad:***

El estrés crónico tuvo un efecto ansiogénico en las ratas entrenadas en el 2-ACT y el tratamiento con reboxetina tuvo un efecto ansiolítico (Fig. 4). Estos efectos no fueron inducidos por alteraciones en la actividad locomotora de los animales ya que el estrés crónico y el tratamiento con reboxetina no afectaron la distancia recorrida ni la velocidad de las ratas en el laberinto de campo abierto (Fig. 3).

El complejo amigdaloides regula la conducta ansiosa (Davis y cols, 2010). Las ratas estresadas presentan hipertrófia dendrítica en las neuronas estrelladas y piramidales ubicadas en la amígdala lateral, un subnúcleo del complejo amigdaloides (Vyas y cols., 2002; Mitra y cols., 2005). Estas alteraciones morfológicas están correlacionadas con un aumento de la excitabilidad en las neuronas ubicadas en la amígdala basolateral (Rozenckatz y cols., 2010) y en el lecho de la estría terminal o amígdala extendida (Gonell



y cols., 2011). Por lo tanto, es posible que la base neurobiológica del aumento de ansiedad que tuvieron las ratas estresadas usadas en esta investigación, estuvo relacionada con la hipertrofia dendrítica y aumento de la excitabilidad en la amígdala basolateral producida por el estrés crónico. El efecto ansiolítico de la reboxetina pudo haber sido originado por una disminución de la actividad neuronal en la amígdala basal ya que esta área del cerebro regula la conducta ansiosa a través de la amígdala extendida (Davis y cols, 1998).

### ***Efecto del Estrés Crónico sobre la Memoria Espacial:***

El estrés crónico deterioró la memoria espacial de las ratas entrenadas en el 2-ACT (Fig. 5). El hipocampo regula la memoria espacial y el estrés crónico produce atrofia de las neuronas ubicadas en el área CA3c del hipocampo y disminuye la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo de ratas (Vyas y cols, 2002; McLaughlin y cols, 2007; Conrad, 2010). Es probable que el protocolo de estrés usado en los experimentos de esta tesis haya producido estas alteraciones morfológicas en el hipocampo de las ratas entrenadas en la prueba 2-ACT, esto pudo afectar la adquisición de la memoria espacial relacionada con el laberinto en Y. La memoria tiene 3 pasos importantes: adquisición, consolidación y reconsolidación (Dudai, 2012). Cada uno de estos pasos se desarrolla en diferentes áreas del cerebro según el tipo de memoria, por ejemplo las memorias emocionales están más relacionadas con el complejo amígdaloide y las memorias espaciales están más relacionadas con el hipocampo. Durante el aprendizaje la memoria se adquiere en el cerebro, al final del periodo de aprendizaje la memoria se consolida (Dudai, 2012). Cada vez que la memoria se evoca después de la consolidación esta se vuelve frágil y el ambiente es capaz de remodelarla, este proceso se conoce como reconsolidación (Dudai, 2012). En el experimento del laberinto en Y se analizó la adquisición y consolidación de nuevas memorias después del periodo de estrés crónico, mientras que en la prueba de atención se estudió el efecto del estrés sobre la reconsolidación de memorias adquiridas previamente al periodo de estrés crónico. Entonces es posible concluir con los resultados del laberinto en Y, que el estrés crónico deteriora la consolidación de nuevas memorias en el cerebro de las ratas y pudo haber estado relacionado con la atrofia dendrítica que produce el estrés crónico en el hipocampo.

Las ratas estresadas que fueron tratadas con reboxetina presentaron una memoria espacial significativamente mayor que las ratas estresadas (Fig. 5). El tratamiento con reboxetina pudo haber prevenido la atrofia dendrítica que produce el estrés en el hipocampo y esto indujo que las ratas estresadas tratadas con reboxetina presentaron una memoria espacial similar a las ratas controles (Fig. 5).

Un resultado esperado durante esta investigación fue que las ratas estresadas que fueron inyectadas durante 21 días con vehículo habrían tenido una memoria espacial significativamente menor que las ratas controles tratadas con el vehículo. Sin embargo, las ratas controles y estresadas mostraron una memoria espacial similar (Fig. 5), es como si la aplicación de un estresor (estrés por restricción de movimiento) tiene un efecto negativo para la memoria pero la aplicación de dos estresores (estrés por restricción de movimiento + inyecciones diarias con vehículo) tengan un efecto positivo para la memoria. Estudios previos han demostrado que las ratas se habitúan a los estresores cuando estos se aplican repetidamente. Por ejemplo, el estrés por restricción de movimiento induce un aumento de la corticosterona plasmática durante la primera semana de aplicación del estresor, mientras que durante la tercera semana de estrés, el aumento de corticosterona inducido por el estresor es menor que el producido durante la primera semana de estrés (Galea y cols., 1997; Cook y Wellman, 2004). Este fenómeno resiliencia tiene una función evolutiva y permite a las especies adaptarse a medios ambientes más adversos y permanecer durante la evolución (Dagnino-Subiabre, 2013). En este contexto, es posible que el estrés que induce las inyecciones diarias de vehículo, las cuales se aplicaron antes (aprox. 9 am) del inicio del protocolo de estrés (aprox. 10 am), potenciaron la adaptación al estrés por restricción repetido. Este efecto podría disminuir el aumento de producción de corticosterona en las ratas estresadas e inhibir el efecto que tiene esta hormona en el giro dentado del hipocampo así como en las neuronas piramidales del hipocampo (Conrad y Cols., 2007)

### ***Efecto del Estrés Crónico sobre la Atención Auditiva***

El estrés inducido por las inyecciones diarias con vehículo y el estrés por restricción de movimiento deterioraron significativamente la atención auditiva de las ratas (Fig. 6C). Ambos tipos de estrés no afectaron la reconsolidación de la memoria asociada a la prueba 2-ACT, la cual fue consolidada previo al período de estrés, debido a que las ratas de los grupos control y estrés, y control + vehículo y estrés + vehículo, no mostraron

una diferencia en el desempeño en la prueba 2-ACT durante los primeros 20 ensayos (Fig. 6A y D). Por lo tanto las ratas recuerdan la prueba pero desde el ensayo 20 hasta el 50 las ratas estresadas y control + vehículo presentaron una atención auditiva significativamente menor respecto a las ratas de los grupos control y estrés + vehículo (Fig. 6A y D). Si el estrés crónico habría afectado la memoria relacionada con la prueba 2-ACT, entonces durante los primeros bloques de ensayos el DS-RC debería haber sido cercano a -5 debido a que los animales de esos grupos experimentales presentaron durante los primeros bloques de ensayos cerca de 5 ensayos correctos en cada bloque (Fig. 6A y D).

La prueba 2-ACT es dependiente de la corteza auditiva primaria (Jaramillo y Zador, 2011), además el estrés crónico induce atrofia neuronal en esa área del cerebro (Bose y Cols., 2010). Entonces es posible especular que el estrés crónico, inducido por las inyecciones diarias con vehículo y la restricción de movimiento, podrían haber afectado la morfología dendrítica de las neuronas piramidales de la capa II-III de la corteza auditiva primaria, las cuales regulan la atención auditiva en la prueba 2-ACT (Jaramillo y Zador, 2011). Resultados de nuestro laboratorio demuestran que el estrés crónico disminuye la probabilidad de liberación de GABA en la corteza auditiva primaria, sin embargo la transmisión glutamatérgica no es afectada por el estrés crónico. Es posible que la pérdida del balance excitatorio/inhibitorio en la corteza auditiva primaria de las ratas estresadas pudiera ser causante del deterioro de la atención auditiva que induce el estrés crónico.

El tratamiento con reboxetina previene los efectos que induce el estrés crónico sobre la atención auditiva (Fig. C,F,I). El locus coeruleus envía eferentes hacia la corteza auditiva lo cual regula en parte la transmisión inhibitoria en esa área (Salgado y Cols., 2012). Es probable que el tratamiento con reboxetina aumente la liberación de noradrenalina en la corteza auditiva de las ratas estresadas y esto ayude en parte mejorar la disminución de la liberación de GABA inducida por el estrés crónico y reestablecer el balance excitatorio/inhibitorio en la corteza auditiva. Como resultado de esto las ratas estresadas mejorarían su atención auditiva en la prueba 2-ACT.

Las ratas tratadas con vehículo y las estresadas a través de la restricción de movimiento presentaron un mayor DS-ITI comparado con los controles (Fig. 8C). Es posible especular que las ratas de los grupos control + vehículo y estrés crónico tuvieron menos motivación por realizar la prueba 2-ACT debido a que tuvieron un mal rendimiento

en la prueba 2-ACT comparado con los controles (Fig. 6C). Una rata menos motivada por realizar la prueba 2-ACT tendrá un mayor DS-ITI respecto a una rata más motivada, ya que el ITI depende solo de la rata y no del experimentador. La rata decide cuándo comienza la prueba metiendo su hocico en el puerto central de la caja de condicionamiento operante (Esquema 2). El tratamiento con reboxetina disminuyó el DS-ITI comparado con las ratas tratadas con vehículo (Fig. 8C), este resultado indica que la reboxetina aumentó la motivación de las ratas por realizar la prueba 2-ACT.

## **Conclusiones**

Los datos presentados en esta tesis demuestran que el estrés crónico inducido por el tratamiento crónico con vehículo y por la restricción de movimiento deterioran la atención auditiva en la prueba 2-ACT. El tratamiento con reboxetina previno esta alteración, se especula que este efecto terapéutico ocurriría a través de la regulación del balance excitatorio/inhibitorio en la corteza auditiva primaria. Además, se demuestra que el estrés crónico deteriora la consolidación de nuevas memorias en el laberinto en Y, sin embargo no afectó la reconsolidación de la memoria relacionada con la prueba 2-ACT consolidada previo al período de estrés. Sin duda estos nuevos resultados entregan un avance en el conocimiento de la neurobiología del estrés y de sus patologías relacionadas como el episodio depresivo.

## **Financiamiento**

Proyecto Fondecyt N° 1100413. Prof. Dr. Alexies Dagnino Subiabre

## Referencias

Aboitiz y Cosmelli. 2009. From Attention to Goal-Directed Behavior: Neurodynamical, Methodological and Clinical Trends. Springer. pp 327

Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, Troudart T, Bloch M, Heresco-Levy U, Lerer B. 1999. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 4: 163–172.

Bishop S, Duncan J, Lawrence AD. 2004. Prefrontal cortical function and anxiety: controlling attention to threat-related stimuli. *Nat Neurosci* 7:184–188

Bose M, Muñoz-Llancao P, Roychowdhury S, Nichols JA, Jakkamsetti V. 2010. Effect of the environment on the dendritic morphology of the rat auditory cortex. *Synapse*. 64: 97–110.

Broadbent, D. E. 1958. *Perception and Communication*. New York: Pergamon Press.

Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301: 386–389

Conrad CD, McLaughlin KJ, Harman JS, Foltz C, Wiczorek L, Lightner E, Wright RL. 2007. Chronic glucocorticoids increase hippocampal vulnerability to neurotoxicity under conditions that produce CA3 dendritic retraction but fail to impair spatial recognition memory. *J Neurosci*. 27(31): 8278-85.

Conrad CD. 2010. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 34(5): 742-55.

Cook SC. 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol*. 60(2): 236–48.

Dagnino-Subiabre A, Terreros G, Carmona-Fontaine C, Zepeda R, Orellana JA, Díaz-Véliz G, Mora S and Aboitiz F. 2005. Chronic stress impairs acoustic conditioning more than visual conditioning in rats: morphological and behavioural evidence. *Neurosci.* 135(4):1067-1074.

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

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

Dagnino-Subiabre A. 2013. Effects of chronic stress on the auditory system and fear learning: an evolutionary approach. *Rev Neurosci.* 18:1-11.

Davis M. 1998. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol psychiatry.* 44: 1239-1247.

Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C. 2010. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology.* 35(1): 105-35.

Derryberry D, y Tucker DM. 1994. Motivating the focus of attention. In P. M. Niedenthal & S. Kitayama. *Heart's eye: Emotional influences in perception and attention.* pp. 167–196.

Dudai Y. 2012. The restless engram: consolidations never end. *Annu Rev Neurosci.* 35:227-47.



Depke M, Fusch G, Domanska G, Geffers R, Völker U, Schuett C, Kiank C. 2008. Hypermetabolic syndrome as a consequence of repeated psychological stress in mice. *Endocrinology*. 149(6):2714-23

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

Gibbons, C., Dempster M. and M. Moutray. 2007. Stress and Eustress in nursing students. *J. Adv Nurs*. 61: 282–290.

Goldstein D and B. McEwen. 2002. Allostasis, Homeostat, and Nature of Stress. *Stress*. 5: 55–58.

Gosnell HB, Silberman Y, Grueter BA, Duvoisin RM, Raber J, Winder DG. 2011. mGluR8 modulates excitatory transmission in the bed nucleus of the stria terminalis in a stress-dependent manner. *Neuropsychopharmacology*. 36(8): 1599-607.

Hajós M, Fleishaker JC, Filipiak-Reisner JK, Brown MT, Wong EH. 2004. The selective norepinephrine reuptake inhibitor antidepressant reboxetine: pharmacological and clinical profile. *CNS Drug Rev* 10: 23-44

Hall J. 1988. Fluoxetine: efficacy against placebo and by dose-an overview. *Br J Psychiatry* 153: 59-63

Holsboer, F. 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Eur. Pharmacol*. 23: 477-501.

Hromádka T, Zador AM. 2007. Toward the mechanisms of auditory attention. *Hear Res*. 229: 180-5

Jaramillo S, Zador AM. 2011. The auditory cortex mediates the perceptual effects of acoustic temporal expectation. *Nat Neurosci* 14(2): 246–251.

Lazarus, RS. 1974. Psychological stress and coping in adaptation and illness. *Int J Psychiatry Med.* 5(4):321-33.

Liston C, McEwen BS and Casey BJ. 2009. Psychosocial stress reversibly disrupts prefrontal processing and attentional control. *Proc Natl Acad Sci.* 106(3): 912–917

Luine V, Villegas M, Martinez C and McEwen BS. 1994. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. Short communication. *Brain Res.* 639: 167–170.

Magariños AM, McEwen BS. 1995. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience.* 69(1): 89-98.

Michael N, Ostermann J, Sörös P, Schwindt W, Pfeleiderer B. 2004. A subgroup of Depressed patients presented altered habituation in the auditory cortex as Measured by fMRI. *Neuropsychobiology.* 49: 5–9.

Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. 2005. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci.* 102(26): 9371-6.

Mogg K, Bradley BP, Hyare H, Lee S. 1998. Selective attention to food-related stimuli in hunger: Are attentional biases specific to emotional and psychopathological states, or are they also found in normal drive states? *Behav Res Ther.* 36: 227–237

McEwen BS, Chattarji S. 2004. Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine. *Eur Neuropsychopharm.* 14 Suppl. 5: 497–502.

McEwen, BS. 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.* 87: 873-904

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

McNally RJ. 1998. Information-processing abnormalities in anxiety disorders: Implications for cognitive neuroscience. *Cogn and Emo.* 12: 479- 495.

Page ME. 2003. The promises and pitfalls of reboxetine. *CNS Drug Rev* 9: 327-42.

Palazidou E. 2012. The neurobiology of depression; *Br Med Bull* 101: 127-145.

Pariante CM. 2006. The effects of antidepressants on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Drug News Perspect.* 19(10): 603-8.

Posner MI, Dehaene S. (1994). Attentional networks. *Trends in Neuroscience*, 17: 75-79.

Price A, Rayner L, Okon-Rocha E, Evans A, Valsraj K, Higginson IJ, Hotopf M. 2011. Antidepressants for the treatment of depression in neurological disorders: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 82: 914-23

Pruessner JC, MW Baldwin, K Dedovic, R Renwick NJ Mahani, C Lord, M Meaney and S Lupien. 2005. Self-esteem, locus of control, hippocampal volume, and cortisol regulation in young and old adulthood. *NeuroImage.* 28: 815–826.

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

Salgado H, Garcia-Oscos F, Martinolich L, Hall S, Restom R, Tseng KY, Atzori M. 2012. Pre- and postsynaptic effects of norepinephrine on  $\gamma$ -aminobutyric acid-mediated synaptic transmission in layer 2/3 of the rat auditory cortex. *Synapse.* 66(1): 20-8.

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

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

Tafet GE, Bernardini R. 2003. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 27*: 893–903

Tollkötter M, Pfeleiderer B, Sörös P, Michael N. 2006. Effects of antidepressive therapy on auditory processing in severely depressed patients: a combined MRS and MEG study. *J Psychiatr Res. 40*: 293–306.

Uchida N, Mainen ZF. 2003. Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nat Neurosci. 6*: 1224-9.

Vyas S, Béchade C, Riveau B, Downward J, Triller A. 2002. Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death. *Hum Mol Gen. 11*: 2751-2764.

Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci. 22*(15): 6810–6818.

Wang D, An SC, Zhang X. 2008. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett. 433*: 59-64

Wellman CL 2001. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol. 49*: 245-253.