Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

# Consecuencias del estrés postnatal repetido y la exposición a etanol sobre la actividad del transportador de glutamato y la conducta en ratas

Odeon, María Mercedes

2015-03-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Odeon, María Mercedes. (2015-03-30). Consecuencias del estrés postnatal repetido y la exposición a etanol sobre la actividad del transportador de glutamato y la conducta en ratas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Odeon, María Mercedes. "Consecuencias del estrés postnatal repetido y la exposición a etanol sobre la actividad del transportador de glutamato y la conducta en ratas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-30.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

**Dirección:** Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

**Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

# Consecuencias del estrés postnatal repetido y la exposición a etanol sobre la actividad del transportador de glutamato y la conducta en ratas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**


## Lic. María Mercedes Odeon

Director de tesis: Dra. Gabriela Beatriz Acosta
Consejero de estudios: Dr. Daniel Tomsic

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Farmacológicas – (CONICET-UBA)


Buenos Aires, 2015

**Consecuencias del estrés postnatal repetido y la exposición a etanol sobre la actividad del transportador de glutamato y la conducta en ratas**

## RESUMEN

La exposición a situaciones de estrés durante los primeros años de vida ha demostrado tener profundas consecuencias en el crecimiento y en el desarrollo de un individuo. Los efectos adversos tempranos aumentan el riesgo de sufrir estrés postraumático, depresión y adicción a las drogas de abuso, como el alcohol. Nuestro objetivo fue evaluar las consecuencias a nivel conductual, bioquímico y molecular del estrés postnatal crónico (EPC) y su posible reversión por un ambiente enriquecido en ratas adultas enfocándonos en la ingesta voluntaria de alcohol.

Nuestros resultados mostraron que el EPC indujo la ingesta de etanol en ratas adultas, comportamiento que fue revertido por un ambiente enriquecido. Una vez puesto a punto este modelo experimental, se realizaron estudios de los parámetros bioquímicos y conductuales que lo subyacen. El EPC y la ingesta de etanol modificaron la captación de glutamato en dos áreas cerebrales y alteraron la expresión de los transportadores de glutamato, tanto gliales como neuronales. Los niveles basales de la hormona liberadora de corticotrofina, de la hormona adrenocorticotrofina y de la corticosterona también se vieron modificados en nuestro modelo. Por último, el EPC alteró la conducta de los animales en pruebas de conflicto, aumentando significativamente la exploración de los ambientes aversivos. En conclusión, el EPC induce la ingesta voluntaria de etanol y tiene consecuencias a nivel conductual afectando claramente al sistema glutamatérgico y al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

Palabras clave: estrés postnatal crónico, etanol, glutamato, eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, ambiente enriquecido

Resumen]

**Consequences of chronic postnatal stress and exposure to ethanol on glutamate transporter activity and behavior in rats**


## ABSTRACT

Exposure to stress during the first years of life has been shown to have profound effects on the growth and development of an individual. Early adverse effects increase the risk of postraumatic disorder, depression and addiction to drugs of abuse, such as alcohol. Our objective was to assess the consequences on a behavioral, biochemical and molecular level of chronic postnatal stress (CPS) and its possible reversion by an enriched environment in adult rats focusing on voluntary alcohol intake.

Our results showed that CPS induced ethanol intake in adult rats, a behavior that was reversed by an enriched environment. Once we got this model we wanted to begin the study of biochemical and behavioral parameters that underlie them. CPS and ethanol intake altered glutamate uptake in two different brain areas as well as the expression of glial and neuronal glutamate transporters. The basal levels of corticotrophin-releasing-hormone, adrenocrticotrophic hormone and corticosterone were also modified in our model. Finally, the CPS altered the animal's behavior in conflict tests, increasing significantly the exploration of aversive environments. In conclusion, CPS induces voluntary ethanol intake and has consequences on a behavioral level and induces clearly alterations in the glutamatergic system and in hypothalamic-pituitary-adrenal axis



Key words: chronic postnatal stress, ethanol, glutamate, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, enriched environment.

**AGRADEZCO PROFUNDAMENTE…**

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca doctoral que permitió que me dedique exclusivamente a mi formación científica. No solo por el apoyo financiero, sino también por el soporte necesario que me brindaron para poder realizar la investigación que en parte fue incluida en esta tesis.

A la Universidad de Buenos Aires, por la educación gratuita y de excelencia que permitió mi formación académica y profesional durante todos estos años. En particular a la FCEN por ser mi segundo hogar, o a veces el primero. Por ser un refugio de ciencia, una institución increíble, un lugar cálido donde cada uno se siente parte. Por hacerme sentir como si estuviera en mi casa y darme todas las herramientas para trabajar y formarme como científica. También agradezco a la Secretaría del Dpto. de FBMC, en particular a Ana, por ser siempre tan atentos y acompañarme durante todo este proceso.

A Gaby por enseñarme a trabajar y darme la oportunidad de ser parte de su grupo, por los consejos, por el buen clima de trabajo y la buena onda. Por facilitarme todos los medios para la realización de la tesis. Por su paciencia, por respetar mis ideas, por bancarme, dejarme ser y confiar en mí.

Al Instituto de Investigaciones Farmacológicas, dirigido por el Dr. Carlos Davio, y toda su gente por permitirme trabajar ahí, por ser mi primer lugar de trabajo, mi inicio en esta carrera, por hacerme sentir bienvenida y querida, siempre. A las secretarias, Poupee, Gaby y Grace, por recibirme todas las mañanas con una sonrisa y el aire prendido. A Miguel, María Ester, Nati y Esther María por todas las manos que me dieron. A ese staff de técnicas increíbles, Mari y De Fino, las cuales transforman los días, charlas infinitas, risas y cigarrillos. ¡No sé cómo voy a trabajar sin ustedes! A Stella y María Clara, mis compañeras de banco, por las charlas, los mates y los consejos.

A los investigadores del instituto que enriquecieron estos años: Silvia Wikinski, Stella Celuch, María Clara Gravielle, Analía Reinés, Irene Taravini, Roxana Peroni, Verónica Bisagno, Carolina Ghanem, Graciela Balerio, Sara Sanz y Juan Ferrario.

Agradecimientos]

A esos amigos científicos que me llevo en el corazón. Maru, Ro, Mimi, Cele, Beti, Stefi, Vale, Juan y Andrés, gracias infinitas por los mates, los momentos en la biblioteca (¡que esas paredes nunca hablen!), los almuerzos, las risas, los papers, las charlas serias, los consejos científicos y todas las manos que dan incondicionalmente. Martín, por ser el confidente más reflexivo del mundo, por escucharme miles de mañanas hablar y hablar (escucharme y responderme), por acompañarme en el trabajo y en el ocio. LA Guto mi compañera, amiga, consejera de estudio, de tesis, de vida; por los tambores, la percusión y tu voz.

A Belu, Mica, Ceci, Dai y Caro, mis biólogas superpoderosas amadas. Porque fueron y son parte de mi carrera y de mi vida. Por esos años compartidos en exactas… las aulas, el playón, el bar, días y noches de estudio, la comida, los libros y las cervecitas. Por creer en mí y ayudarme siempre a ser yo. Chicas… son un pedacito de esta tesis. Por haber aparecido en mi vida y haberse quedado, porque las quiero hasta el cielo.

A mis amigas barilochenses del corazón, Fer, Agus, Vale, Pauli, Euge, Cel, Clara y Ana. Esos personajes que crecieron conmigo y que me conocen del pelo a los pies con toda la transparencia que puede existir. Que son todo, el cable a tierra. Por los abrazos, las palabras y los silencios (y escuchar mis lecciones de biología). Por ser parte de mí y porque las quiero con el alma.

A mis primos amados, compañeros de vida. María, mi diseñadora personal y acompañante terapéutica; Juancu, músico, náufrago y compañero; Agus mi traductora peronista preferida y Flor, la que vive lejos, pero está presente en todos mis días junto con su hermoso niño.

A mis abuelos que ya no están porque también son parte de lo que soy. A mi abuela Mecha, que tengo lejos, por quererme incondicionalmente y por enseñarme todo lo que sé de cocina, ¡indispensable para terminar un doctorado!

Agradecimientos]

A mis hermanos, Pili, Gon, Fede y Santi ¡pilares de mi vida! Por estar siempre, por ser ese refugio emocional en las buenas y en las malas, por compartir la vida conmigo, risas, llantos, viajes, campamentos, lagos, fernets y música… y que sigamos caminando juntos para siempre. Son el amor más grande de mi corazón.

A mis viejos por enseñarme, apoyarme y educarme. Por darme todo el amor que se necesita para vivir. Por creer que soy Einstein y haber generado en mí la confianza necesaria para hacer esta carrera y todo lo que me proponga. Por ser parte de mi vida todos los días, por darme todo y ser incondicionales, por haberme hecho la persona que soy. Los quiero hasta el infinito y más allá.

¡¡GRACIAS TOTALES!!

“No es el más fuerte ni el más inteligente el que sobrevive,
sino el más capaz de adaptarse a los cambios.”

Charles Darwin

## INDICE

Resumen ..... 2
Abstract ..... 3
Agradecimientos… ..... 4
Abreviaturas ..... 11

**INTRODUCCION**
El SISTEMA NERVIOSO CENTRAL ..... 13
El glutamato ..... 14
El efecto tóxico del Glu ..... 16
La recaptación de glutamato ..... 18
La regulación de los TGlu ..... 20
Períodos críticos en el desarrollo del SNC ..... 21
ESTRÉS ..... 24
Los estresores ..... 25
La respuesta: el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) ..... 26
El estrés y el glutamato ..... 30
El estrés postnatal ..... 31
AMBIENTE ENRIQUECIDO ..... 33
ETANOL ..... 36
Aspectos generales y consumo ..... 36
Sistema glutamatérgico ..... 37
Mecanismos de la adicción ..... 38
Inicio en el consumo ..... 40
Estrés y adicción ..... 40

**OBJETIVOS E HIPÓTESIS**
Objetivo general ..... 44
Objetivos específicos ..... 44
Hipótesis ..... 45

**MATERIALES Y MÉTODOS**
1-Animales ..... 47
2. Modelo de estrés ..... 47
2.1 Estrés agudo ..... 50
3. Estudios neuroquímicos ..... 50
3.1 Obtención de sinaptosomas ..... 50
3.2 Captación de Glutamato ..... 51

3.3 Niveles de expresión de los TGlu ..... 52
4. ESTUDIOS HORMONALES ..... 53
4.1 Hormona liberadora de corticotrofina (CRH) ..... 53
4.2 Hormona adrenocorticotrofina (ACTH) ..... 53
4.3 Corticosterona ..... 54
4.4 Receptores hipocampales ..... 54
5. ESTUDIOS CONDUCTUALES ..... 55
5.1 Laberinto elevado en cruz ..... 55
5.2 Transición luz-oscuridad ..... 56
5.3 Campo abierto ..... 56
5.4 Prueba de emergencia ..... 58
6. AMBIENTE ENRIQUECIDO ..... 59
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ..... 61

**RESULTADOS**
PARTE I ..... 63
INGESTA VOLUNTARIA ..... 63
ESTADO DE LOS ANIMALES ..... 64
Transaminasas hepáticas ..... 66
ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS ..... 67
Captación de glutamato ..... 67
Expresión de los transportadores de glutamato ..... 68
Experimentos con un inhibidor específico del transportador GLT-1: Dihidrokainato (DHK) ..... 70
ESTUDIOS HORMONALES ..... 71
Determinación de ACTH ..... 72
Determinación de corticosterona ..... 72
Determinación de los receptores hipocampales ..... 73
ESTRÉS AGUDO ..... 73
ESTUDIOS CONDUCTALES ..... 75
1-Laberinto elevado en cruz ..... 75
2-Transición luz-oscuridad ..... 76
3-Campo abierto ..... 76
4- Prueba de emergencia ..... 77
Resumen de resultados expuestos ..... 79
PARTE II- Ambiente Enriquecido ..... 80
INGESTA VOLUNTARIA ..... 80

ESTUDIOS CONDUCTALES..... 82
1-Laberinto elevado en cruz..... 82
2-Transición luz-oscuridad..... 82
3-Campo abierto..... 83

**DISCUSION**…….85

**BIBLIOGRAFÍA**……..100

**ABREVIATURAS**

| | |
|---|---|
| 5-HT | Serotonina |
| A | Adrenalina |
| aa | Aminoácido |
| Ach | Acetilcolina |
| ACTH | Hormona adrenocorticotrofina |
| AE | Ambiente enriquecido |
| ALT | Alanina aminotransferasa |
| AMPA | α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato |
| AST | Aspartato aminotransferasa |
| AVP | Vasopresina |
| CF | Corteza frontal |
| CPF | Corteza prefrontal |
| CRH | Hormona liberadora de corticotrofina |
| DA | Dopamina |
| DHK | Dihidrokainato |
| DO | Densidad óptica |
| EAAT | Transportador de aminoácidos excitatorios |
| EPC | Estrés postnatal crónico |
| GABA | Ácido gamma-aminobutírico |
| GC | Glucocorticoides |
| GFAP | Proteína fibrilar ácida glial |
| Glu | Glutamato |
| GR | Receptor de glucocorticoides |
| Hic | Hipocampo |
| HPA | Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficacia |
| LTD | Depresión a largo término |
| LTP | Potenciación a largo término |
| mgluR | Receptor metabotrópico de glutamato |
| MR | Receptor de mineralocorticoides |
| NA | Noradrenalina |
| NAC | Núcleo accumbens |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| NT | Neurotransmisor |
| PD | Día postnatal |
| PTSD | Estrés postraumático |
| PVN | Núcleo paraventricular |
| SM | Separación maternal |
| SNA | Sistema nervioso autónomo |
| SNC | Sistema nervioso central |
| TGlu | Transportador de glutamato |
| VTA | Área tegmental ventral |

# Introducción

Este estudio está compuesto por tres amplios temas: el sistema nervioso central, el estrés postnatal crónico y la ingesta de alcohol. Estos tres extensos contenidos se estudiarán a lo largo de este trabajo de tesis y sus interacciones se irán profundizando a medida que vayamos analizando los resultados obtenidos.

"Todas las verdades son fáciles de entender, una vez descubiertas.
La cuestión es descubrirlas." Galileo Galilei

**EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Las células del sistema nervioso están anatómica y funcionalmente especializadas para la transmisión intercelular de señales químicas y eléctricas, el transporte de metabolitos de una célula a otra y el intercambio de solutos entre la célula y el medio externo (Squire, 2008).

Las sustancias químicas que transmiten información entre neuronas o entre una neurona con otro tipo celular son llamadas neurotransmisores (NTs). Son sustancias endógenas, liberadas por las neuronas, que actúan sobre un receptor de la célula blanco, produciendo un cambio funcional en la misma.

Se pueden clasificar en NT clásicos, donde se encuentran las aminas: serotonina (5-HT), catecolaminas como dopamina (DA), adrenalina (A), noradrenalina (NA), acetilcolina (Ach) y los aminoácidos (aa) glutamato (Glu), aspartato, ácido gamma-aminobutírico (GABA) y glicina; y los no clásicos: óxido nítrico, monóxido de carbono (Brunton y cols., 2010; Squire . 2008). Por su acción electrofisiológica los NTs se clasifican en excitatorios, que despolarizan la membrana plasmática neuronal e inhibitorios, que la hiperpolarizan (Brunton y cols., 2010).

Para que una molécula química sea considerada un NT clásico debe cumplir con los siguientes requisitos:

1.- Síntesis presináptica del NT, siendo necesario que se encuentren en las neuronas que lo liberan las enzimas, cofactores y sustratos necesarios.

2.- El NT sintetizado debe almacenarse en vesículas, lo que permite una rápida disponibilidad y protección contra su degradación.

3.- La liberación del NT debe ocurrir en los botones sinápticos luego de un estímulo nervioso (potencial de acción).

4.- El NT en el espacio sináptico debe interaccionar con el receptor, que se encuentra generalmente en la membrana de la neurona post-sináptica o en la membrana pre-sináptica (autorreceptor). Estos receptores pueden ser metabotrópicos (asociado a una proteína G) o ionotrópicos (asociado a un canal iónico).

5.- Una vez establecida la unión NT-receptor se ponen en marcha cambios bioquímicos intracelulares en la neurona postsináptica que inducen una determinada respuesta.

6.- El NT en el espacio sináptico debe ser eliminado rápidamente.

Si solo cumple con algunos de los criterios antes mencionado se lo denomina NT putativo (Brunton y cols., 2010).

**El glutamato**

El ácido glutámico o glutamato (Glu) es el principal NT excitatorio del sistema nervioso central (SNC) siendo de trascendental importancia mediando la información sensorial, la coordinación motora, las emociones, la cognición y la participación en los procesos de plasticidad neuronal, necesarios para la adaptación y el desarrollo del SNC (Siegel y cols., 2006). Aproximadamente el 90% de las neuronas del SNC utilizan Glu como NT, por lo tanto es de esperar que se encuentre en muy altas concentraciones (10-15 µmol/g en sustancia gris y 4-6 µmol/g en sustancia blanca) (Siegel y cols., 2006). La repolarización de las membranas durante la actividad glutamatérgica consume el 80% de la energía utilizada por el cerebro (Purves, 2004). El Glu participa de varias reacciones en el cerebro, su formación es un paso limitante en el metabolismo de la glucosa y de los aa, es el precursor del GABA en las neuronas GABAérgicas, es el precursor de la glutamina en las células gliales, además de su función como constituyente de proteínas (Siegel y cols., 2006; Brunton y cols., 2010). Por todas estas razones, es que encontramos al Glu en todas las células del sistema nervioso en concentraciones altas. Éstas provienen de la síntesis local, ya que el Glu no cruza la barrera hemato-encefálica, debido a que es un aa no esencial.

La principal fuente de Glu es a partir de la glucosa a través del ciclo de Krebs y por transaminación del α-ceto-glutarato, también se puede obtener a partir de la desaminación de la glutamina (Squire, 2008). Ésta se sintetiza en las células gliales, por lo tanto existe una interacción entre las células gliales y las neuronas en la regulación de la

disponibilidad de Glu. La glutamina sintetizada en las células gliales es transportada al terminal nervioso, donde la enzima glutaminasa la convierte en Glu. Otra fuente es la que proviene de su captación neuronal mediada por el transportador específico EAAT-4 (Transportador de aa excitatorios-4) (Brunton y cols., 2010).

En condiciones de reposo existe un gradiente de concentración entre la vesícula sináptica y el citoplasma de la terminal neuronal y entre éste y el líquido extracelular. Este último es mantenido por un mecanismo $Na^+$ dependiente, mientras que el gradiente vesicular se logra a través de la bomba Na+-ATPasa.

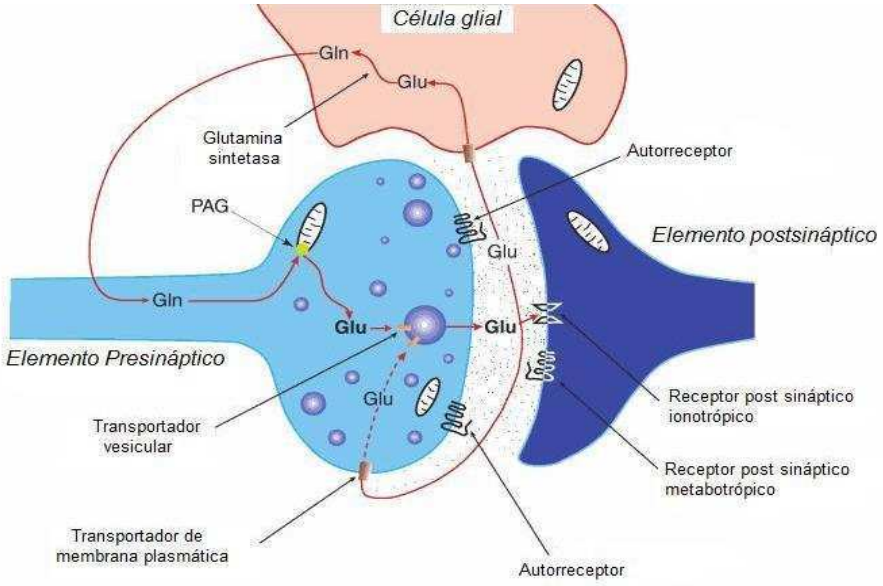



Figura 1: Esquematización de la sinapsis glutamatérgica (Siegel, 2006).

Desde un punto de vista tanto fisiológico como patológico, es importante que las concentraciones de Glu en la hendidura sináptica se mantengan dentro de límites relativamente estrechos. Por eso, tanto en los procesos de síntesis como en los de finalización de la acción del NT, el sistema nervioso cuenta con mecanismos de seguridad, que garantizan que los niveles de este aa excitatorio no excedan los límites compatibles con el buen funcionamiento neuronal (Balcar, 2002; Siegel, 2006).

Luego de la liberación del NT a la hendidura sináptica, éste se une a receptores específicos en las células pre y post-sinápticas. La respuesta de la célula blanco depende del tipo de receptor, puede ser la apertura de un canal (receptor ionotrópico) o la modulación de las concentraciones intracelulares de metabolitos mediada por la proteína

G (receptor metabotrópico). La magnitud de la respuesta depende del número de receptores, de su estado y de la cantidad de NT liberado.

Los receptores a Glu están distribuidos a lo largo de todo el sistema nervioso. En la década del '70 J. Watkins logró un gran avance en el estudio de estos receptores con el desarrollo de agonistas que permitían distinguir farmacológicamente entre los distintos subtipos de receptores a Glu (Squire, 2008).

Los receptores ionotrópicos se clasifican como NMDA (N-metil-D-aspartato) o No-NMDA, según si se unen o no a este agonista. Dentro de los No-NMDA se encuentra la familia de receptores GluR. A esta familia se unen los agonistas AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metiloxazolepropinoico) y kainato, por esta razón los receptores suelen tomar sus nombres (Sheldon y Robinson, 2007).

Los receptores metabotrópicos (mgluR) comparten la estructura general de los receptores metabotrópicos de los demás NTs, sin embargo presenta algunas diferencias y las secuencias homólogas son mínimas. La familia de mgluR es heterogénea en el tamaño (de 854 a 1179 aa), el sitio de unión a Glu está en el dominio extracelular del extremo N-terminal, mientras que en los demás se encuentra en los dominios transmembrana (Squire, 2008). Se clasifican según su homología de secuencias y el sistema enzimático al que están acoplados.

**El efecto tóxico del Glu**

El Glu está involucrado en variadas neuropatologías, y es por esto que existe un gran interés en el estudio del mismo. El Glu puede ser neurotóxico y causar excitotoxicidad, ésta se describe como un proceso de muerte neuronal por una excesiva o prolongada activación de receptores a Glu. Este fenómeno ha sido bien establecido experimentalmente, tanto *in vivo* como *in vitro*. La excitotoxicidad por Glu está principalmente mediada por el subtipo de receptor NMDA que promueve la entrada masiva de calcio al interior celular, desencadenándose la apoptosis neuronal. Además, la intensa activación del receptor NMDA lleva a un aumento de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible, enzima que sintetiza grandes cantidades de óxido nítrico, promoviendo el daño neuronal oxidativo por la formación de diversas especies reactivas del oxígeno y la nitrosilación de distintas proteínas. El daño oxidativo también es potenciado por la disminución de la recaptación de Glu, que en última instancia conduce a la disminución de glutatión, un antioxidante endógeno (Vatassery y cols., 1998).

La hiperactivación de los receptores de Glu es una característica que se observa en numerosos desórdenes neurodegenerativos (Siegel, 2006). Se evidenciaron alteraciones de este NT en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, en la enfermedad de Alzheimer, en la enfermedad de Huntington, en el Parkinson y en otras patologías como la epilepsia, la isquemia cerebral y algunos trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia (Caudle y Zhang, 2009).

Todos los receptores a Glu conocidos hasta el momento son potencialmente dañinos si son activados excesivamente. En los comienzos de la investigación sobre este tema, McGeer y colaboradores (1978) observaron que la administración intravenosa de Glu en animales en desarrollo producía la degeneración de áreas del cerebro no protegidas por la barrera hematoencefálica. Luego se vio que en algunas regiones del SNC había una correlación entre la densidad de un determinado tipo de receptor y la vulnerabilidad al agonista correspondiente (Meldrum y Garthwaite, 1990) y que el daño neuronal inducido por el Glu podía ser evitado en algunos casos con bloqueantes competitivos del receptor NMDA (Foster y cols., 1987). Estas primeras observaciones han sido confirmadas y aún se continúa con el estudio de la función de los aa excitatorios en las enfermedades neurodegenerativas.

En la figura 2 se detallan los efectos conocidos de la toxicidad del Glu.

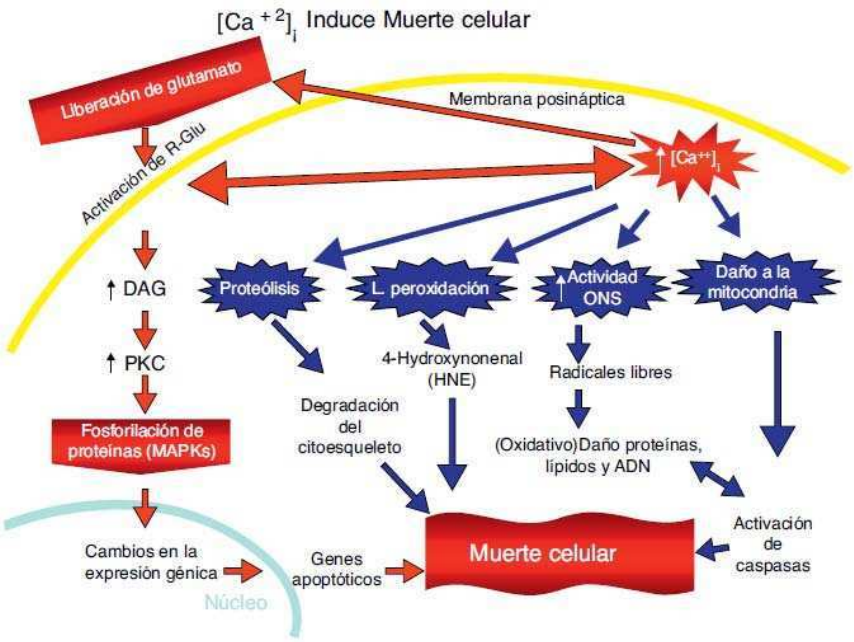



Figura 2: Muerte celular excitotóxica (Flores-Soto, 2012).

**La recaptación de glutamato**

La comunicación intercelular en el SNC requiere un control preciso de la duración y de la intensidad de la acción de los NTs sobre sus receptores. Luego de la liberación del NT y la posterior unión a los receptores pre y postsinápticos, deben existir mecanismos apropiados para finalizar esta acción, puede ser por diferentes vías: degradación enzimática, recaptación a través de transportadores específicos, ambas o por un mecanismo pasivo mediante la difusión del NT de la hendidura sináptica (Danbolt, 2001). Una vez dentro de la neurona, el NT debe ser nuevamente transportado al interior de la vesícula de almacenamiento, a través de transportadores vesiculares específicos. Ambos transportadores, tanto en la membrana plasmática como en la vesicular, están acoplados a gradientes iónicos transmembrana que proveen la energía necesaria para el transporte (Masson y cols., 1999).

El Glu liberado puede seguir 2 vías de recaptación luego de la activación del receptor: puede ser recaptado directamente por el terminal presináptico o ingresar a células gliales adyacentes (Masson y cols, 1999; Balcar, 2002). La recaptación es a través de proteínas de membrana transportadoras específicas, los transportadores de Glu (TGlu).

Se han clonado 5 TGlu dependientes de Na+: GLAST/EAAT-1 (Storck y cols., 1992), GLT-1/EAAT2 (Pines y cols., 1992), EAAC/EAAT-3 (Kanai y Hediger, 1992), EAAT-4 (Fairman y cols., 1995) y EAAT-5 (Arriza y cols., 1997) (EAAT: sigla en inglés que se refiere a los transportadores de aa excitatorios). Todos transportan tanto L-Glu como D-Aspartato y difieren entre sí ya sea por su distribución como por sus propiedades cinéticas (Gegelashvili, 1998; Balcar, 2002). Pertenecen a una misma familia génica, dentro de una especie comparten entre un 50-60% de la secuencia primaria. Las primeras clonaciones fueron originalmente en rata, luego en humano y conejo, y hasta la fecha ya se aislaron análogos de estos transportadores en numerosas especies de mamíferos, así como también en nematodos e insectos. Entre los mamíferos las 5 proteínas son aproximadamente un 90% idénticas entre especies (Danbolt, 2001).

El tamaño de estas 5 proteínas varía entre 523-573 aa, la precisa topología transmembrana aún está en estudio, pero existen varios modelos aceptados, estos poseen entre 6 y 10 dominios transmembrana, predicción realizada por análisis de hidrofobicidad (Kanai y Hediger, 2003).

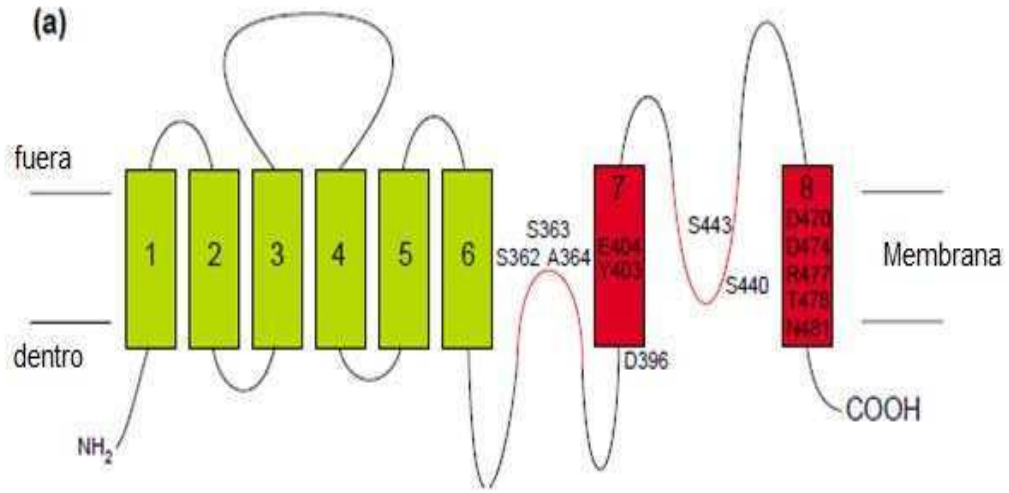



Figura 3: Modelo de la topología de membrana de los TGlu. Los rectángulos indican las posiciones de los pasos transmembrana α hélices (1-8). Las regiones C-terminales que participan en la unión de Glu y cationes cotransportados se muestran en rojo. Los residuos que participan en el reconocimiento de Glu y cationes están indicados y numerados de acuerdo con la secuencia del transportador GLT-1 de rata (Arriza y cols., 1997).

La afinidad (Km) oscila entre 1-100 µM, dependiendo del transportador, por lo que también son llamados transportadores de alta afinidad, pese a no ser tan alta, lo es en comparación con otra familia de TGlu independientes de sodio de baja afinidad (Danbolt, 2001).

La localización en el sistema nervioso varía entre los distintos tipos, al igual que la localización subcelular, a continuación se detalla la distribución en el SNC.

| **Nombre** | **Localización en el SNC adulto** | **Tipo celular** |
|---|---|---|
| GLAST/EAAT1 | Todo el SNC, predominante en corteza | Glia |
| GLT/EAAT2 | Todo el SNC, predominante en cerebro anterior | Glia |
| EAAC/EAAT3 | Todo el SNC | Neuronas |
| EAAT4 | Cerebelo | Células de Purkinje |
| EAAT5 | Retina | Neuronas y glia |

Tabla 1: Localización de los TGlu de alta afinidad. Fuentes: Balcar, 2002; Masson, 1999; Danbolt, 2001; Sheldon y Robinson, 2007.

En la figura 4 se detalla la localización subcelular de los distintos tipos de TGlu.

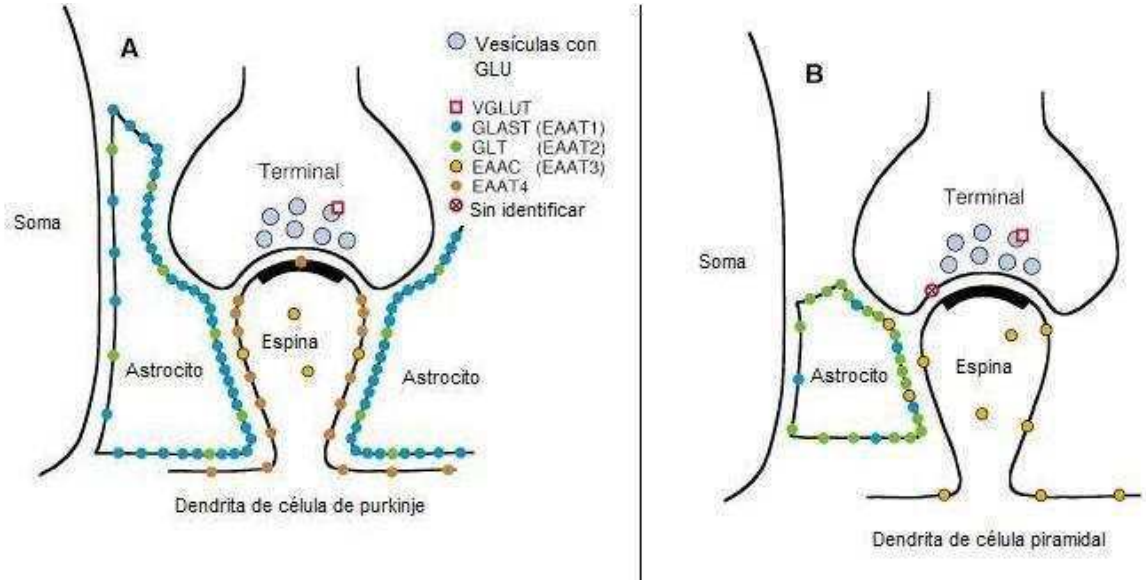



Figura 4: Representación de la localización subcelular de los TGlu de alta afinidad en la sinapsis glutamatérgica. A- Célula de Purkinje, en el cerebelo. B- Sinapsis glutamatérgica hipocampal. (Danbolt, 2001- Traducida)

**La regulación de los TGlu**

Los TGlu pueden ser regulados en todos los niveles: transcripción, *splicing* del ARNm, traducción, direccionamiento de la proteína; hay factores neuronales y no neuronales necesarios para su expresión y mantenimiento (Danbolt, 2001). No se conocen muy bien los mecanismos a través de los cuales ocurre esta regulación. La investigación en este tema lleva ya más de 15 años, y la mayoría de la información disponible hace referencia a sustancias bioactivas que son capaces de modificar la expresión y/o la actividad. Pero se tienen pocas certezas aún sobre los mecanismos involucrados.

Las neuronas contribuyen a la inducción y al mantenimiento de la expresión de GLT-1 y GLAST *in vivo* e *in vitro*, a través de factores de secreción y por contacto (Sheldon y Robinson, 2007). Se piensa que la cascada de señalización de las moléculas de adhesión está involucrada en esta regulación de la captación (Gegelashvili y cols., 2000; Ye y Sontheimer, 2002.).

Existen evidencias de muchas sustancias regulatorias a nivel transcripcional de estas proteínas: las concentraciones fisiológicas del factor de crecimiento tipo insulina

(por sus siglas en inglés, IGF-II) mantienen los niveles normales de GLT-1, GLAST y EAAT-3 (Kanai y Hediger, 2003); el polipéptido de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP por sus siglas en inglés) (Figiel y Engele, 2000), el factor neurotrófico derivado del cerebro (por sus siglas en inglés, BDNF) (Gegelashvili y cols., 2000) y el factor de crecimiento epidermal (por sus siglas en inglés, EGF) (Zelenaia y cols., 2000) inducen la expresión de GLT-1 en cultivos de astrocitos.

El mismo Glu regula la actividad de sus transportadores. A través de la activación del receptor mgluR1 se produce una regulación negativa de EAAT-3 (Kanai y Hediger, 2003) mientras que la activación de los receptores AMPA manifiesta una regulación positiva sobre GLAST en cultivos de astrocitos. Se cree que la función de esta regulación positiva es la de finalizar rápidamente la señal del NT para evitar la acumulación de Glu en el espacio extracelular, ya que esto puede aparejar efectos tóxicos. Como el Glu es un potente neurotóxico cuando se encuentra en exceso, su remoción de la hendidura sináptica es un paso clave para la mantención de la integridad del tejido nervioso (Masson y cols., 1999).

Un ejemplo de la regulación post-transcripcional es el de los glucocorticoides (GC), que disminuyen la afinidad de GLT-1 y GLAST en astrocitos *in vitro* (Zschocke y cols., 2005); esta familia de transportadores también ha señalado poseer mecanismos para la regulación de la actividad por modulación redox de sus grupos sulfidrilos (SH) (Trotti y cols., 1997).

## Períodos críticos en el desarrollo del SNC

El crecimiento y maduración del SNC en los mamíferos se puede dividir en 4 fases: 1) la génesis celular y la migración; 2) la proliferación axonal y dendrítica; 3) la sinaptogénesis y la aparición de la actividad eléctrica; 4) la mielinización axonal (Erecinska y cols., 2004). Cabe aclarar que estas etapas se superponen en el tiempo en las distintas zonas, debido a que el cerebro no se desarrolla en forma uniforme. Existe un período en el desarrollo donde, repentinamente, el cerebro aumenta más rápidamente de peso ("*brain growth spurt*") (Dobbing y Sands, 1979). Este momento del desarrollo ocurre a diferentes tiempos en las distintas especies de mamíferos; en la rata, nuestro modelo experimental, sucede en el período postnatal. Como se cree que este paso involucra la multiplicación de células gliales y la mielinización de los axones, se concluye que al nacer, el SNC de la rata es aún inmaduro (Erecinska y cols., 2004; Fumagalli y cols., 2007).

La proliferación neuronal es, en general, un proceso prenatal en mamíferos de períodos de gestación prolongados, mientras que en los de períodos de gestación cortos, como el de la rata, termina su proceso en etapas postnatales (Erecinska y cols., 2004; Fumagalli y cols., 2007).

| **Evento neural** | **Período** | **Referencia** |
|---|---|---|
| Neurogénesis | E 20-21 | Van Eden y cols. 1990 |
| Migración neuronal | P 6-7 | Eayrs y Goodhead 1959 |
| Proliferación glial | P 1-20 | Altman 1966,<br>Bass y cols. 1970 |
| Proliferación dendrítica y axonal | P 6-18 | Eayrs y Goodhead 1959 |
| Sinaptogénesis | P 14-21 | Aghajanian y Bloom 1967 |
| Mielinización | P 10-50 | Bass y cols. 1970,<br>Jacobson 1963 |

Tabla 2: Períodos de eventos neurales en rata. E: embriónico, P: postnatal. Fuente: Erecinska y cols., 2004

El desarrollo del SNC está caracterizado por ventanas temporales y espaciales donde cierto tipo de estímulos son indispensables para que este proceso sea correcto. Los NTs y los moduladores afectan la formación de los contactos sinápticos, la maduración de la sinapsis y el refinamiento estructural de la conectividad a través de la regulación de la actividad eléctrica, la excitabilidad y la liberación de neurotrofinas (Roceri y cols., 2002; Zhang y Poo, 2001). La expresión de los NT y sus receptores es crítica para el desarrollo de la sinapsis y la formación de las redes neuronales que subyacen al comportamiento, tanto en el feto como en el desarrollo y en el animal adulto (Herlenius y Lagercrantz, 2004).

La señalización glutamatérgica es un proceso fundamental en la regulación del desarrollo del SNC. El Glu modula: la migración neuronal, el crecimiento de los procesos neuronales, la organización normal de la corteza somatosensorial, del mismo modo, es elemental en la eliminación e inducción de la sinapsis en el SNC en desarrollo (Danbolt, 2001). Durante el desarrollo, tanto la sobrestimulación como la baja estimulación de los receptores a Glu producen daño neuronal al cerebro en formación (Danbolt, 2001).

Hay que aclarar que todas estas características no son determinadas exclusivamente por el genoma, no hay que dejar de lado la influencia del ambiente, que además produce un efecto modulador significativo para la diferenciación durante los períodos críticos del desarrollo (Herlenius y Lagercrantz, 2004). El SNC mantiene un grado de plasticidad adaptativa, que le permite ajustarse a determinadas circunstancias y modificar patrones innatos de las conexiones neuronales (Squire, 2008). Durante el desarrollo, el SNC "personaliza" sus conexiones en cada individuo con una precisión no necesariamente codificada en el genoma. Durante las últimas etapas de su desarrollo, numerosas conexiones pasan por un período en el cual su capacidad de ajuste es mucho más eficiente que en el adulto. Es el llamado período sensitivo y se caracteriza por el hecho de que las propiedades anatómicas y funcionales de las neuronas son particularmente sensibles a ser modificadas por la experiencia (Squire, 2008). Una forma extrema de este período es el llamado período crítico, una etapa en la cual la experiencia se convierte en una limitante del correcto y adecuado desarrollo de las conexiones neuronales. Si no se dan las condiciones apropiadas necesarias en esa etapa o se reciben perturbaciones del ambiente, la vía no podrá procesar información de una manera "normal" y se podrán notar impedimentos en la percepción o en el comportamiento (Squire, 2008).

**ESTRÉS**

"Tensión provocada por situaciones agobiantes que originan reacciones psicosomáticas o trastornos psicológicos a veces graves" (Real Academia Española-Vigésima segunda Edición, 2009). En los textos académicos se define al estrés haciendo siempre referencia a un estímulo estresor y a una respuesta al estrés (Herlenius y Lagercrantz, 2004). Se podría definir como una reacción del organismo frente a situaciones adversas que lo alejan de la homeostasis (Trotti y cols., 1997). Un término definido por Walter Cannon (1935), para describir un estado estable de parámetros fisiológicos, al que se puede llegar mediante el equilibrio de los mismos dentro de los límites tolerables por diversos mecanismos.

El término "estrés" es amplio y su definición resulta controvertida. No obstante, se usa tanto en el lenguaje cotidiano como en la literatura científica. Es una palabra que se escucha cada vez más, se considera una problemática del siglo XXI con una mala reputación, cuando en realidad es un proceso, al menos, ambiguo. Para algunos autores, significa la emoción y el desafío, la adaptación para mantener un equilibrio ("estrés bueno"); para muchos otros, refleja un estado indeseable de fatiga crónica, preocupación, frustración e incapacidad de enfrentar determinadas situaciones ("estrés malo") (Kanai y Hediger, 1992; McEwen, 2007).

Los estresores pueden ser físicos (daño, sobreexigencia física, ruidos, calor o frío excesivos) o psicológicos (conflictos interpersonales, eventos inesperados, frustración, aislamiento, separación maternal, eventos traumáticos). Todos estos tipos de estresores inducen diferentes tipos de respuestas, tanto conductuales como fisiológicas (incremento en la presión arterial, aumento de la frecuencia cardíaca, aumento en los niveles de GC, impedimento de las funciones cognitivas y alteraciones metabólicas) (Kanai y Hediger, 1992; McEwen, 2007). Las respuestas conductuales pueden disminuir el riesgo y alejar al individuo del peligro pero también pueden agravar las consecuencias fisiológicas a través de conductas autodestructivas. Esta respuesta incluye alteraciones en los umbrales cognitivos y sensoriales, aumento del estado de alerta, estimulación de la memoria selectiva, supresión de conductas reproductivas y analgesia (Pines y cols., 1992).

La respuesta fisiológica comienza con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), el sistema nervioso autónomo (SNA) y el sistema inmune cuyos mediadores fisiológicos son los GC, catecolaminas y citoquinas respectivamente (Foster y cols., 1987). También son sistemas efectores el sistema nervioso parasimpático y el sistema renina-angiotensina, utilizando la Ach y la renina como sus respectivos

mediadores (Pacak, 2006). Todos inician eventos celulares que promueven cambios adaptativos en las células y en los tejidos que protegen al organismo y promueven su supervivencia. En este sentido, se definió el término alostasis como el mantenimiento de la estabilidad a través del cambio (Sterling y Eyer, 1988; McEwen, 2006).

Cuando la liberación de los mediadores no finaliza correctamente, se prolongan sus efectos sobre las células "blanco" aparejando problemas tales como la desensibilización de los receptores o daño tisular, entre otros. Este proceso se denominó carga alostática y hace referencia al precio que debe pagar el organismo por una respuesta alostática ineficiente, en otras palabras: el costo de la adaptación (McEwen, 2002).

Generalmente, cuando el estímulo estresante cesa, también lo hace la respuesta que éste desencadenó en el organismo, regresando a su equilibrio original (Selye, 1946). Por otro lado, si el estresor es muy intenso o de larga duración lleva al organismo ha establecer un nuevo equilibrio, que puede ser beneficioso o perjudicial (McEwen, 1998, 2002, 2006).

## Los estresores

Los estresores se definen como estímulos que alejan al individuo de la homeostasis. Se pueden dividir en varios grupos según su naturaleza, duración e intensidad. Se clasifican, según la duración de la respuesta generada, en agudos (simple y de duración limitada) y crónicos (duración prolongada) (Pacak, 2006). Un estresor agudo puede pasar a ser crónico si se presenta en forma repetida, es lo que se conoce como estrés repetido. Este período de repetición del estresor, capaz de generar una respuesta a estrés crónico, varía según el estresor. Ottenweller y colaboradores. (1992) demostraron que la exposición a una situación de estrés inescapable por choque eléctrico durante 2 horas por un período mayor a 3 días, produce en el organismo una respuesta al estrés crónico, mientras que se han reportado períodos mayores para estresores menos intensos (Fenoglio y cols., 2006).

Según lo citado anteriormente, el modelo de estrés que utilizamos en este trabajo y el período durante el cual es aplicado, es considerado un estrés crónico.

**La respuesta: eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA)**

El eje HPA es el eje neuroendocrino responsable de la regulación de la secreción de GC en la corteza adrenal y de desencadenar las respuestas de un organismo ante una situación de estrés determinada. Esto es sólo una parte del gran sistema central que integra las respuestas comportamentales, neuroendocrinas, autonómicas e inmunes frente a alteraciones en la homeostasis (Dallman y cols., 2006).

Cuando un organismo se enfrenta a un factor de estrés, el sistema rápido se activa inmediatamente por la entrada de la información visceral o sensorial a través del tronco cerebral, así como de la vía límbica que incluye el Hic, la amígdala y conexiones con la corteza frontal (CF). En este contexto, la A y la NA son liberadas de la médula adrenal produciendo cambios en la presión sanguínea y la respiración como una primera respuesta al factor estresante así como la respuesta conductual de lucha o huída. Además, la neurotransmisión adrenérgica y el sistema límbico estimulan al eje HPA activando primero el núcleo paraventricular (PVN, según sus siglas en inglés) del hipotálamo, que comienza con la liberación de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH, según sus siglas en inglés) y vasopresina (AVP, según sus siglas en inglés). Estos péptidos llegan a la hipófisis anterior mediante el sistema porta y estimulan la síntesis de pro-opiomelanocortina (POMC, según sus siglas en inglés) que es procesado a la hormona adrenocorticotrofa (ACTH, según sus siglas en inglés). Este péptido hipofisario estimula en la corteza adrenal la secreción de GC (Finsterwald y Alberini 2014; de Kloet y cols., 2005). La figura 5 muestra las principales estructuras anatómicas y las moléculas involucradas en la respuesta al estrés, mientras que en la figura 6 se puede ver el curso temporal de estas respuestas.

Los GC son hormonas esteroideas de la corteza adrenal. El principal GC en seres humanos es el cortisol y la corticosterona en roedores. Su síntesis y liberación por la corteza adrenal sigue un ritmo circadiano influenciado por pulsos de ACTH (Lu y Zee, 2006).

Los GC alcanzan todos los órganos a través del sistema circulatorio, estimulan la gluconeogénesis y la glucógenolisis y aumentan la proteólisis y la lipólisis (Pacak, 2006). Además, movilizan sustratos para el metabolismo energético para amortiguar la respuesta primaria al estrés y las reacciones inmunes e inflamatorias mediante sus efectos rápidos. Metafóricamente, los GC contienen el daño causado por el agua de una brigada de

bomberos. El mecanismo subyacente implica una respuesta integrada, que comienza con cambios que llevan a modulaciones más lentas que involucran la transcripción de genes.

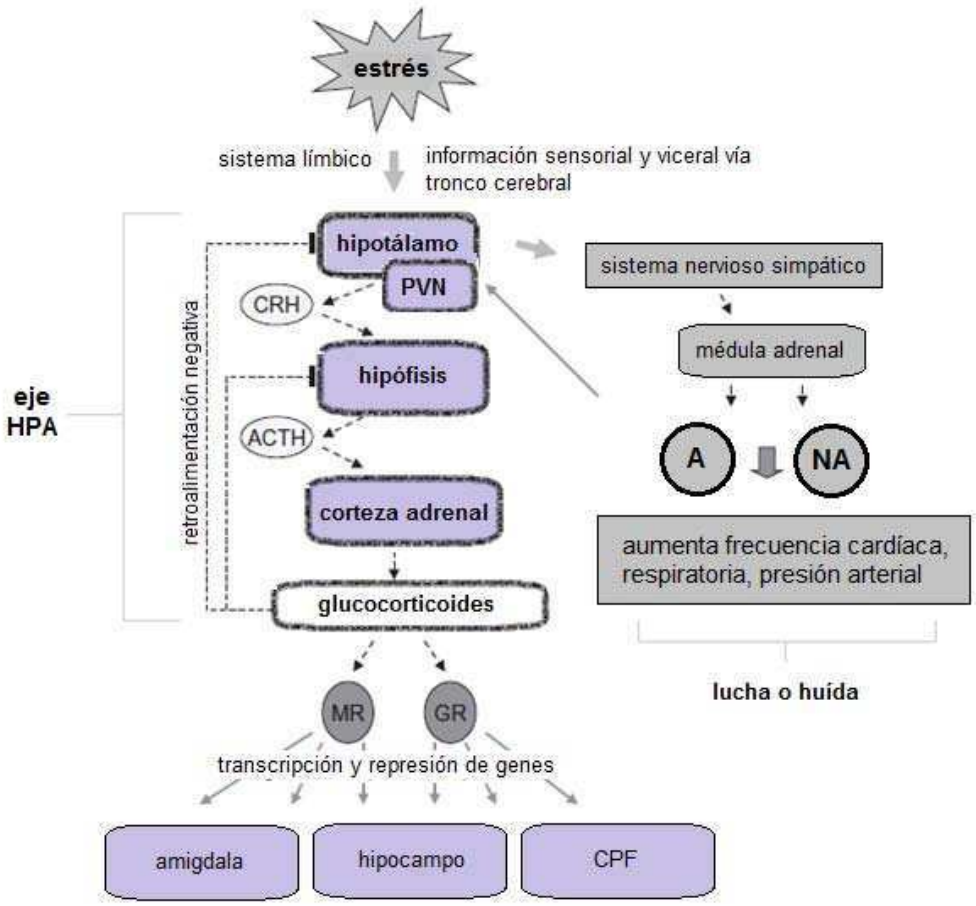



Figura 5: Respuesta al estrés. Una experiencia estresante desencadena la rápida activación del hipotálamo, que estimula al sistema nervioso simpático, el cual inicia la reacción de "lucha o huida" liberando A y NA de la médula adrenal, lo que conduce a una respuesta fisiológica. Además, la exposición al estrés, activa al eje HPA comenzando con la secreción de la CRH desde el PVN del hipotálamo que promueve la liberación de la hormona ACTH de la hipófisis. A continuación, los GC de la corteza adrenal, que se unen a dos tipos de receptores, de mineralocorticoides (MR) y de glucocorticoides (GR), que se encuentra especialmente en la amígdala, el Hic y la corteza prefrontal (CPF). De esta manera se regula la transcripción y la represión de genes que conducen a cambios a largo plazo y se inhibe el eje HPA por retroalimentación negativa. (Deppermann y cols., 2014- Traducida).

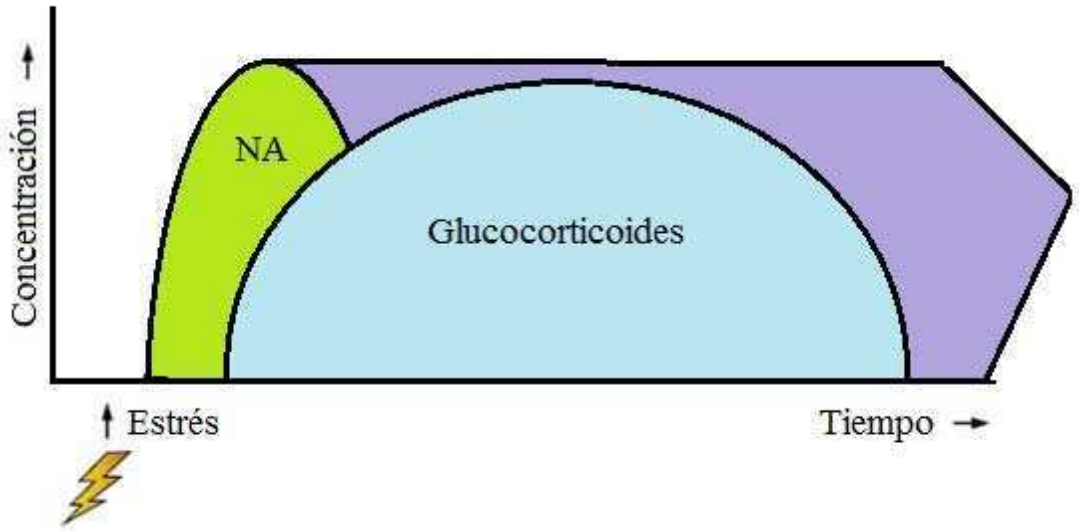



Figura 6: La exposición a un evento estresante dispara una rápida liberación de NA en el cerebro (verde). Luego, los niveles de GC comienzan a subir (celeste). Los niveles de NA rápidamente vuelven a los valores basales mientras que los GC continúan elevándose por más tiempo. Los GC y la NA en sinergia determinan la función sináptica. Por otra parte, ambas hormonas pueden iniciar efectos que perduren incluso cuando sus niveles ya han regresado a la línea de base (violeta).

El sistema que media los efectos de los GC se caracteriza por la presencia de dos tipos de receptores: de glucocorticoides (GR) y de mineralocorticoides (MR). Son moléculas relacionadas y ambas se unen a la misma hormona en el cerebro, aunque con una diferencia de diez veces en la afinidad, siendo mayor la de MR (de Kloet, 2005).

La distribución de los GR es ubicua y desigual, entre las neuronas y células gliales. La densidad de los GR es más alta en el núcleo paraventricular del eje HPA, en las neuronas de la vía aminérgica ascendente y en las neuronas límbicas que modulan la función del PVN. Las neuronas del sistema límbico también expresan los MR en abundancia. La coexpresión de los MR y GR se encuentra en el Hic, la amígdala y algunas áreas corticales (Herman y cols., 2003).

Como los MR muestran una afinidad mucho mayor a los GC liberados, dominan la primera fase de la respuesta al estrés promoviendo la excitabilidad del Hic y aumentando los efectos de otras hormonas del estrés (de Kloet y cols., 2008).

Los GC ejercen su acción no genómica a través de la facilitación y la inhibición de la señalización de los canales iónicos y receptores. El proceso genómico tiene lugar en el núcleo, los GC se unen a los MR y GR que en forma libre se encuentran en el citoplasma,

y se translocan al núcleo con la unión del ligando. Aquí, los receptores pueden iniciar directa o indirectamente la transcripción de genes blanco ya sea por la unión a los elementos respondedores a GC (GREs, según sus siglas en inglés) o mediante la interacción con otros factores de transcripción.

En muchos casos, las vías genómicas y no genómicas operan independientemente una de otra, pero están estrechamente vinculadas, de modo que las acciones rápidas, genómico-independientes, pueden ser transferidas a efectos genómicos a largo plazo (Groeneweg y cols., 2011).

Como estos receptores funcionan como reguladores transcripcionales, el primer paso que conduce a su efecto final sobre el comportamiento adaptativo involucra la expresión alterada de genes de respuesta. En el Hic, la activación de los MR o GR lleva a la expresión alterada de 70-100 genes, de los cuales aproximadamente el 50% son regulados positivamente. Un tercio de los genes son sensibles a ambos tipos de receptores (Datson y cols., 2001).

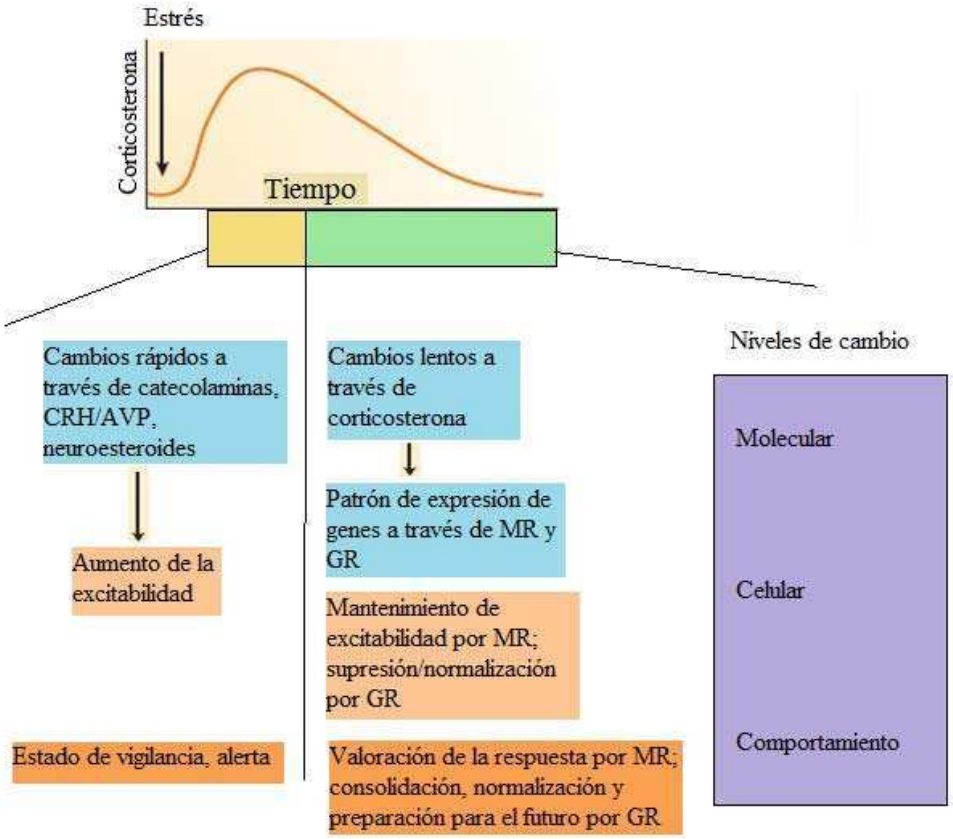



Figura 7: Curso temporal de las respuestas celulares a las hormonas del estrés. (de Kloet, 2005-Traducida)

Estas respuestas del eje HPA se gatillan con diferentes estresores (físicos, psicológicos, metabólicos, químicos) activándose y desactivándose rápidamente en respuesta a un estrés agudo. Sin embargo, los estresores crónicos parecen cambiar la respuesta característica del eje reclutando vías del SNC que en las situaciones de estrés agudo no estarían involucradas (Dallman y cols., 2006).

La respuesta al estrés crónico se caracteriza por la activación prolongada del eje HPA. Éste presenta niveles elevados y duraderos de GC, lo cual reduce la capacidad de las neuronas para resistir noxas, aumentando la tasa de neuronas dañadas por estímulos tóxicos (Olivenza y cols., 2000). Este evento se ve potenciado por el daño de neuronas del Hic, encargadas de inhibir la actividad del eje HPA, gatillando un circuito de retroalimentación positiva. La exposición prolongada a GC se vincula con una disminución de la densidad neuronal hipocampal, atrofia del árbol dendrítico y alteraciones en el aprendizaje y la memoria (Martin y cols.. 2009; Madrigal y cols., 2001; Tabassum y Frey 2013).

**El estrés y el glutamato**

Los efectos del estrés y los GC sobre los receptores ionotrópicos son generalmente rápidos e independientes de las vías genómicas, esto se aplica a los efectos sobre la liberación de Glu en el Hic (Venero y Borrell, 1999). El estrés por otro lado, también ejerce efectos relativamente lentos sobre los receptores AMPA.

Los niveles basales de GC se asocian con una eficaz inducción de la potenciación a largo plazo (LTP, según sus siglas en inglés) en el Hic, que es actualmente el sustrato neuronal mejor documentado para la formación de la memoria. Por el contrario, cuando los niveles de GC aumentan, se ha demostrado un impedimento en la inducción del LTP y una facilitación en la depresión a largo plazo (LTD, según sus siglas en inglés) (Kim y Diamond 2002).

Se sabe poco sobre el mecanismo a través del cual se llevan a cabo estos cambios inducidos por el estrés, aunque los receptores NMDA parecen estar involucrados. Claramente, los cambios mediados por el estrés en la transmisión glutamatérgica y el influjo de $Ca^{2+}$ afectan el potencial para la plasticidad sináptica (de Kloet, 2005).

Reagan y cols. (2004) demostraron un aumento del transportador GLT-1 inducido por un tratamiento de estrés crónico en el Hic de ratas adultas a nivel de ARNm y

proteico. Por otro lado, la activación de los GR, con ligandos endógenos y sintéticos, en los astrocitos corticales induce un aumento dosis-dependiente en la expresión de GLT-1, sin embargo no se registraron efectos sobre los niveles de GLAST (Zschocke y cols., 2005).

Teniendo en cuenta la importancia de la señalización glutamatérgica, tanto la sobreestimulación como el déficit de la misma a causa del estrés, presentan un riesgo muy grande para el SNC en desarrollo.

## El estrés postnatal

Algunos procesos durante el desarrollo, como el estrés pre o postnatal, alteran la respuesta al estrés de la cría durante toda su vida (McEwen, 2002). Se cree que los efectos de estos eventos en la vida temprana están mediados por la gran plasticidad sináptica del SNC en desarrollo (Heim y cols., 2004). Durante los períodos críticos ciertas regiones del cerebro, principalmente las relacionadas con el procesamiento de situaciones adversas (como la CF y el Hic), pueden desarrollar anormalidades a veces irreversibles y así modificar el procesamiento emocional y la respuesta al estrés a lo largo de toda la vida del individuo (Weiss y Wagner, 1998).

La importancia de la separación maternal (SM) es evidente por su impacto a largo plazo en muchas funciones biológicas y de comportamiento, que van desde respuestas endocrinas e inmunes del estrés a déficits cognitivos en la edad adulta (Anisman y Matheson, 2005).

La alteración en la respuesta al estrés se debe a que el eje HPA es la región del SNC más susceptible a las situaciones adversas durante el desarrollo. En la rata, este eje finaliza su desarrollo entre los días postnatales (PD) 5-7, siendo muy vulnerable hasta esa edad (Gutman y Nemeroff, 2002). Las experiencias de la vida temprana programan el funcionamiento del eje HPA, incluyendo la retroalimentación negativa de los GC a través del Hic (Anisman y cols., 1998).

Por el contrario, un ambiente postnatal enriquecido ha demostrado favorecer una maduración más compleja del cerebro, aumentando el tamaño del cerebro anterior y el tejido hipocampal, observándose un incremento de neuronas y células gliales, con una mayor densidad sináptica y de vascularización (Anisman y cols., 1998).

En general, los efectos adversos más severos están relacionados con el cuidado materno y la interacción madre-cría (Heim, 2004).

El estrés en la vida temprana es un factor de riesgo para el desarrollo de psicopatologías. Como es difícil estudiar cómo el estrés en la vida temprana impacta sobre la estructura y función del cerebro humano, se han desarrollado varios modelos animales para el abordarje de este problema (Loi y cols., 2014).

La SM es considerada como un modelo animal de estrés postnatal. Muchos de los estudios han demostrado su impacto tanto en la actividad de eje HPA como en el desarrollo de trastornos psico-emocionales en la vida adulta (Jahng, 2011).

El estrés postnatal y en particular la SM, muestra una variedad de cambios neuroquímicos, hormonales y conductuales a largo plazo. Distintos protocolos de SM en ratas demostraron alteraciones en el funcionamiento del SNC: impedimentos en el aprendizaje, autoadministración de drogas de abuso y variaciones conductuales (Roman y cols., 2006).

Una pregunta fundamental del estrés postnatal por SM es en qué período del desarrollo se aplica la separación y cuál será la duración del mismo. Con períodos cortos de SM se observó una respuesta de estrés atenuada en la edad adulta en ratas (Levine, 2001), mientras que con períodos más prolongados se vieron respuestas amplificadas (Meaney y cols., 1996).

Con estos ejemplos, queda claro como el entorno puede producir alteraciones a nivel del SNC. Es interesante destacar, que las crías de madres con baja conducta maternal, al ser separadas de ellas y puestas al cuidado de madres con alta conducta maternal no se diferencian, siendo adultas, de las crías propias de la rata con buena conducta maternal. Lo que demuestra, otra vez, los efectos del entorno sobre el organismo.

**AMBIENTE ENRIQUECIDO**

Charles Darwin, en 1874, ya le otorgó una gran importancia al papel del ambiente en la determinación del tamaño cerebral al señalar que los cerebros de los conejos domésticos eran menores que los de los conejos salvajes, y postuló que esas diferencias podrían atribuirse al confinamiento y al relativo empobrecimiento de la vida doméstica durante generaciones, haciendo que los animales no ejerciten el intelecto, el instinto y los sentidos. En 1911, S. Ramón y Cajal sugirió que el ejercicio cerebral podía establecer nuevas y más numerosas conexiones entre neuronas en el cerebro.

Posteriormente, en 1949 Hebb, hipotetizó que los animales criados en ambientes enriquecidos (AE) durante la infancia podían desarrollar cambios permanentes en el cerebro relacionados con el aumento de las capacidades de solución de problemas. Él se basó en el hecho de que las ratas utilizadas como mascotas, que habían experimentado condiciones de vida enriquecidas, eran mejores en la ejecución de laberintos que las ratas de laboratorio confinadas en jaulas.

A principios de la década de los 60 en el Laboratorio de Psicología de Berkeley (Rosenzweig y cols., 1962) se realizaron los primeros estudios donde demostraban claramente los primeros efectos neuroanatómicos del AE. Los análisis histológicos del cerebro de los animales mostraron que estas manipulaciones ambientales provocaban cambios neuroquímicos y de peso cerebral. El resultado más sorprendente fue el incremento de peso de la corteza visual (8%) y de la corteza somatosensorial (3%) en los animales enriquecidos. A partir de estos trabajos pioneros, distintos autores fueron demostrando otros efectos neuroanatómicos y conductuales en animales que habían sido criados en jaulas de enriquecimiento durante períodos que oscilaban desde varios días, hasta semanas o meses.

Como mencionamos anteriormente, el cerebro es una estructura plástica. Los factores ambientales influyen en la función y estructura cerebral, de forma que la experiencia presenta consecuencias más o menos perdurables a diferentes niveles de integración.

Los primeros cambios biológicos estudiados causados por el enriquecimiento en la rata fueron el incremento de peso y de volumen cortical (Rosenzweig y cols., 1962).

Otros trabajos han mostrado como consecuencia de un AE: un incremento en el grosor de la corteza occipital, aumento del volumen del hipocampo, incrementos significativos en el volumen de la corteza motora y somatosensorial y un aumento del área total cortical (Crofton y cols., 2014).

Los cambios más sorprendentes, que han despertado mayor interés científico durante los últimos años son los referentes a la capacidad del AE para incrementar la neurogénesis. El enriquecimiento del ambiente aumentó el número de neuronas granulares en el giro dentado de la rata y del ratón (Crofton y cols., 2014). Además, el tratamiento de AE también aumentó la neurogénesis en el giro dentado de ratas viejas comparadas con las controles de su misma edad (Segovia y cols., 2009), con lo que se demuestra que este fenómeno se produce durante toda la vida del organismo.

Está bien documentada la capacidad del AE de producir cambios a nivel celular, molecular y conductual, sin embargo el sentido de los cambios aún no tiene consenso y es algo confuso. Suelen aparecer resultados contradictorios y con un alta variabilidad, sin embargo se ve un efecto general que es un aumento en la capacidad de adaptarse a una nueva situación y explorar ambientes nuevos con mayor libertad (Simpson y Kelly, 2011).

Algunos autores han mostrado que el AE durante el desarrollo también puede influir en la sensibilidad de los animales a las drogas de abuso así como a la vulnerabilidad a desarrollar patrones de consumo adictivos (Bardo y cols., 1994). Green y colaboradores (2002) observaron que el AE disminuyó la autoadministración de anfetamina en ratas a bajas dosis. Por otro lado, Solinas y colaboradores (2008) advirtieron que ratones que habían sido criados en un AE presentaban una disminución de las propiedades reforzantes y estimulantes de la cocaína.

A pesar de que estos estudios apuntan hacia una disminución del consumo de anfetamina en las ratas enriquecidas, los estudios dedicados a examinar los efectos de otro tipo de sustancias psicotrópicas son de resultados muy variables. Parece ser que, por lo tanto, los efectos del AE dependen del grupo de referencia con que se comparen, del tipo de droga estudiada y del paradigma utilizado para medir el consumo de droga. Por ejemplo, se ha visto que el AE aumenta el consumo de alcohol y sacarina en el paradigma de doble botella respecto a animales alojados en grupos pero disminuye el consumo respecto a los animales aislados (Fernández-Teruel y cols., 2002).

Hay diferencias en los resultados, debido a la variabilidad en el tipo y la duración del AE, la edad en que se aplica, la cepa y el género. Este tipo de estudios son ejemplos de la importancia que pueden tener los factores ambientales en la determinación de la conducta, e indican que el producto final será fruto de las interacciones que se produzcan entre los genes y el ambiente en el que el organismo se desarrolle. Más concretamente y en relación al estudio de la interacción ambiente-organismo, los efectos del tratamiento de

AE han puesto en evidencia la importante función que presenta la experiencia en el desarrollo definitivo del SNC y su reflejo en la conducta.

**ETANOL**

El compuesto químico etanol, conocido como alcohol etílico, es un alcohol que se presenta en condiciones normales de presión y temperatura como un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78,4 ºC.

Su fórmula química es $CH_3$-$CH_2$-OH ($C_2H_6O$), es el principal ingrediente de las bebidas alcohólicas como el vino (alrededor de un 13 %), la cerveza (5 %), los licores (hasta un 50 %) o los aguardientes (hasta un 70 %).

**Aspectos generales y consumo**

El etanol es el principal componente de las bebidas alcohólicas. El consumo de dichas bebidas es un hábito muy extendido y culturalmente aceptado en la mayoría de las sociedades occidentales. Actualmente, beber alcohol no es un hábito exclusivo de la población adulta, sino que los jóvenes también lo hacen.

Hoy en día, la Organización Mundial de la Salud (OMS) trata como una alarma "la magnitud de los problemas de salud pública asociados al consumo de alcohol" y ha enfatizado su preocupación ante "las tendencias de consumo que se observan entre las capas más jóvenes de la sociedad".

El etanol es la droga más antigua que se conoce. El uso y abuso de bebidas alcohólicas así como sus propiedades euforizantes, desinhibitorias y depresoras del SNC se conocen desde las épocas más remotas de la humanidad y, en algunos casos, está asociado a ciertas tradiciones, leyendas y leyes de diferentes culturas.

Actualmente, el alcohol ha perdido gran parte de las características tradicionales que lo asociaban a la alimentación y, en la cultura actual, predomina su uso asociado a la diversión. De esta manera, el consumo de alcohol se realiza casi exclusivamente por sus efectos psicoactivos. Estas características hacen del alcohol la droga social por excelencia (Peña Oliver, 2007).

El etanol puede afectar al SNC, provocando estados de euforia, desinhibición, mareos, somnolencia, confusión, ilusiones (ver doble o que todo se mueve de forma espontánea). Al mismo tiempo, existe una disminución de los reflejos. Con concentraciones más altas los movimientos se hacen más lentos, impide la correcta coordinación de los miembros, induce la pérdida temporal de la visión y descargas eméticas. En ciertos casos se produce un incremento en la irritabilidad del sujeto intoxicado como también en la agresividad; en otros individuos se ve afectada la zona que

controla los impulsos, volviéndose impetuosamente descontrolados y frenéticos. Finalmente, conduce al coma y puede provocar la muerte del sujeto (Smolen TN, 1989) .

El etanol posee una farmacología compleja y actúa sobre receptores y proteínas efectoras por vías directas o indirectas, sus efectos dependen de la dosis. Sus principales efectos se asocian a modificaciones funcionales sobre canales iónicos y receptores.

Luego de esta modulación directa sobre la actividad de receptores y canales, el etanol comienza una cascada de eventos sinápticos que involucran diversos NTs. Los efectos psicotrópicos agudos están mediados por la interacción entre NTs y canales iónicos. Después del primer impacto del alcohol se inicia una segunda ola de efectos indirectos sobre otros sistemas de NTs dando lugar al típico efecto conductual que va desde la desinhibición hasta la sedación.

**Sistema glutamatérgico**

Es ampliamente conocido que la administración de etanol, tanto aguda como crónica, altera la neurotransmisión glutamatérgica. Estudios experimentales *in vitro*, en cultivos neuronales, han demostrado que la administración aguda de etanol inhibe, de manera dosis-dependiente, la corriente iónica activada por el receptor NMDA así como la entrada de $Ca^{2+}$ y la acumulación de GMPc en varias regiones cerebrales (Gonzales y Hoffman, 1991).

Además de inhibir los receptores NMDA, estudios de microdiálisis intracerebral *in vivo* muestran que la administración aguda de etanol disminuye de manera significativa los niveles extracelulares de Glu (Piepponen y cols., 2002; Zuo y cols., 2007).

Los antagonistas del receptor NMDA son capaces de prevenir la adquisición de preferencia de lugar condicionada inducida por el alcohol en ratas. Por otra parte, la autoadministración de alcohol fue atenuada por una microinyección de un antagonista competitivo de NMDA (Bao y cols., 2001).

La bibliografía existente acerca del efecto del etanol sobre los receptores de Glu, especialmente sobre los NMDA, es muy abundante. La variabilidad de los resultados es altísima ya que depende de la dosis y de la composición de subunidades de los receptores. Mientras que existe poca literatura en el campo de la captación y los TGlu, aunque la que existe está muy actualizada.

Las deficiencias en la captación de Glu han sido propuestas como disrruptores de los neurocircuitos implicados en el abuso y en el comportamiento de búsqueda de drogas. Una fuente clave de la dependencia se cree que son los cambios en la transmisión del

Glu inducidos por el alcohol. El comportamiento de búsqueda de etanol podría ser promovido por un aumento en la transmisión del Glu de regiones cerebrales esenciales del circuito mesocorticolímbico de recompensa (Melendez y cols., 2005).

Dahchour y De Witte (2003) hallaron un aumento en las concentraciones extracelulares de Glu en el área tegmental ventral (VTA) a bajas dosis agudas de etanol, mientras que a altas dosis se registró una disminución del mismo. Otro estudio, con tratamientos crónicos *in vitro* han demostrado una disminución del transportador glutamatérgico EAAT-3, lo cual podría ser una mecanismo neuroadaptativo para compensar el efecto inhibitorio del etanol sobre la transmisión glutamatérgica (Piepponen y cols., 2002). En un estudio de caracterización de una cepa de rata bebedora, se encontró un menor transporte de Glu en sinaptosomas de corteza (Schreiber y Freund, 2000). También se demostró que la regulación positiva del transportador GLT-1 en CF y el núcleo accumbens (NAC) se asocia, en parte, con la reducción en la ingesta de etanol en ratas bebedoras (Alhaddad y cols., 2014).

La ceftriaxona (un antibiótico de la clase cefalosporinas de tercera generación) normaliza la capacidad de transporte de Glu y los niveles basales del NT después del consumo crónico de drogas de abuso (Trantham-Davidson y cols., 2012). Los efectos conductuales de la ceftriaxona se asociaron con la regulación positiva de GLT-1 en la CF y NAC. Alhaddad y cols. (2014) han descubierto que el tratamiento con ceftriaxona reduce la ingesta de etanol en ratas bebedoras y atenúa el comportamiento de recaída. Estos estudios indican que el etanol disminuiría el transporte de Glu mientras que estimulando el transporte se logra una disminución en la ingesta.

## Mecanismos de la adicción

La exposición sostenida a drogas de abuso puede ser un requisito previo para la adicción a las drogas, pero su aparición es en última instancia, en función de las interacciones entre el efecto de la droga, los factores biológicos y ambientales, que son además influenciados por la etapa de desarrollo del individuo. De hecho, la mayor experimentación con las drogas y el desarrollo de la adicción se producen durante la adolescencia y la edad adulta temprana. La complejidad de estas interacciones podría ayudar a explicar por qué algunas personas se vuelven adictas, mientras que otros no lo hacen (Baler, 2006).

Las drogas, tanto legales (por ejemplo, el alcohol y la nicotina) como ilegales (como la cocaína, metanfetamina, heroína y marihuana) son mal utilizadas por diversas

razones, entre ellas por efectos placenteros, la alteración del estado mental, para mejorar el rendimiento y, en ciertos casos, para la automedicación de un trastorno mental. El consumo repetido de drogas puede resultar en la adicción, que se manifiesta como un deseo intenso por la droga con un deterioro de la capacidad para controlar los impulsos de tomarla, incluso a costa de graves consecuencias (Volkow y Li, 2004).

La adicción a las drogas se puede definir como una compulsión por tomar una droga con la pérdida de control sobre el consumo y es un trastorno crónico recurrente. El DSM-IV define "dependencia de sustancias" como un síndrome básicamente equivalente a la adicción, y los criterios diagnósticos utilizados para describir los síntomas de la dependencia de sustancias, en gran medida definen la compulsión y la pérdida de control de la ingesta (Koob, 2000).

La drogadicción es una enfermedad crónica que se caracteriza por: (1) la compulsión a buscar y tomar la droga, (2) la pérdida de control en la limitación de la ingesta, y (3) el surgimiento de un estado emocional negativo (por ejemplo, disforia, ansiedad, irritabilidad) que refleja un síndrome de abstinencia cuando se impide el acceso a la droga. Se ha conceptualizado como un trastorno que involucra elementos de la impulsividad y la compulsividad que dan lugar al ciclo de adicción: consumo/intoxicación, retiro/afectividad negativa y preocupación/anticipación (*craving*) (Koob y Volkow, 2010).

La comprensión de los procesos neurofarmacológicos que contribuyen a la dependencia de sustancias proporcionará la clave para el desarrollo de tratamientos farmacológicos para la adicción.

El desarrollo de modelos animales para el estudio de la dependencia de drogas ha facilitado un elemento esencial para la comprensión de los mecanismos de acción neurofarmacológicos y de los circuitos neuroanatómicos asociados con la acción de las drogas de abuso. Existen modelos animales para muchos componentes del síndrome de adicción a las drogas, y estos componentes pueden ser construidos de acuerdo a los marcos conceptuales como las diferentes fuentes de refuerzo o por síntomas o criterios de diagnóstico para la adicción (Koob, 2000).

El inicio del consumo de drogas y la vulnerabilidad a la recaída depende en gran medida de las propiedades reforzantes positivas.

**Inicio en el consumo**

El inicio en el consumo de alcohol depende fuertemente de las características biológicas (genéticamente influenciadas) de un individuo. Una variable es el nivel de respuesta a la primera exposición aguda con la droga, es decir, la sensibilidad inicial. Lo más importante, sin embargo, parecen ser las diferencias en la actividad del sistema de refuerzo en el cerebro.

Los efectos de refuerzo del alcohol fueron identificados por una variedad de estudios neurofarmacológicos. Las principales regiones cerebrales que median el refuerzo del alcohol son la amígdala extendida y la vía mesolímbica dopaminérgica, incluyendo el VTA, NAC y CPF. Se sabe que la vía mesolímbica se encuentra bajo el control de la actividad glutamatérgica. El VTA también está regulada por GABA y por las proyecciones encefalinérgicas del NAC, una entrada colinérgica y una glutamatérgica proveniente de la CPF (Vengeliene y cols., 2008).

Además de estas respuestas determinadas biológica y genéticamente (sensibilidad inicial, refuerzo del alcohol) son de gran influencia en la facilitación del inicio de consumo de alcohol los factores ambientales (como el estrés).

Se cree que los factores estresantes pueden facilitar el consumo de alcohol mediante el aumento de la actividad de varios sistemas neurobiológicos, tales como el eje HPA y las cascadas extra-hipotalámicas de CRH (Liu y Weiss, 2002).

En conclusión, debido a las diferencias innatas en varios sistemas de NTs, neuropéptidos y a los factores ambientales a los que se encuentra expuesto el individuo, algunos tendrán una menor sensibilidad inicial al alcohol, y/o encontrarán más efectos reforzantes en el alcohol que otros.

**Estrés y adicción**

Hay muchos factores ambientales que se han asociado consistentemente con la propensión al consumo de drogas. El estrés podría ser una característica común en una amplia variedad de factores ambientales que aumentan el riesgo de abuso. Los efectos negativos del estrés sobre individuos adictos están bien establecidos, sin embargo los mecanismos responsables de los aumentos en la vulnerabilidad al consumo y a la recaída aún no se conocen bien y hasta el momento existen resultados contradictorios. Por ejemplo, la natación forzada crónica disminuye la ingesta de alcohol mientras que el estrés crónico por inmovilización la aumenta (Pautassi y cols., 2010).

La remodelación alostática de las estructuras cerebrales involucradas en la emotividad y la motivación se propone actualmente como la base de las respuestas fisiológicas y conductuales alteradas.

Muchas estructuras cerebrales funcionan de una manera integrada para regular la respuesta conductual y hormonal al estrés. La respuesta de la corteza cerebral y los centros reguladores subcorticales determinan las respuestas emocionales y conductuales e influyen en el hipotálamo y en el tronco encefálico para regular la respuesta fisiológica (simpática y hormonal). La desregulación del eje HPA y de la actividad simpática han sido reconocidas como sustratos clave del mecanismo alostático involucrado en trastornos del estado de ánimo y de ansiedad relacionados con el estrés. Una vista similar al concepto alostático de una mala adaptación de la respuesta de estrés se puede aplicar a los procesos neuroadaptativos que conducen a la dependencia de drogas (Sommer y Saavedra, 2008).

La noción de que la disminución de la respuesta al estrés podría ayudar a prevenir la recaída ha provocado el interés en los antagonistas de los receptores de CRH que pueden inhibir la activación del eje HPA. Estos compuestos han tenido una notable capacidad para bloquear el inicio del consumo y el restablecimiento de la conducta de búsqueda de drogas inducida por el estrés en animales (Baler, 2006).

En el caso particular del alcoholismo, se ha demostrado que existen neuroadaptaciones en el sistema de CRH que impulsan el estado de dependencia y son un objetivo importante para su tratamiento (Sommer y Saavedra, 2008).

Los circuitos neuronales de la respuesta al estrés se cruzan con los que promueven la recompensa a las drogas. De hecho, estudios de resonancia magnética funcional indican que el estrés y la exposición a una droga activan regiones cerebrales similares (Briand y Blendy, 2010).

La validez de la investigación relacionada con el estrés puede ser mejorada mediante el diseño de modelos animales que dependen de estímulos y situaciones biológicamente significativas. Entre estos modelos, el estrés asociado con el conflicto social y la separación maternal son lo que presentan la mejor validez de constructo y de apariencia (Pautassi y cols., 2010).

**En conclusión…**

…un fenómeno tan generalizado como el estrés puede alterar gravemente la cognición, la memoria, la actividad cardiovascular y el metabolismo de la glucosa, las proteínas y las grasas. El estrés es claramente un aspecto importante de la salud mundial, su análisis es crucial para entender cómo estímulos estresantes crónicos pueden conducir a un aumento de la morbilidad y la mortalidad asociadas a la depresión, las enfermedades cardiovasculares y los trastornos metabólicos y psicológicos, que incluyen la dependencia de drogas de abuso.

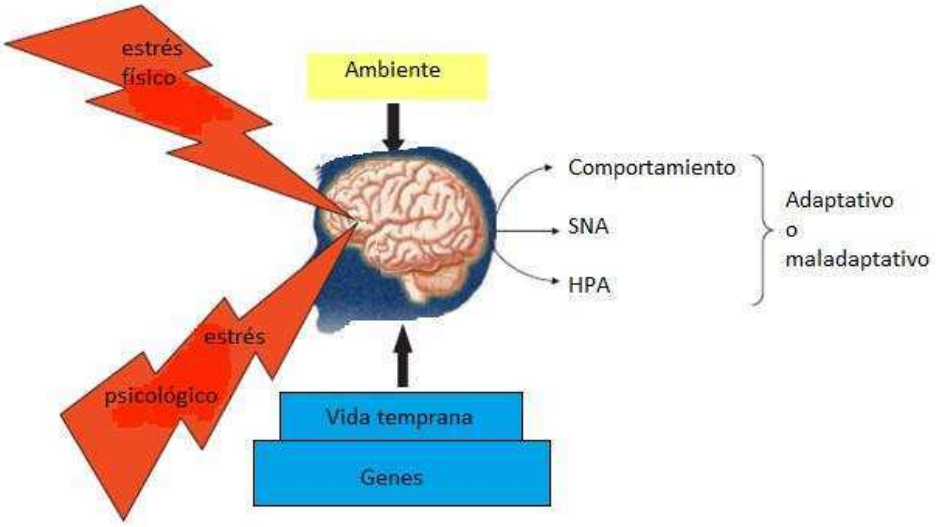



Figura 8: Respuestas fisiológicas y patológicas al estrés. La resiliencia o vulnerabilidad de un individuo a situaciones de estrés en la edad adulta dependerán de la carga genética y de las experiencias tempranas de la vida (Lightman, 2008- Traducida).

El cerebro es dinámico y adaptativo, sensible a factores internos y externos, la neuroplasticidad también es modulada por estos factores. Un claro ejemplo es como un ambiente enriquecido, el aprendizaje y el ejercicio aumentan la neurogénesis, mientras que el estrés crónico y la depresión la inhiben (Kays y cols., 2014; Pascual-Leone y cols., 2005).

Tanto el estrés “bueno” como el “malo” activan el eje HPA pero han demostrado tener efectos opuestos en la neuroplasticidad del Hic (Kays y cols., 2014). Estos procesos neuroplásticos adaptativos, desempeñan un papel crítico en la formación de la memoria a largo plazo, son esenciales, ya que permiten adaptarse con eficacia a situaciones nuevas. Sin embargo, mientras que un nivel de estrés óptimo facilita la memoria a largo

plazo y estimula el rendimiento cognitivo, favoreciendo la consolidación; contrariamente, la exposición a un estrés extremo, traumático o crónico puede conducir a problemas cognitivos y trastornos psicopatológicos como trastornos de ansiedad, depresión y estrés postraumático (PTSD), también es un factor de riesgo para varias enfermedades, como la obesidad, la osteoporosis y los problemas cardiovasculares (Finsterwald y Alberini, 2014; de Kloet y cols., 2005).

No obstante, no hay que olvidar que una respuesta de estrés adecuada es importante para la supervivencia. La reacción al estrés implica una activación de ciertas vías que conducen a respuestas fisiológicas rápidas para mantener la homeostasis.

Dado que el sistema neuroendócrino es un buen candidato como mediador de muchas de las enfermedades relacionadas con el estrés crónico, resulta interesante abordar el estudio de los mecanismos centrales que subyacen a la respuesta neuroendócrina al estrés en nuestro modelo experimental.

## OBJETIVO GENERAL

La exposición a situaciones de estrés durante los primeros años de vida ha demostrado tener profundas consecuencias en el crecimiento, en el desarrollo y en la conducta de un individuo. Los efectos adversos tempranos aumentan el riesgo de sufrir estrés postraumático, depresión y adicción a las drogas de abuso, como el alcohol. En este trabajo se evaluarán las consecuencias del estrés postnatal crónico (EPC) sobre la ingesta de alcohol con el propósito de obtener un modelo animal de ingesta voluntaria de alcohol. Hay numerosa bibliografía acerca del aumento del consumo de drogas de abuso como consecuencia del estrés, pero poco se sabe de los mecanismos involucrados. Una vez obtenido el modelo, se comenzará la caracterización del mismo a distintos niveles: conductual, bioquímico y molecular. Asimismo, se evaluará la posibilidad de revertir los efectos del estrés postnatal repetido, utilizando el ambiente enriquecido como un estímulo positivo durante la adolescencia.

### Objetivos específicos

1) Se evaluará el efecto producido por el EPC sobre la ingesta de alcohol a través del paradigma de libre elección con doble botella.
2) Contando con antecedentes sobre las áreas involucradas tanto en el estrés como en el consumo de drogas, mediremos posibles alteraciones en el principal neurotransmisor de dos áreas cerebrales claves en ambos circuitos: corteza frontal e hipocampo. Se estudiará la transmisión glutamatérgica a nivel de transporte. Se medirá la recaptación de Glu en CF e Hic en muestras frescas enriquecidas con sinaptosomas y determinaremos los niveles proteicos de los tres transportadores de Glu que se expresan en dichas áreas: GLAST, GLT-1 y EEAT-3.
3) Se evaluará el estado del eje HPA en ratas adultas sometidas al EPC. Se realizarán mediciones a distintos niveles del eje tanto en estado basal como en respuesta a un estresor agudo.
4) Sabiendo que la vida temprana puede afectar la conducta y las emociones en la adultez, estos animales podrían tener alteraciones conductuales tales como trastornos de ansiedad. Se analizará la conducta de los animales adultos en pruebas de conflicto, lo que permitirá evaluar el comportamiento tipo ansioso.

5) Percibiendo la importancia que pueden tener los factores ambientales en la determinación de la conducta de los animales, nos propusimos investigar un posible efecto positivo del ambiente enriquecido sobre las ratas expuestas al EPC. Con este fin, se evaluarán en los animales expuestos al EPC y al ambiente enriquecido la ingesta de alcohol a través del paradigma de libre elección con doble botella; se medirán los niveles basales de corticosterona y la conducta en tres pruebas de conflicto.

**Hipótesis**

1- Teniendo en cuenta las evidencias que vinculan el estrés y el consumo de drogas, nuestra primera hipótesis es que el tratamiento de estrés postnatal crónico induce el consumo de alcohol en ratas.
2- De comprobarse la primera hipótesis, una vez obtenido el modelo, estudiaremos el eje HPA. Postulamos que el estrés postnatal crónico produce alteraciones a largo plazo en los niveles plasmáticos de las hormonas relacionadas al estrés.
3- El tratamiento disminuirá el transporte de glutamato en corteza frontal e hipocampo.
4- El estrés postnatal crónico genera un comportamiento tipo ansioso en el animal adulto.
5- La exposición a un ambiente enriquecido durante la adolescencia revertirá la ingesta de alcohol y demás efectos del tratamiento de estrés.

# Materiales y Métodos

"Mide lo que se pueda medir; y lo que no, hazlo medible." Galileo Galilei

## 1-ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar macho según lo descripto por Odeon y cols. (2010). Se compraron ratas Wistar preñadas en el bioterio central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Las madres preñadas se colocaron en jaulas separadas con libre acceso a la comida y agua corriente de bebida, mantenidas en condiciones normales de alojamiento (ciclo luz/oscuridad de 12 hs (8:00- 20:00hs), en condiciones estables de temperatura 23 ± 2 ºC) en nuestro propio bioterio destinado sólo a este tipo de investigaciones. El manipuleo de los animales se realizó según a las normas regulatorias locales y a los principios internacionales de acuerdo con la normativa de "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Research Council" (NIH publicación N8 80-23 / 96), después de obtener la aprobación del Comité de Ética Animal Institucional. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal, y para reducir el número de animales utilizados.

Se controló el estado general de los animales observando el aspecto, la postura, el pelaje y se analizó la funcionalidad del hígado a través de los niveles plasmáticos de las transaminasas (AST: aspartato transaminasa y ALT: alanina transaminasa) utilizando el método enzimático estándar recomendado por la Federación Internacional de Química Clínica (http://www.ifcc.org/). La prueba *in vitro* destinada a determinación cuantitativa de AST y ALT en plasma fueron realizadas en analizadores automáticos Roche/Hitachi 912: ACN 111.

## 2. MODELO DE ESTRÉS

Utilizamos un modelo de estrés postnatal crónico (EPC). Se emplearon como inductores de estrés dos tipos de estímulos: separación maternal (estrés psicológico: los neonatos separados de su madre durante 1 h) (Kehoe y cols., 1996; Ladd y cols., 1996) más exposición al frío (4℃) (estrés físico: neonatos expuestos al frío durante 1 h) (Acosta y Rubio, 1994; Odeon y cols., 2010).

*Si bien la separación maternal está bien documentada como estresor emocional y el frío como un estresor sistémico, el impacto del modelo combinado refuerza aún más el efecto del modelo de estrés.*

El procedimiento de separación maternal (SM) se basa en un protocolo estandarizado por Ogawa y colaboradores (1994). Las camadas de crías fueron asignadas aleatoriamente a una de las dos condiciones del experimento: grupo estresado o grupo control. Las madres de las crías de las camadas con EPC, fueron retiradas de la jaula y se colocaron en otra jaula adyacente. Las crías permanecieron en la jaula a una temperatura de 4℃ en cámara fría con la luz encendida. No se observó mortalidad en el grupo experimental. Las jaulas presentan en su piso material de cama (aserrín), con un alto de 3 cm para que las crías puedan regular la temperatura acurrucándose entre sus compañeros de camada. Los estudios demuestran que, en dichas condiciones, se mantiene la temperatura de las crías, lo que indica una eficaz termorregulación conductual (Farrell y Alberts, 2007). Después de 1 hora, las crías regresaron al bioterio y su madre volvió a la jaula. Las separaciones se llevaron a cabo entre las 10:00- 11:00 hs. En las camadas control, las crías permanecieron con su madre hasta la edad de destete. Estos animales son el grupo de control más deseable para las investigaciones de los efectos de la SM (Lehmann y cols., 2000). Después del destete, las ratas fueron alojadas en grupos del mismo sexo en condiciones estándares. Una vez finalizado el EPC (SM crónica + frío) se seleccionaron los machos de PD22 para los experimentos futuros. Todos los animales fueron manipulados diariamente por el mismo investigador para minimizar la reacción de estrés a la manipulación.

El estrés se aplicó a partir del día postnatal PD2 durante 20 días, 1h por día. Luego del período de estrés PD22, los animales fueron expuestos a una ingesta voluntaria de etanol (6 %) o dextrosa (1 %) durante 7 días utilizando el método de libre elección con doble botella (Crabbe y cols., 2011). Al finalizar los 7 días los animales entraron en un período de descanso y ausencia de tratamientos (comúnmente llamado “washout”, del inglés). Luego de dicho período de 30 días los animales volvieron a ser expuestos a una ingesta voluntaria de etanol o dextrosa durante 7 días y finalmente fueron sacrificados por decapitación.

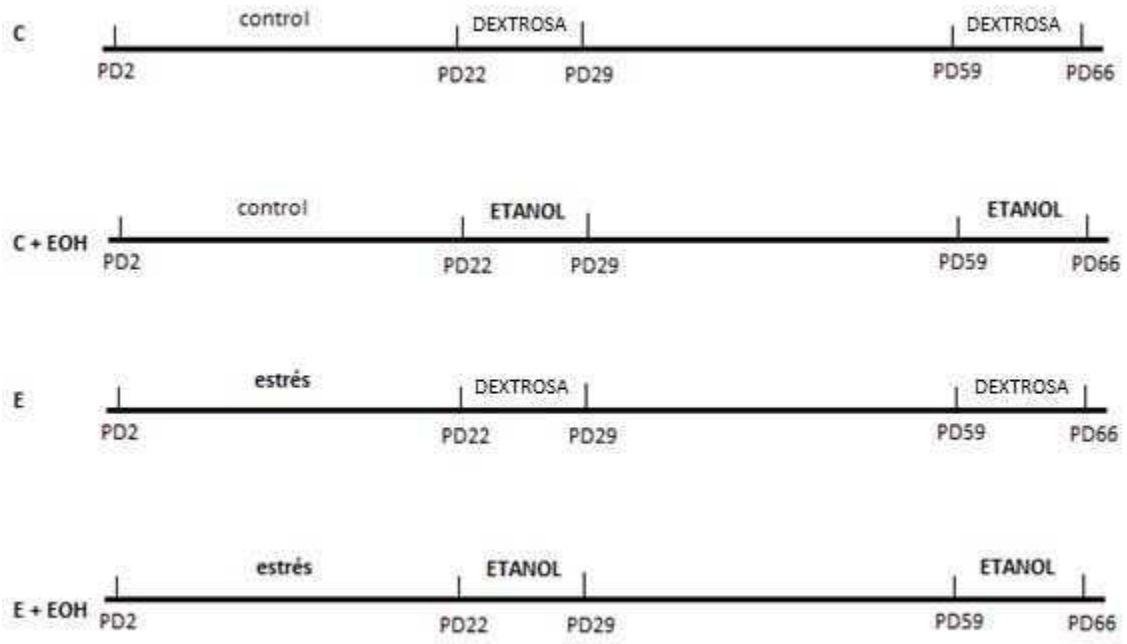



Figura 9: Esquema de los grupos experimentales

Figura 10: Fotografía que muestra el método de libre elección con doble botella.

Luego de los protocolos mencionados se realizaron estudios neuroquímicos en preparaciones de sinaptosomas frescos obtenidos a partir de la CF y el Hic, se realizaron estudios moleculares para cuantificar los transportadores de glutamato, se midieron los niveles de hormonas relacionadas al estrés y por último se realizaron estudios conductuales.

## 2.1 Estrés agudo

Para evaluar la respuesta a un estresor agudo se expuso a los animales a un tratamiento de estrés por inmovilización durante 2 horas en el PD66. Esto se realizó ubicando a los animales dentro de tubos cilíndricos de acrílico transparente, con suficientes orificios para el intercambio de aire. Inmediatamente de terminado el estrés, se evaluaron los niveles plasmáticos de hormonas relacionadas al estrés: ACTH y corticosterona.

## 3. ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS

Se disecaron la CF y el Hic según lo descripto por Glowinski e Iversen (1966), áreas que revisten particular importancia por su relación con el estrés.

## 3.1 Obtención de sinaptosomas

Al finalizar el tratamiento las ratas fueron sacrificadas por decapitación y el cerebro fue extraído rápidamente sobre una cápsula de Petri a 0ºC. Se removió la duramadre. El tejido disecado (CF o Hic) se homogenizó en sacarosa 0.32 M, 20ml/g de tejido. Se centrifugó a 800 g X 10 min a 4°C. Se obtuvo un Pellet1 y el Sobrenadante1. Se descartó el Pellet 1 y el Sobrenadante1 se centrifugó nuevamente a 20,000 g X 20 min a 4°C. Se descartó el Sobrenadante 2. El Pellet 2 se resuspendió en el buffer Krebs Ringer de $Na^+$. Se centrifugó tres veces más a 20,000 g X 20 min a 4°C. Los sinaptosomas se resuspendieron en buffer Krebs Ringer $Na^+$.

La composición de la solución de Krebs Ringer $Na^+$ fue la siguiente: Solución 10 sales 100 ml (NaCl 73 g/l; KCl 2.61 g/l; KH2PO4 1.7 g/l; MgSO4 2.96 g/l ), $NaHCO_3$ 40 ml (52.5 g/l), $ClCa_2$ 0.22 g/l, Glucosa 10 ml (0.18 g/ml), Hepes 10 ml (0.24 g/ml), $H_2O$ 840 ml. Llevado a pH 7.4 (Takarada y cols., 2003).

## 3.2 Captación de Glutamato

Para el ensayo de la captación se realizó el curso temporal incubando en cada tubo de ensayo: sinaptosomas (100 µl), buffer Krebs $Na^+$ (400 µl) y [$^3$H]-Glutamato (10 µl) a distintos tiempos: 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos. Los ensayos se realizaron por triplicado a una temperatura de 30ºC (Takarada y cols, 2003; Odeon y cols, 2010).

Luego de la incubación se detuvo la reacción con 3 ml de Buffer Krebs Ringer $Na^+$, enfriado en hielo. Se filtró a través de filtro de fibra de vidrio Whatman tipo B con una bomba de vacío, se lavó 2 veces el tubo y se enjuagó 3 veces más el filtro. Los filtros se colocaron en viales con líquido de centelleo. Al día siguiente se determinaron las proteínas por el método descripto por Lowry (1951). Se contó la radiactividad que quedó atrapada en el papel del filtro en un contador de centelleo Wallac 1409 (ETC Instruments, USA).

Se realizaron experimentos en paralelos sin la incubación, a tiempo 0, para obtener la radiactividad inespecífica del sustrato radiactivo utilizado en los sinaptosomas. Los datos se procesaron según la siguiente fórmula:

**fmol/mg pt.= ((X-NE) / total / Y / P / 10) x 1000**

X : Radioactividad medida en el filtro expresada en dpm
NE: Unido no específico, a tiempo cero
Total: Radioactividad de 10 µl de [$^3$H]-Glutamato en un vial
Y: Volumen fina en cada tubo, 500 µl
P: concentración de proteínas totales; mg/ml

Con los valores obtenidos se graficó la cantidad de fmol/mg proteína en función del tiempo. Se obtuvo una hipérbola, por medio de una regresión no lineal, utilizando el programa Prism 5.0.

Se realizaron experimentos de inhibición de la captación de Glu en presencia de 500 µM de dihidrokainato (DHK), que se añadió a las membranas inmediatamente antes de un ensayo de captación de [$^3$H] L-glutamato de 5 minutos (Guillet y cols., 2002). El ensayo se realizó en todos los grupos, con y sin inhibidor. Se calculó el porcentaje de inhibición como la diferencia en la captación con y sin inhibidor en cada grupo experimental.

**3.3 Niveles de expresión de los TGlu**

Mediante la técnica de western blot se analizaron los niveles proteicos de los TGlu (GLT- 1, GLAST y EAAT -3) en Hic y CF. Dichas áreas se disecaron en una cápsula de Petri a 0ºC y se homogeneizaron con un homogeneizador de vidrio de PTFE, en buffer de lisis (Tris base 50 mM ; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM ; SDS 0,05 %; Triton X100 1%; PMSF 100 g / ml; Leupeptina 1µg/ml ). La concentración de proteína en las muestras se analizó por la técnica de Lowry (1951). Las muestras (20 µg de proteínas totales) fueron separadas en geles de dodecilsulfato de sodio- poliacrilamida 10% - (SDS-PAGE) a voltaje constante (130 V) y transferido a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema de transferencia a un amperaje constante de 300 mA. Las membranas se incubaron en solución de bloqueo (leche descremada 5% en TBS) durante 1 h a temperatura ambiente (TA) y luego se incubaron durante la noche a 4℃ con uno de los siguientes anticuerpos primarios específicos: anti- GLT- 1 (1:500), anti-GLAST (1:500), anti-EAAT-3 (1:500), anti-actina (1:1000) o anti-GFAP (1:1000). Luego de 3 lavados de 10 min en TBST (0,3% de Tween 20) a TA se incubó durante 1 h con IgG de cabra anti-conejo (1:2000) o de cabra anti-cobayo (1:2000) conjugados con peroxidasa de rábano picante. Luego de un nuevo lavado se llevó a cabo la inmunodetección de bandas utilizando el kit de Pierce Super Señal de quimioluminiscencia (ECL) y la siguiente exposición sobre una película de rayos X. Para la cuantificación de la intensidad de las bandas, las placas se escanearon y se cuantificaron mediante análisis de imagen J software para PC. El nivel de expresión fue estimado mediante el número de píxeles negros de cada banda. Los resultados fueron expresados como densidad óptica (DO) en unidades arbitrarias. Se utilizó actina como control de carga y GFAP como control de nivel de células gliales.

Anticuerpos primarios: α-GLT-1 (AB1520) y α-GLAST (AB1783) de Millipore Chemicon, USA; α-EAAT3 (sc-25658), α-GFAP (sc-9065) de Santa Cruz Biotechnology, INC. California, USA; α-Actin (A2066), de Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA.

Anticuerpos secundarios: α-conejo (B7389) de Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA; α-cobayo (AB8217) de Millipore Chemicon, USA.

## 4. ESTUDIOS HORMONALES

Para evaluar el estado del eje HPA en este modelo de EPC y consumo voluntario de etanol, se midieron lo niveles de CRH en hipotálamo, niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona y los niveles de expresión de GR y MR en el hipocampo.

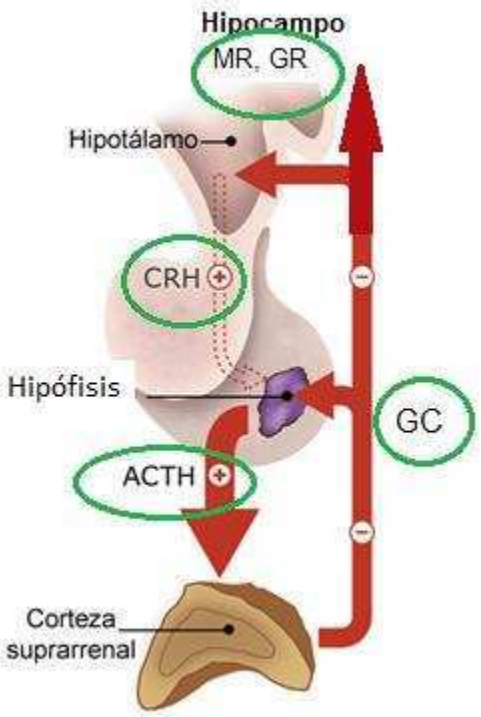



Figura 11: Eje HPA. Señalados en verde Las hormonas y receptores del eje que fueron medidos.

### 4.1 Hormona liberadora de corticotrofina (CRH)

Los niveles proteicos de CRF se midieron por la técnica de western blot en homogenatos de hipotálamo. La técnica se desarrolló de la misma manera que se describió anteriormente en el ítem 3.3, con algunas modificaciones: concentración T del gel: 12%, anticuerpo primario (1:500) α-CRF (sc-10718 de Santa Cruz Biotechnology, INC. California, USA).

### 4.2 Hormona adrenocorticotrofina (ACTH)

Se recolectó la sangre troncal de los animales en el momento de su decapitación utilizando ácido etildiaminotetraacético (EDTA) como agente anticoagulante. Se separó el plasma del paquete globular por centrifugación (durante 10 min, a 3000 g, a 4°C). Se determinaron los niveles de ACTH con un ensayo secuencial inmunométrico con dos

sitios de unión quimioluminiscente en fase sólida utilizando el sistema de inmunoensayo IMMULITE® 1000, SIEMENS.

## 4.3 Corticosterona

Se recolectó la sangre de los animales en el momento de su decapitación utilizando heparina como agente anticoagulante. Se separó el plasma del paquete globular por centrifugación (durante 10 min, a 3000 g, a 4°C). Se determinaron los niveles plasmáticos de corticosterona por cromatrografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Retana-Márquez y cols., 2003).

El sacrificio de los animales fue siempre llevado a cabo entre las 11 y las 11.30 am, para evitar la influencia del ritmo circadiano en los valores de la hormona.

La corticosterona se extrajo a partir de 200 µl de plasma mediante la adición de 4 ml de éter etílico-diclorometano (60:40). Se añadió a cada tubo 100 µl de patrón interno (fenitoína 1 mg/ml en metanol). La fase orgánica se evaporó a 37 °C en atmósfera de nitrógeno. Las muestras se resuspendieron con 150 µl de fase móvil (acetonitrilo-agua 40:60), se agitaron con vórtex (15 s) y se inyectaron en el sistema de HPLC.
La columna de protección Hypersil GOLD C18 (tamaño de partícula 5 µm, 250X4.6 mm; Thermo Fisher Scientific Inc.) se equilibró utilizando acetonitrilo-agua (40:60 v / v) a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

Para la calibración se utilizó una solución patrón (plasma humano normal con corticosterona (SIGMA C2505) en el rango de concentraciones de 0,1 a 1 g/ml. Se realizó la regresión lineal de las alturas de los picos (en estas condiciones, el pico aparece aproximadamente a los 7 minutos). Estos datos se utilizaron para estimar el valor de las concentraciones de las diferentes muestras incógnitas.

## 4.4 Receptores hipocampales

Se analizaron los niveles proteicos de los receptores de glucocorticoides (GR) y los de mineralocorticoides (MR) en homogenatos de hipocampo mediante la técnica de western blot. La técnica se desarrolló de la misma manera que se describió anteriormente (ítem 3.3) con leves modificaciones: concentración T del gel: 8%, anticuerpo primario α-MR (1:200) (sc-11412 de Santa Cruz Biotechnology, INC. California, USA) y α-GR (1:1000) (AB9918, Millipore Chemicon, USA).

## 5. ESTUDIOS CONDUCTUALES

Se estudió el comportamiento mediante tres pruebas conductuales no condicionadas clasificadas como pruebas de conflicto: 1- Laberinto elevado en cruz; 2- Transición luz-oscuridad; 3- Campo abierto (Costall y cols., 1989). Se respetó siempre este orden de ensayo, que es el aconsejado debido a los efectos que cada prueba tiene sobre el animal (Crawley, 2007). Se realizó en nuevas camadas de animales una cuarta prueba conductual: la prueba de emergencia ("emergence test") con el objetivo de evaluar los niveles de impulsividad (Bowen y cols. , 2011).

Todos los ensayos conductuales se realizaron en una sala de conducta ambientada apropiadamente para tal fin, con la intensidad de luz regulable, controlando y manteniendo los lux en cada experimento. Para minimizar las señales olfativas, todos los aparatos fueron limpiados con una solución de etanol al 40% entre cada testeo. Los animales fueron filmados y analizados con el programa Ethovision XT 7, Noldus.

### 5.1 Laberinto elevado en cruz

El aparato consiste en una cruz elevada a 1 m del piso, con dos brazos abiertos y dos cerrados, ambos de 40 x 10 cm, los cerrados con paredes de 30 cm de alto. Las paredes y el piso fueron pintados de negro. Las ratas fueron colocadas siempre en el centro y en el mismo ángulo al comenzar la prueba. Se cuantificó el porcentaje de tiempo y el número de entradas a cada brazo y la distancia total recorrida. La observación total para cada animal fue de 5 min.

1

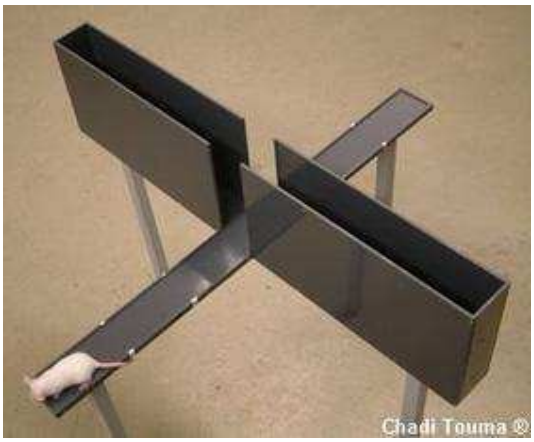



Figura: 12: Dispositivo utilizado en la prueba de laberinto elevado en cruz.

## 5.2 Transición luz-oscuridad

El aparato consiste en una caja de madera cuadrada (60×90×90 cm) con un sector iluminado y otro oscuro conectados entre sí por una abertura. El piso fue pintado de gris, el lado oscuro es logrado colocando un techo opaco sobre la mitad de la caja. Las ratas fueron colocadas siempre en el lado iluminado y en el mismo ángulo al comenzar la prueba. La transición se cuenta cuando el animal cruza con sus cuatro patas del lado oscuro al iluminado. Se cuantifica el tiempo que el animal permanece en cada lado. La observación total para cada animal fue de 5 min. En condiciones normales un roedor tiende a permanecer más tiempo en la oscuridad. Y cualquier situación de ansiedad incrementa aún más esa conducta.

2

Figura 13: Dispositivo utilizado en la prueba de transición luz-oscuridad.

## 5.3 Campo abierto

El aparato en el que se realiza la prueba consiste en un cubo de madera (60×90×90 cm) de color gris. Las ratas fueron colocadas siempre en el mismo ángulo al comenzar el ensayo. Se cuantifica el porcentaje de tiempo y el número de ingresos al centro junto con la distancia total recorrida. La observación total para cada animal fue de 30 minutos.

3

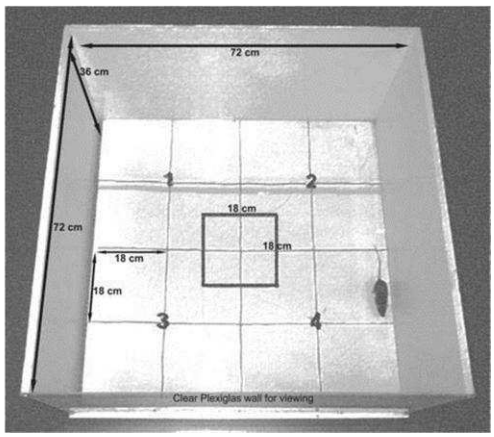



Figura 14: Dispositivo utilizado en la prueba de campo abierto

Estas tres pruebas (5.1-3) se basan en la aversión innata de los roedores a sitios muy iluminados, abiertos y desconocidos y en la tendencia a la exploración espontánea de los roedores en un ambiente nuevo. Cuando el animal es expuesto a un ambiente nuevo se genera un conflicto entre la tendencia a explorar y el instinto de evitar un sitio no familiar (Costall y cols, 1989). La conducta final del animal, cuando se lo expone a esta situación, es la actividad exploratoria resultante de la combinación de estas dos tendencias. Es por esta razón, que estas pruebas se sugieren como un indicador de la actividad exploratoria y del efecto ansiolítico/ansiogénico inducido por drogas y/o tratamientos (Bourin y Hascoët, 2003).

Se considera un efecto ansiolítico cuando el animal aumenta el porcentaje de tiempo en el lugar aversivo con respecto a los controles, por el contrario cuando ese tiempo disminuye, se considera que el efecto es ansiogénico.

El lugar aversivo de los aparatos es, en el caso del laberinto en cruz: los brazos abiertos; en el de transición luz-oscuridad: el lado iluminado y en el campo abierto: la zona central.

Los experimentos fueron llevados a cabo siempre a la misma hora y lugar en condiciones similares de temperatura (23℃) e iluminación (70 lux).

## 5.4 Prueba de emergencia

El aparato consiste en un cubo de madera cuadrada (60×90×90 cm) de color gris con una caja de acrílico pequeña (20x20x13) color rojo en su interior. Las ratas fueron colocadas dentro de la caja que está cerrada y se le abre una puerta al comenzar la prueba. La intensidad de luz dentro del campo es muy alta (180 lux) mientras que en el ambiente es muy baja (20 lux). Se cuantifica la latencia de salida. La observación total para cada animal fue de 5 minutos. El objetivo de esta prueba es medir los niveles de impulsividad de los animales, las condiciones son más extremas que en las pruebas anteriores. El ambiente aversivo es muy iluminado y amplio mientras que el compartimento seguro es muy pequeño y oscuro. Se considera un tiempo estándar de latencia de salida, 10 minutos para ratas Wistar (Paré y cols., 2001), balance entre la actividad exploratoria innata y el miedo al ambiente aversivo. Teniendo este tiempo estándar como referencia se pusieron a punto las condiciones ambientales correspondientes (luz del ambiente, luz dentro del campo y la ubicación de la caja dentro del campo abierto) donde se observaba que una rata control tiene una latencia de salida de 10 minutos. Una vez cumplido este requisito se realizaron todos los experimentos en estas mismas condiciones y se midieron latencias de salida. Se considera positivo para la impulsividad cuando el tiempo de salida es menor o igual a la mitad del tiempo de un animal control. Por esta razón se fija el tiempo de testeo en 5 minutos.

4

Figura 15: Dispositivo utilizado en la prueba de emergencia

## 6. AMBIENTE ENRIQUECIDO

Para poder evaluar los posibles efectos del ambiente enriquecido sobre las variables de interés, se trabajó con los grupos experimentales anteriormente descriptos (figura 10), pero en el período de depuración ("washout" en inglés), se los colocó en un ambiente enriquecido durante 30 días.

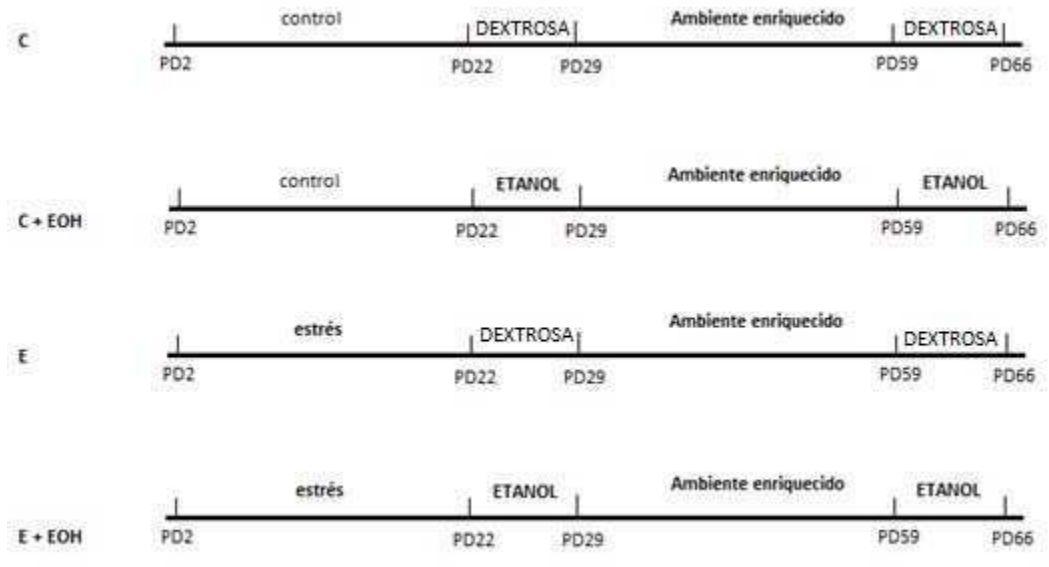



Figura 16: Grupos experimentales 1-4 con ambiente enriquecido: 1AE-4AE.

El ambiente enriquecido se logró mediante el aumento de tamaño de la jaula (50x60x25 cm) alojando a los animales en grupos más grandes (6 animales por jaula) y se agregaron diversos objetos: plataformas, rueda de ejercicio, juguetes de plástico y madera, tubos, comida (queso, dulce de membrillo o manzana, sólo una vez a la semana), sonajeros, sogas. Se formaron 4 combinaciones diferentes y se cambió el ambiente 1 vez a la semana, esto agrega el factor de ambiente novedoso (Mora y cols., 2007; Simpson y Kelly, 2011).

En los grupos control del AE, los animales se alojaron en grupos de 4 animales en jaulas tradicionales (40x25x17 cm) y sin el agregado de ningún objeto, conocido como IC+SC (impoverished conditions + standard group housing).

Figura 17: Fotografías de jaulas con ambiente enriquecido.

Como nos interesó ver la posible reversión del AE sobre la conducta de estos animales, medimos los niveles de ingesta voluntaria de alcohol y le realizamos la batería de pruebas conductuales utilizadas anteriormente (pruebas 5.1, 5.2 y 5.3 del ítem 5. ESTUDIOS CONDUCTUALES). También realizamos mediciones de los niveles plasmáticos de corticosterona para tener un indicio del estado basal de eje HPA. Se midieron por HPLC, según la técnica descripta en ítem 4.3.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa estadístico Infostat (desarrollado por el Grupo InfoStat, docentes-investigadores de Estadística y Biometría y de Diseño de Experimentos de la Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC); disponible en http://www.infostat.com.ar/). Se consideraron como significativos los valores de $p < 0,05$=*, $p < 0.01$=**; $p < 0.001$=***.

La ingesta voluntaria se analizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de 2 vías, con efectos simples en caso de interacción positiva.

Los datos fueron representados como la media ± S.E.M. y se analizaron estadísticamente mediante la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, con test *a posteriori* de Tukey. En caso de no cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad se recurrió a la prueba de Kruskal-Wallis.

Cuando se trabajó con grupos experimentales o variables más complejas, los cuales se detallan a continuación, debimos recurrir a otras pruebas estadísticas.

El curso temporal fue estimado y analizado con el programa Graph Pad Prism 5 (San Diego, CA, USA) y comparado mediante un ANOVA de 2 vías con medidas repetidas.

En los experimentos de estrés agudo y de ambiente enriquecido los datos fueron analizados con ANOVA de 2 vías y en los casos de interacción positiva se recurrió a un análisis por efectos simples (ANOVA de 1 vía o test de t, según corresponda).

Las latencias de escape de la prueba de emergencia fueron comparadas estadísticamente con la prueba de Kruskal-Wallis y analizado con el programa Graph Pad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

# Resultados

"Creo que en la discusión de los problemas naturales, deberíamos comenzar no con las escrituras, sino con experimentos y demostraciones." Galileo Galilei

## PARTE I

### INGESTA VOLUNTARIA

Se midió la ingesta voluntaria de etanol en grupos sometidos a estrés postnatal crónico (EPC) bajo el paradigma de la libre elección con doble botella (Crabbe y cols., 2011). Hemos observado un aumento en los volúmenes de ingesta voluntaria de etanol en los animales estresados tanto en la primera como en la segunda ingesta (Figuras 18 y 19).

**Primera ingesta**

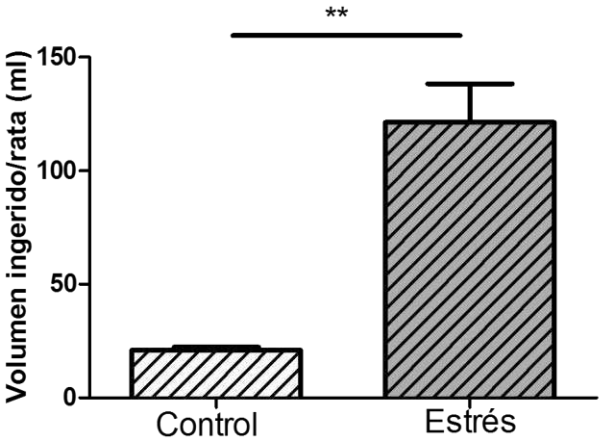



Figura 18: Volumen (ml) de la 1° ingesta voluntaria de ETANOL al 6% por rata durante 7 días, test de t (t=5.917 gl=10).

**Segunda ingesta**

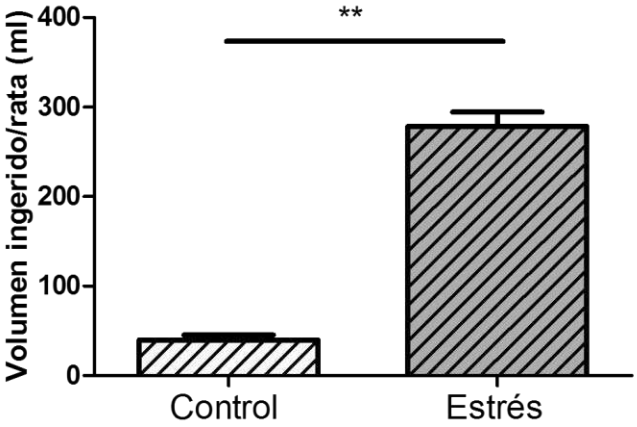



Figura 19: Volumen (ml) de la 2° ingesta voluntaria de ETANOL al 6% por rata durante 7 días, test de t (t=14.05 gl=10).

Los resultados de aquí en adelante estarán representados en 3 de los 4 grupos experimentales. Al ser esta cepa de rata no bebedora y la ingesta voluntaria, tenemos un grupo, CONTROL-ETANOL, con el cual no se trabajó en los estudios posteriores. Esta decisión se tomó puesto que las ratas controles no bebieron etanol (Figuras 19 y 20) por lo que resolvimos unificar a los controles y solo representar 3 grupos experimentales: control, estrés, estrés+etanol. Donde el grupo control está formado por animales a los que en la doble botella se les ofreció dextrosa y otros a los que se les ofreció etanol (y no lo bebieron).

**ESTADO DE LOS ANIMALES**

El estado general de los animales fue rigurosamente controlado. Los animales presentaron un "buen estado" general, el pelaje mostró un buen aspecto y la marcha y postura de los sujetos experimentales no tuvieron alteraciones aparentes.

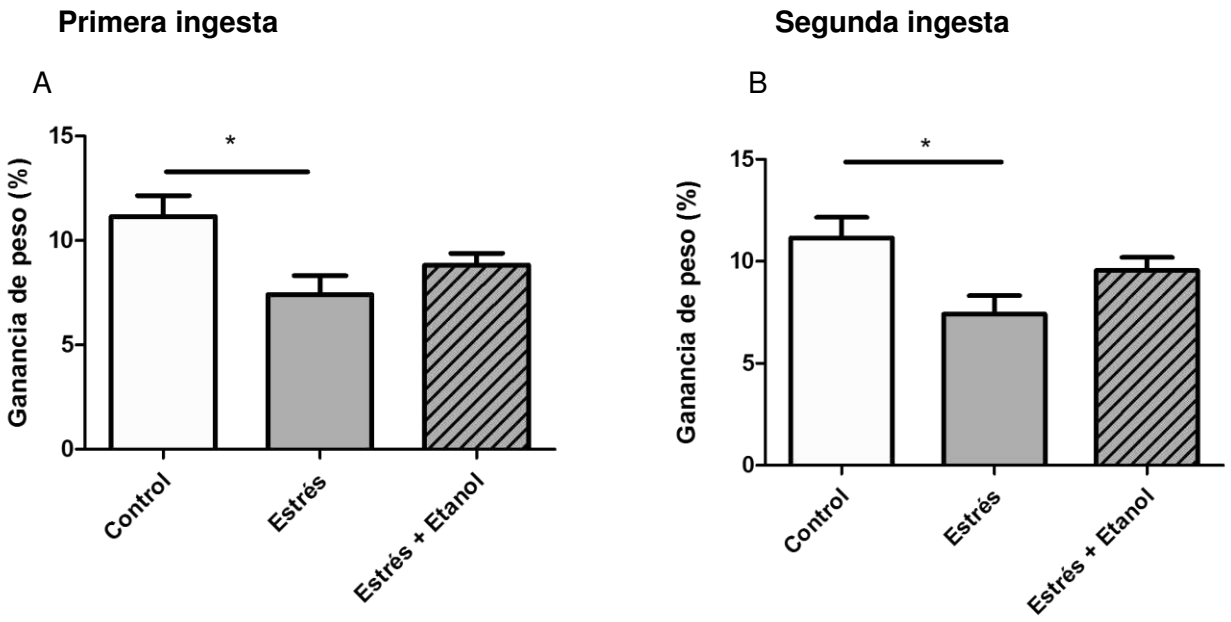
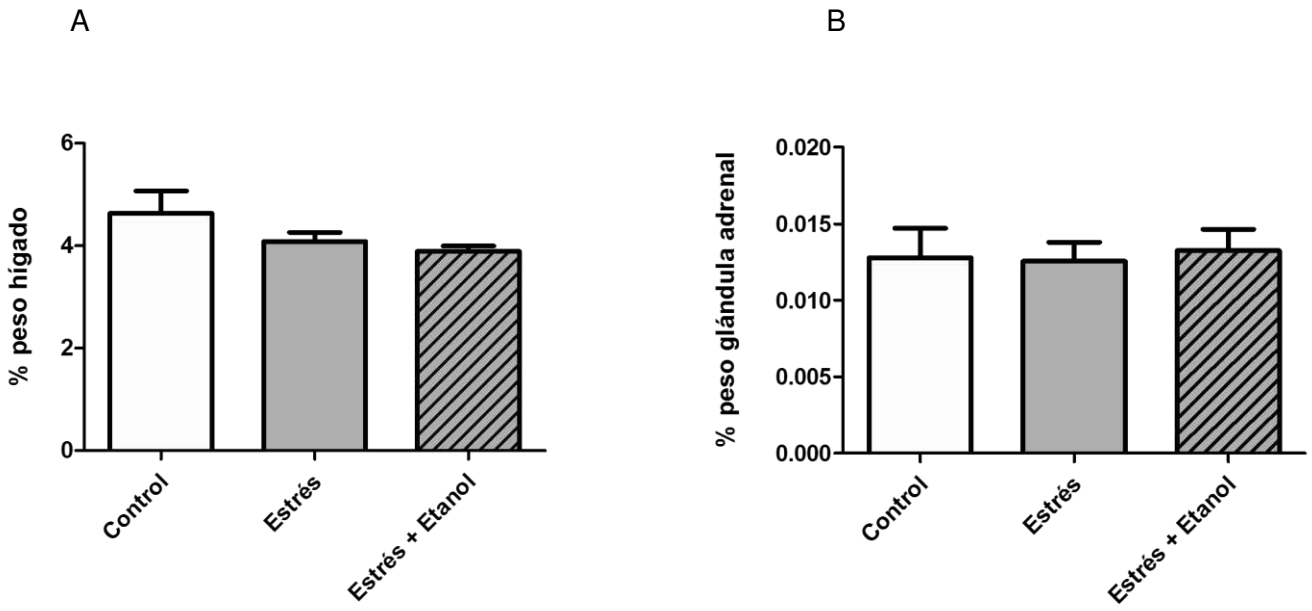



Figura 20: Ganancia de peso de los animales (%) durante la primera ingesta (ANOVA de una vía A: $F_{2, 17}$= 5,086, p= 0,0206) y durante la segunda ingesta (ANOVA de una vía B: $F_{2, 17}$= 4,818, p= 0,0242) n=6.

Pese a la buena apariencia externa de los animales, se observó una disminución significativa de aproximadamente un 20% en la ganancia en peso de los animales estresados (Figura 21), no así en los animales estresados que consumieron alcohol. El etanol aporta calorías, pero para que no difieran en el consumo calórico diario entre los

distintos grupos, a los animales a los que no se les ofrecía etanol, recibieron en la doble botella una bebida de dextrosa al 1%, isocalórica con respecto al etanol 6%.

Para descartar posibles efectos tóxicos del tratamiento sobre los principales órganos involucrados se controló el peso de la glándula adrenal y del hígado (Figura 21).




| HIGADO (g) | | | GLÁNDULA ADRENAL (mg) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Control | Estrés | Estrés + Etanol | Control | Estrés | Estrés + Etanol |
| 12,21111111 | 13,98666667 | 13,3166667 | 50,75 | 43,5875 | 46,7625 |
| +/-1,564 | +/-2,972 | +/-3,16 | +/-2,0449 | +/-3,84664 | +/-6,7118 |

Figura 21: Peso del hígado (A) y la glándula adrenal (B) en tabla inferior, porcentaje del peso del órgano respecto del peso total del animal en gráfico superior. (ANOVA de una vía A: $F_{2, 17}$= 1,974, p= 0,1734) (B: $F_{2, 17}$ = 0,05049, p= 0,9509) n=6.

Se decidió evaluar estos órganos para investigar si existían efectos nocivos o tóxicos inducidos por el tratamiento, ya sea por el efecto del estrés sobre la glándula adrenal o de la ingesta de etanol sobre el hígado. No observamos diferencias macroscópicas ni de peso en ninguno de los grupos estudiados en ninguno de los dos órganos evaluados con respecto al grupo control.

El peso de la glándula adrenal es un parámetro que se mide generalmente como indicador de estrés crónico, ya que la disminución de su peso está demostrada en diversos modelos de estrés (Retana-Márquez y cols., 2014; Sifonios y cols., 2009). En nuestro modelo este parámetro no se modificó, esto podría deberse al tiempo que transcurre entre la exposición al estrés y el momento en que se pesó el órgano, si este efecto del estrés repetido no es a largo plazo, podría ser que por esta razón no observemos la disminución en el peso de la glándula.

**Transaminasas hepáticas**

Con el propósito de evaluar la posibilidad de alguna injuria hepática debido al consumo de etanol, se midieron los niveles plasmáticos de las transaminasas hepáticas. Se determinaron las enzimas más utilizadas para tal fin: la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT). Estas enzimas cumplen una función metabólica en el interior de los hepatocitos y si se encuentran aumentadas puede ser debido a la destrucción de las células hepáticas lo cual sucede en casi todas las enfermedades hepáticas.

En nuestro modelo experimental no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos analizados (Figura 22).

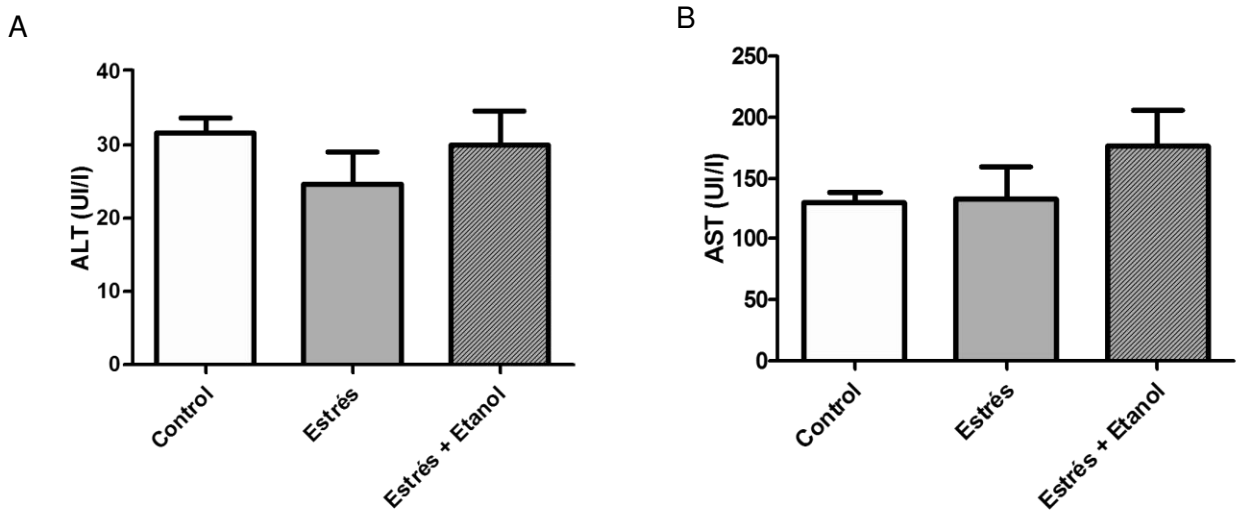



Figura 22: Niveles plasmáticos de transaminasas hepáticas A: ALT (ANOVA de una vía, $F_{2, 16}$=1,213, p=0.32) y B: AST (ANOVA de una vía $F_{2, 16}$= 0.8948, p= 0.4343) n=6.

Es un importante control a realizar ya que las transaminasas constituyen un excelente marcador de lesión hepatocelular. La ALT es una enzima citosólica que se encuentra en altas concentraciones en el hígado, por lo cual es la más específica de este órgano. La lesión hepatocelular y no necesariamente la muerte celular desencadenan la liberación de estas enzimas en la circulación. La AST es menos específica y sensible para el hígado. Entre las causas de aumento de las transaminasas se encuentran: alcohol, medicamentos esteatosis hepática no alcohólica, hepatitis virales, enfermedades autoinmunes, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, insuficiencia cardíaca congestiva y hepatitis isquémica (Baracho y cols., 2009).

## ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS

### Captación de glutamato

En la figura 23 se puede observar el efecto del EPC sobre la captación de Glu. Se observa una disminución en el curso temporal (1-30 minutos) de la captación de Glu en la CF en el grupo estrés+etanol, con diferencias significativas a los tiempos 2, 3, 20 y 30 minutos. Por otro lado en el Hic el efecto de ese tratamiento fue opuesto, hallamos un aumento en la captación con diferencias significativas a los tiempos 3, 5, 20 y 30 minutos.

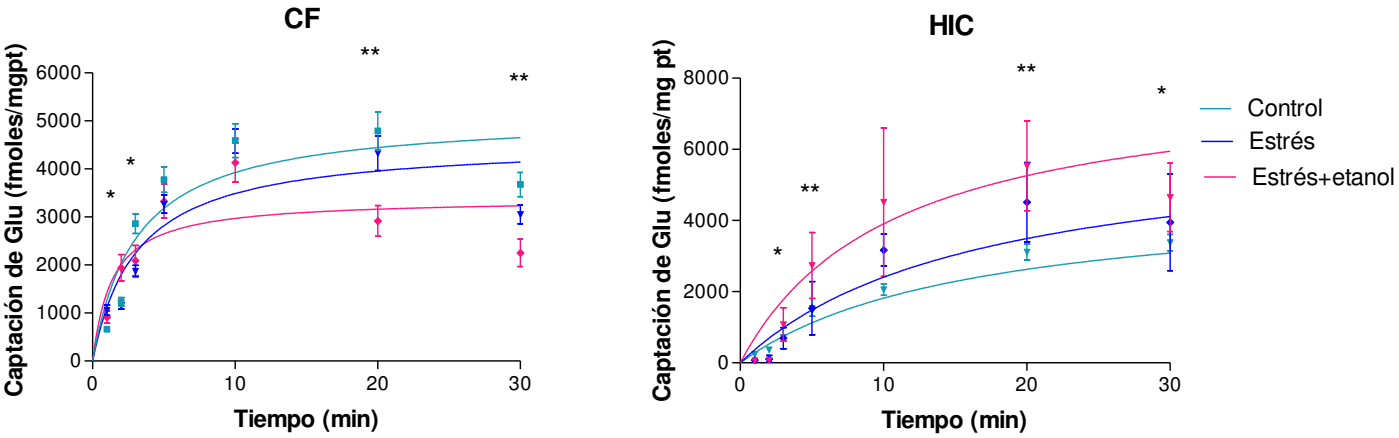



Figura 23: Captación de [$^3$H]-Glutamato en preparaciones enriquecidas con sinaptosomas frescos obtenidos de CF e Hic (ANOVA de dos vías con medidas repetidas, n=4-5).

En ninguna de las áreas estudiadas se vieron cambios significativos entre el control y el EPC en cuanto a la captación de glutamato en el curso temporal de 1 a 30 minutos. El fenómeno analizado es el resultado general de múltiples variables, tres tipos diferentes de transportadores (EAAT-3, GLT-1 y GLAST) que pueden ser regulados en número y afinidad por el sustrato.

**Expresión de los transportadores de glutamato**

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica de western blot. Las autorradiografías fueron analizadas con el programa ImageJ obteniéndose así la densidad óptica (D.O.) de las bandas para poder compararlas entre sí. Se utilizó la proteína α–actina como control de carga y proteína fibrilar ácida glial (GFAP) como marcador glial.

En todas las muestras corridas se encontró la proteína GFAP, pero no hallamos diferencias significativas entre los grupos estudiados en ningún tratamiento utilizado (CF: ANOVA de una vía $F_{2,12}$=2,109 p=0,1641; Hic ANOVA de una vía $F_{1,9}$=1,225 p=0,3383). Esto nos asegura que las muestras, obtenidas de los homogenatos de cerebro, contenían una fracción glial y además al no ver diferencias significativas en los niveles del marcador, podemos afirmar que las diferencias halladas en los niveles de GLT-1 y GLAST no se deben a cambios en la cantidad de células gliales.

En el Hic se ve una clara disminución en EAAT-3 y GLT-1 siendo en ambos casos mayor la disminución en los grupos estrés+etanol. Sin embargo, notamos un gran aumento en los niveles de expresión del transportador glial GLAST en ambos grupos estresados (Figura 24).

Con el tratamiento distinguimos una disminución en la expresión de GLT-1 y EAAT-3 en los grupos estresados en igual medida. Sin embargo, en la expresión de GLAST vimos un aumento significativo en ambos grupos, siendo menor el aumento en el grupo estrés+etanol (Figura 25).

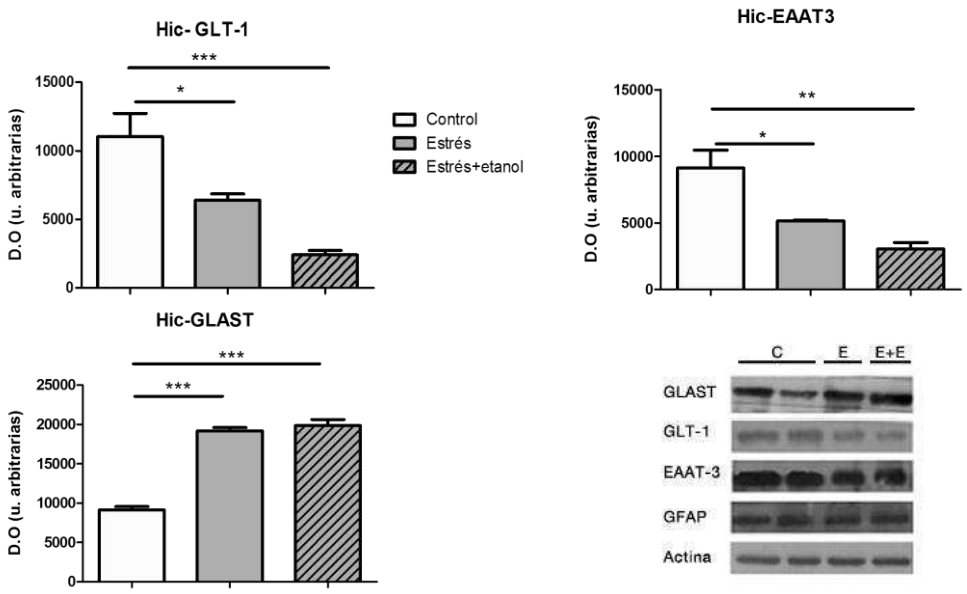



Figura 24: Determinación de los niveles proteicos de los transportadores ANOVA de una vía: a) GLT-1- $F_{2;11}$=17,55, p=0,0008 b) EAAT-3-$F_{2;10}$=11,73, p= 0,0042 c) GLAST $F_{2;13}$=138,1, p<0.0001. Mediciones a través de la técnica de western blot utilizando una extracción proteica de homogenatos de Hic (n=4-6). D.O.: densidad óptica (unidades arbitrarias).

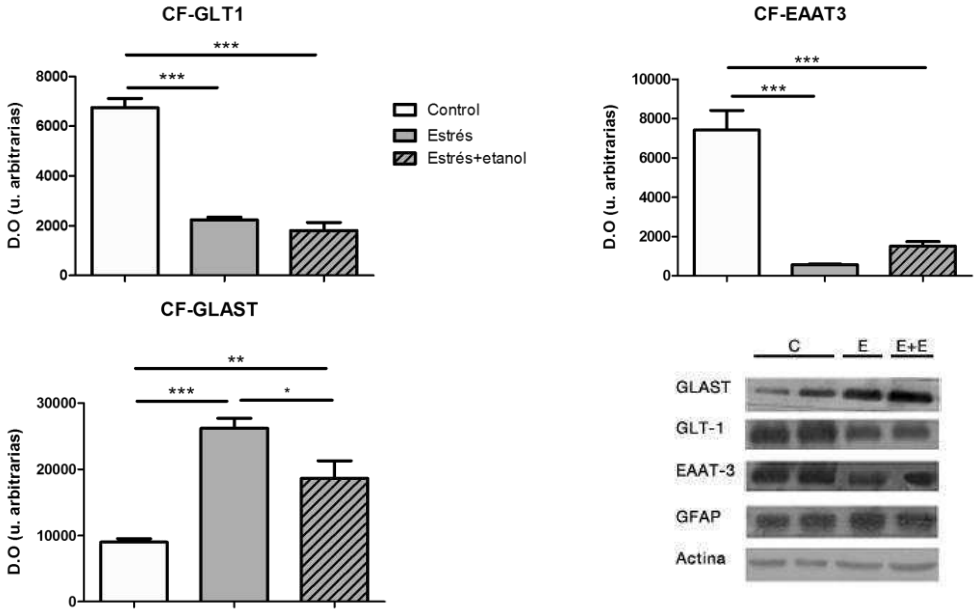



Figura 25: Determinación de los niveles proteicos de los transportadores. ANOVA de una vía: a) GLT-1- $F_{2;11}$= 87,48, p<0.0001 b) EAAT-3-$F_{2;11}$= 39,94, p<0.0001 c) GLAST-$F_{2;13}$= 88,49, p<0.0001. Mediciones a través de la técnica de western blot utilizando una extracción proteica de homogenatos de CF (n=4-6). D.O.: densidad óptica (unidades arbitrarias).

**Experimentos con un inhibidor específico del transportador GLT-1: Dihidrokainato (DHK)**

Al observar cambios en los niveles de captación de Glu y en la expresión de los TGlus decidimos analizar el efecto de un inhibidor específico del principal transportador (GLT-1) en las áreas de estudio. Se calculó el porcentaje de inhibición de cada grupo comparando la captación (5 minutos) con y sin inhibidor (Figura 26).

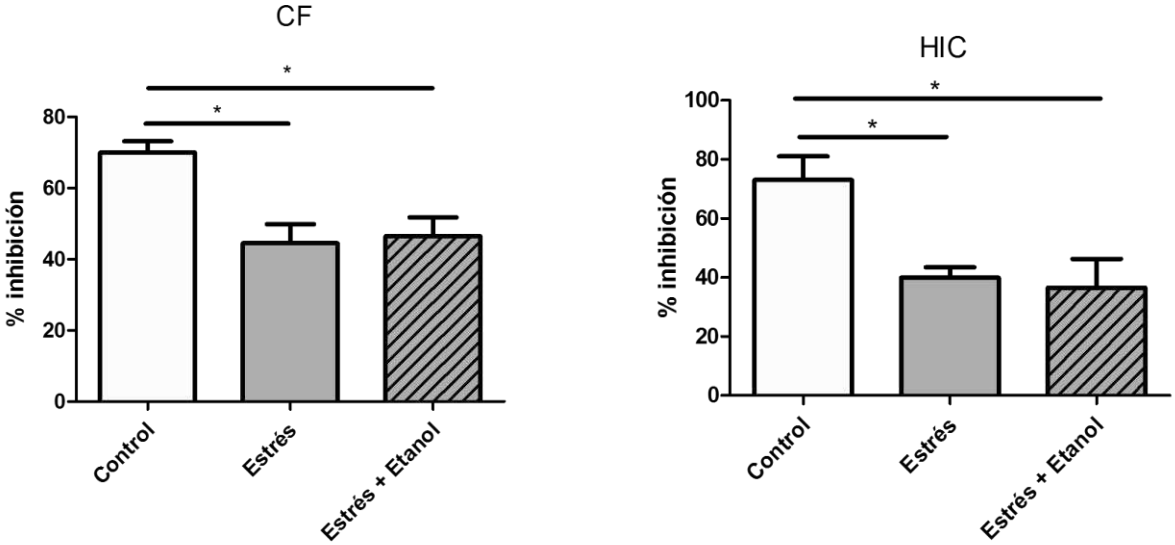


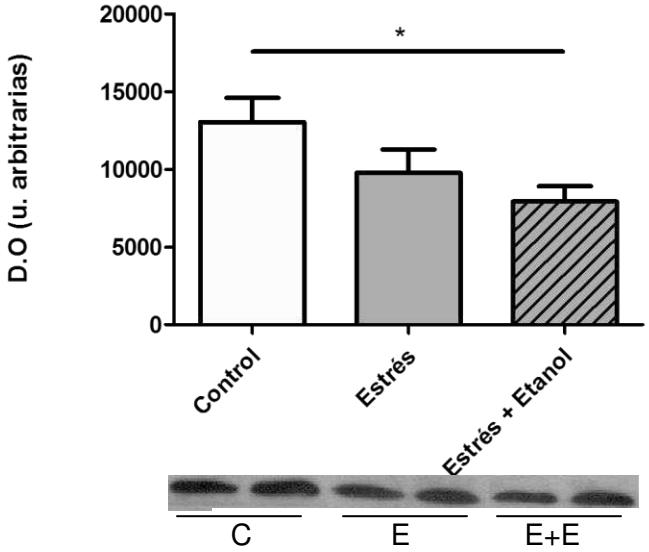

Figura 26: Porcentaje de inhibición de la captación de Glu (5 minutos) por DHK 500 µM ANOVA de una vía, CF: $F_{2, 11}$: 0,7402, p= 0,5039; HIC: $F_{2, 11}$: 7,101, p= 0.0141; n=4.

Se ve tanto en la CF como en el Hic una disminución significativa en el porcentaje de inhibición de la captación de Glu. La captación total en los grupos controles en ambas áreas disminuye un 70% aproximadamente (69.95% en CF y 73.03% en Hic) cuando se inhibe selectivamente GLT-1. No se percibe el mismo fenómeno en los grupos estresados, donde al inhibir GLT-1, la captación de Glu disminuye aproximadamente un 40% (CF: estrés 44%, estrés+etanol 45.5%; Hic: estrés 39%, estrés+etanol 36%).

**ESTUDIOS HORMONALES**

El eje HPA es el principal sistema de respuesta fisiológica de estrés. Es un sistema adaptativo y plástico y se caracteriza por la variabilidad inter e intra-individual. Comienza con la liberación de CRH del núcleo paraventricular hipotálamico al sistema porta induciendo la liberación de ACTH de la adenohipófisis, quien estimula en las glándulas adrenales la liberación de corticoides. Estos a su vez, regulan el eje HPA por retroalimentación negativa a través de receptores hipocampales. Para evaluar el eje HPA en este modelo de EPC y el consumo voluntario de etanol: a) se midieron lo niveles de CRH por western blot (figura 27); b) los niveles de ACTH plasmática mediante un ensayo secuencial inmunométrico (figura 28); c) los niveles plasmáticos de corticosterona por HPLC (figura 29) y d) la expresión de los receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) por western blot (figura 30). En la figura 11 (Materiales y métodos, página 49) se puede ver el eje HPA y los parámetros que decidimos estudiar para analizar su estado.

**Determinación de CRH**



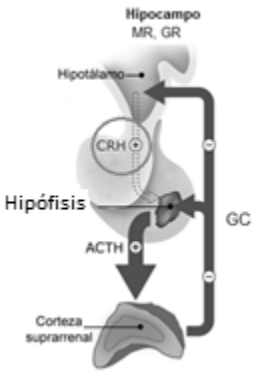




Figura 27: Determinación de los niveles proteicos de CRH. ANOVA de una vía, $F_{2,17}$=3,571 p=0,0539, n=6. Mediciones a través de la técnica de western blot utilizando una extracción proteica de homogenatos de hipotálamo. Se utilizó la actina como control de carga. D.O.: densidad óptica (unidades arbitrarias).

Se pudo analizar una reducción en los niveles de CRH en los grupos estresados, entretanto se distingue una disminución significativa en el grupo estrés+etanol y una tendencia no significativa en el grupo estrés.

**Determinación de ACTH**

Los niveles plasmáticos basales de ACTH disminuyeron significativamente en ambos grupos estresados.

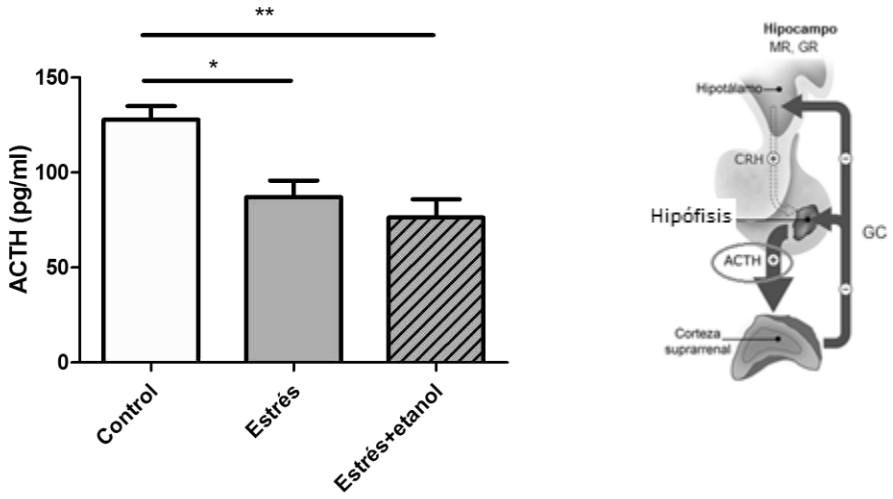



Figura 28: Determinación de los niveles plasmáticos de ACTH mediante ensayo secuencial inmunométrico, n=5-6, ANOVA de 1 vía ($F_{2;15}$= 9,450, p= 0,0029).

**Determinación de corticosterona**

La figura 30 muestra los niveles basales de corticosterona, los cuales disminuyeron significativamente en el grupo estrés mientras que en el grupo estrés+etanol no se vieron diferencias significativas con respecto al grupo control.

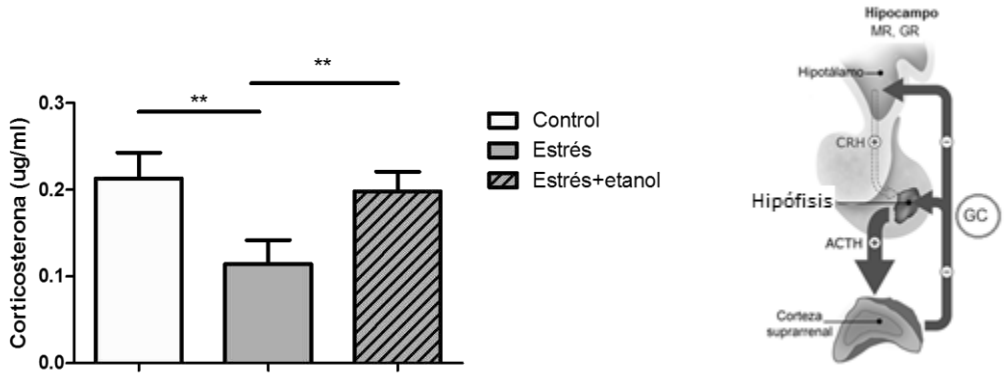



Figura 29: Determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona por HPLC n=6-8, ANOVA de 1 vía ($F_{2;21}$= 10,03, p= 0,0011).

**Determinación de los receptores hipocampales**

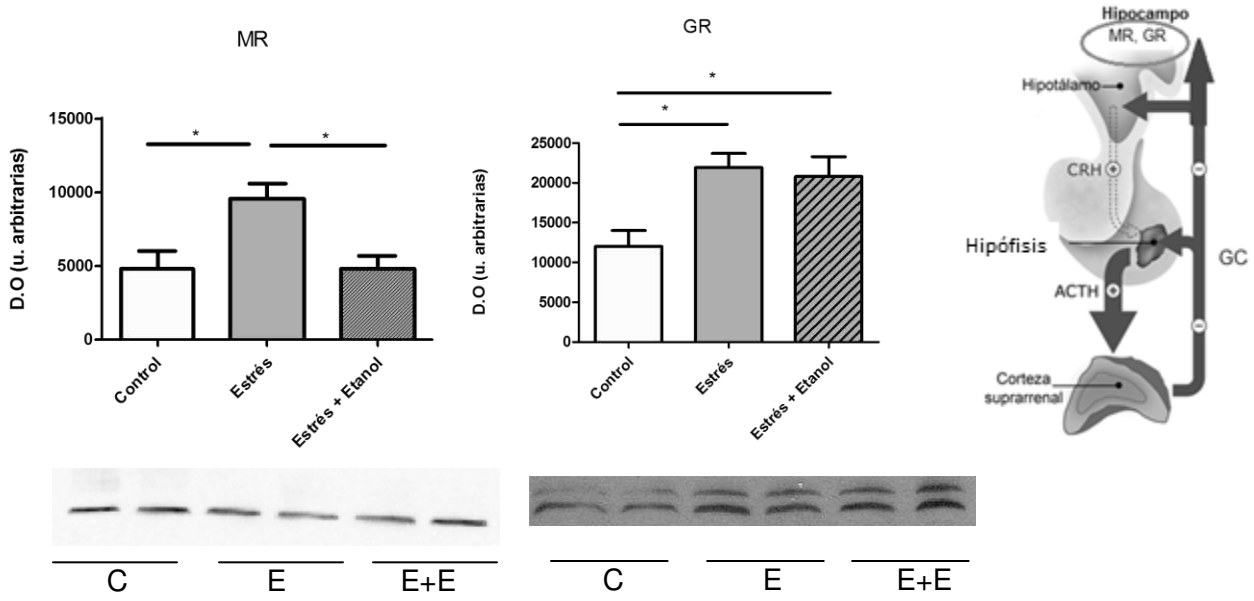



Figura 30: Determinación de los niveles proteicos de MR y GR. ANOVA de una vía: GR: $F_{2,17}$=6,725, p=0,0082, n=6; MR $F_{2,14}$=6,775, p=0,0107, n=6. Mediciones a través de la técnica de western blot utilizando una extracción proteica de homogenatos de hipocampo. Se utilizó la actina como control de carga. D.O.: densidad óptica (unidades arbritrarias).

Encontramos un incremento en los niveles de ambos receptores en el grupo estrés. Mientras que en el grupo estrés+etanol los MR vuelven al mismo nivel que el control, los GR mantienen el mismo nivel que el grupo estrés.

Todas las mediciones del eje HPA fueron realizadas en condiciones basales, lo cual nos permite realizar un análisis del estado del eje en reposo. Para poder analizar el efecto de los tratamientos y de este eje sobre la respuesta al estrés decidimos medir los niveles de ACTH y corticosterona en respuesta al estrés agudo.

## ESTRÉS AGUDO

Luego de caracterizar los niveles basales de las hormonas relacionadas al estrés y el estado general del eje, quisimos ver cómo el eje HPA respondía a un estresor. Para evaluarlo medimos los niveles plasmáticos de ACTH y de corticosterona en respuesta a un estrés agudo (estrés por inmovilización, 2 h).

Cuando analizamos la respuesta al estrés enfrentando al animal a una situación de estrés agudo notamos que tanto los animales controles como los del grupo estrés generaron una respuesta con un notable aumento en los niveles circulantes de ACTH

(Figura 31) y corticosterona (Figura 32), siendo menor el aumento en el grupo estresado. Por otro lado, el grupo estrés+etanol no produjo cambios en este tipo de respuesta.

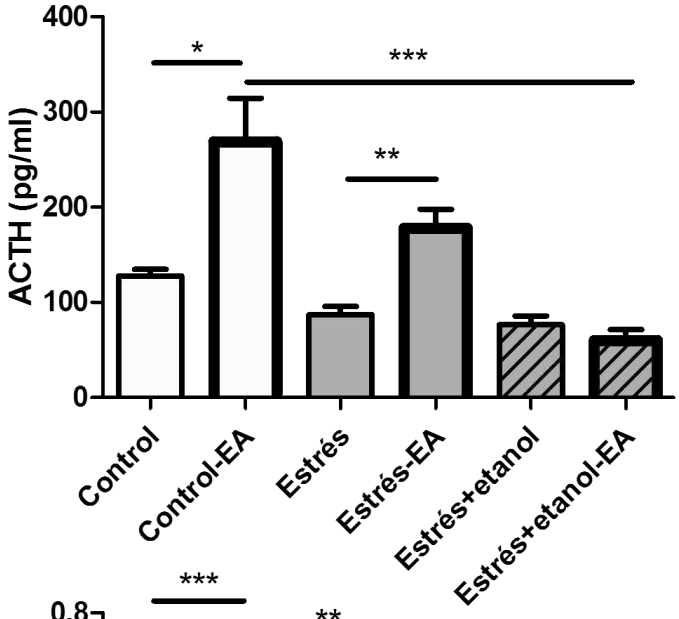



Figura 31: Determinación de los niveles plasmáticos de ACTH mediante ensayo secuencial inmunométrico, n=5. Ratas sometidas a estrés postnatal crónico, ingesta voluntaria de etanol y al PD66 fueron sometidas a un estrés agudo por inmovilización durante 2 h. Al finalizar la sesión de estrés fueron sacrificadas. ANOVA de 2 vías, estrésXEA $F_{2;25}$= 10,10, p= 0,0006: Control-controlEA "t=3.440 gl=7"/Estrés-estrésEA "t=4.147 gl=8"/ Estrés+etanol-Estrés+etanolEA "t=1.086 gl=10"/ANOVA1vía EA, F= 17.53, p=0.0003.

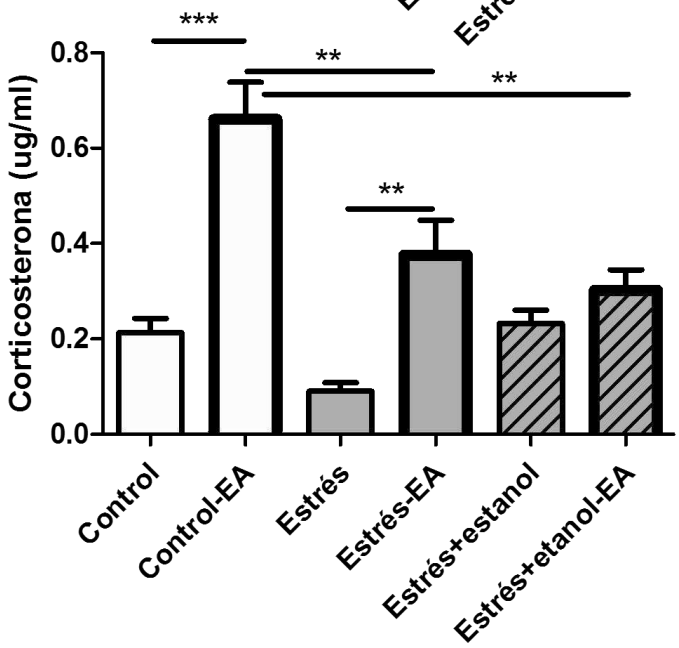



Figura 32: Determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona por HPLC, n=6-8. Ratas sometidas a estrés postnatal crónico, ingesta voluntaria de etanol y al PD 66 fueron sometidas a un estrés agudo por inmovilización durante 2 h y luego fueron sacrificadas. ANOVA de 2 vías, estrésXEA $F_{2;34}$= 8,073, p= 0,0014: Control-controlEA "t=5.360 gl=10"/Estrés-estrésEA "t=4.306 gl=12"/ Estrés+etanol-Estrés+etanolEA "t=1.397 gl=12"/ EA, ANOVA de 1 vía $F_{2,17}$=9.04, p= 0,0042.

## ESTUDIOS CONDUCTALES

Para estudiar posibles cambios conductuales a largo plazo sobre los animales estresados realizamos un conjunto de pruebas de conflicto. Se realizaron en el siguiente orden, recomendado por Crawley (2007): 1- Laberinto elevado en cruz (Figura 33); 2- Transición luz-oscuridad (Figura 34); 3- Campo abierto (Figura 35).

### 1-Laberinto elevado en cruz

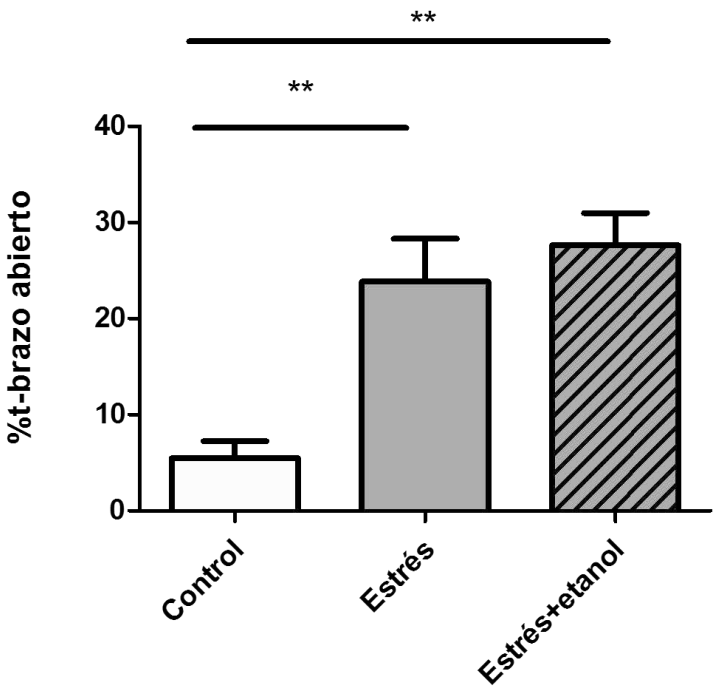
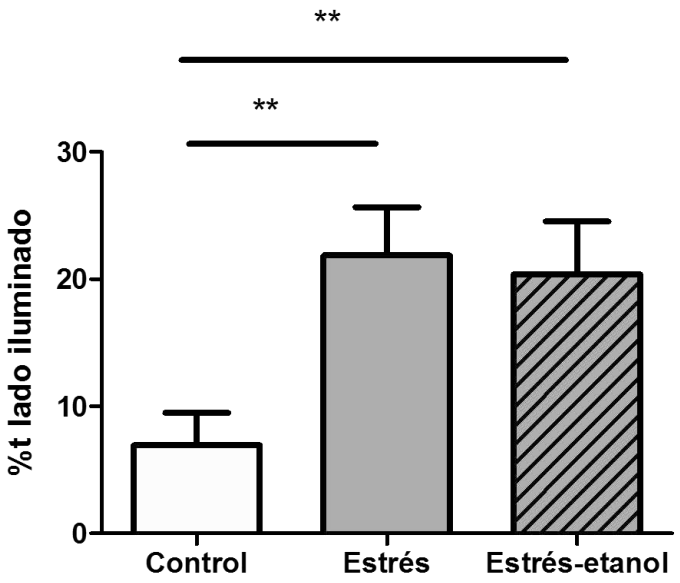


Figura 33: Porcentaje de tiempo (%-t) en el brazo abierto. Se realizaron los controles correspondientes a la prueba (distancia total recorrida y número de entradas a ambos brazos) ANOVA de 1 vía, $F_{2;34}$= 20,18, $p<0.0001$ n=8-11. A la derecha imagen tomada durante el análisis con el software Ethovision.

**2-Transición luz-oscuridad**



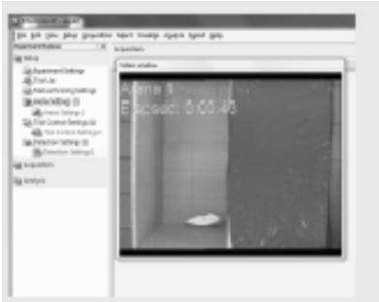



Figura 34: Porcentaje de tiempo (%-t) en el lado iluminado. Se realizaron los controles correspondientes a la prueba (distancia total recorrida y número de entradas a ambos brazos) ANOVA de 1 vía, $F_{2;38}$= 6,678, p= 0,0034, n=8-11. A la derecha imagen tomada durante el análisis con el software Ethovision.

**3-Campo abierto**

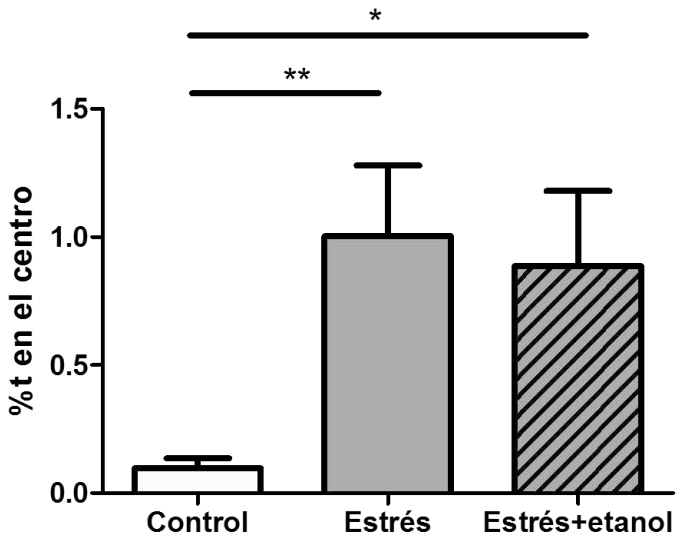


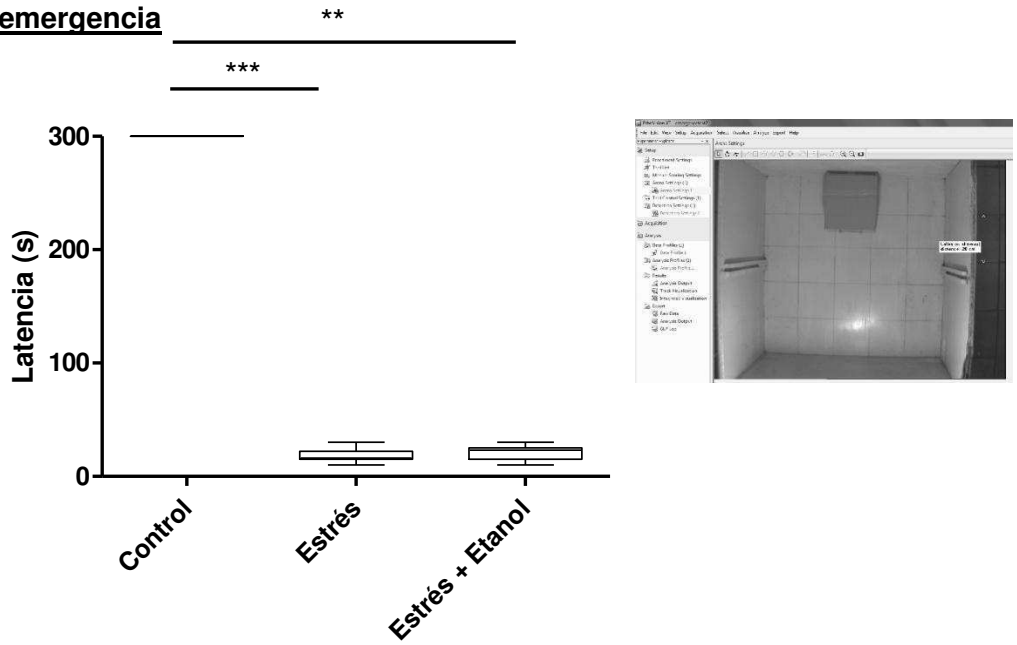
Figura 35: Porcentaje de tiempo (%-t) en el centro. Se realizaron los controles correspondientes a la prueba (distancia total recorrida) ANOVA de 1 vía, $F_{2;35}$= 6,886, p= 0,0032, n=8-11. A la derecha imagen tomada durante el análisis con el software Ethovision.

Las respuestas conductuales analizadas en las tres pruebas presentan un patrón similar, en todos los experimentos observamos que los animales estresados exploran más los ambientes aversivos (brazos abiertos, lado iluminado, zona del centro) que los controles, esto se explicaría como un efecto ansiolítico (Figuras 33-35).

Se sabe que tanto el estrés agudo en adolescentes y adultos, como el estrés crónico en adultos, provocan un aumento en los niveles del comportamiento tipo ansioso y que las pruebas utilizadas evalúan el conflicto: actividad exploratoria-ambiente aversivo. Por lo que se propone, que lo que podría estar alterado en estos animales son los niveles de impulsividad. Esto podría explicar la conducta en estos test de conflicto y el aumento en el consumo de etanol. Para analizar esta hipótesis, se recurrió a una prueba específica donde se miden los niveles de impulsividad: la prueba de emergencia. Ésta se basa en el mismo concepto de aversión a los ambientes abiertos e iluminados junto a un lugar seguro, pero las condiciones son mucho más extremas, es una situación en la que a menos que el animal sea impulsivo no se atreve a salir.

**4- Prueba de emergencia**

A




B

| | Control | Estrés | Estrés + Etanol |
|---|---|---|---|
| **Frecuencia de escape** | 0/8 | 7/7 | 7/7 |

Figura 36: A: Latencias de escape de la prueba de emergencia (resultados expresados como mediana, máximo y mínimo). Análisis estadístico: Kruskal-Wallis =15,80, p=0,0004; B: Tabla con frecuencias de escape. A la derecha imagen tomada durante el análisis con el software Ethovision.

Se percibió un claro aumento en los niveles de impulsividad en los animales estresados, conducta que no se ve reducida por el consumo de etanol.

Esta conducta impulsiva en los animales estresados podría explicar el efecto “ansiolítico” del tratamiento en las tres pruebas de conflicto realizadas. Si un animal tiene altos niveles de impulsividad, la prueba de conflicto no puede utilizarse para los fines propuestos, ya que el comportamiento del animal está siendo “dirigido” por su impulsividad. No es la falta de miedo al ambiente aversivo lo que lo hace explorar más ese ambiente, sino su conducta impulsiva. De hecho, el laberinto elevado en cruz se utiliza como prueba confirmatoria de muchas pruebas de impulsividad (Irimia y cols., 2013).

**RESUMEN DE RESULTADOS EXPUESTOS**

| **GLUTAMATO** | | |
|---|---|---|
| | **Estrés** | **Estrés + etanol** |
| **HIPOCAMPO** | | |
| Captación | - | ↑ |
| EAAT-3 | ↓ | ↓↓ |
| GLT-1 | ↓ | ↓↓↓ |
| GLAST | ↑↑ | ↑↑ |
| | | |
| **CORTEZA FRONTAL** | | |
| Captación | - | ↓ |
| EAAT-3 | ↓↓ | ↓↓ |
| GLT-1 | ↓↓ | ↓↓ |
| GLAST | ↑↑ | ↑ |

Tabla 3: Resumen de los resultados de los estudios neuroquímicos con respecto a los valores controles.

| **EJE HPA** | | |
|---|---|---|
| | **Estrés** | **Estrés + etanol** |
| CRH | - | ↓ |
| ACTH | ↓ | ↓↓ |
| Corticosterona | ↓ | - |
| MR | ↑ | - |
| GR | ↑ | ↑ |

Tabla 4: Resumen de los resultados de los estudios hormonales.con respecto a los valores controles

| **COMPORTAMIENTO** | | |
|---|---|---|
| | **Estrés** | **Estrés + etanol** |
| Tiempo en el lado aversivo | ↑ | ↑ |
| Latencia de escape prueba de emergencia | ↑ | ↑ |

Tabla 5: Resumen de los resultados de los estudios conductuales con respecto al grupo control.

## PARTE II- AMBIENTE ENRIQUECIDO

Si bien, experiencias negativas durante la infancia como el aislamiento social aumentarían la vulnerabilidad a padecer desórdenes afectivos, se ha observado que experiencias positivas como crecer en un ambiente enriquecido disminuiría la vulnerabilidad al efecto de las drogas. Solinas y colaboradores (2009) observaron que ratones que han sido criados en un ambiente enriquecido presentan una disminución de las propiedades reforzantes y estimulantes de cocaína, en comparación con animales criados en condiciones estándares.

Tal y cómo se ha descripto en la introducción, las experiencias ambientales juegan un papel clave en la determinación de los fenotipos conductuales. La crianza en ambientes enriquecidos es una de las experiencias con más efectos descriptos sobre el desarrollo del sistema nervioso y con más repercusiones en las habilidades cognitivas y conductuales de los animales de laboratorio. Aunque todavía no está muy claro el sentido de los cambios que produce el AE, en general apuntan a la mejoras, tanto a nivel conductual como fisiológico.

Por todo esto, nos interesó evaluar la existencia de una posible reversión de efectos del EPC por un AE en algunas de las variables estudiadas. Se comprobó la reversión conductual en cuanto a la ingesta de etanol, ya que el grupo estrés + AE bebió los mismos niveles de etanol que el grupo control.

### INGESTA VOLUNTARIA

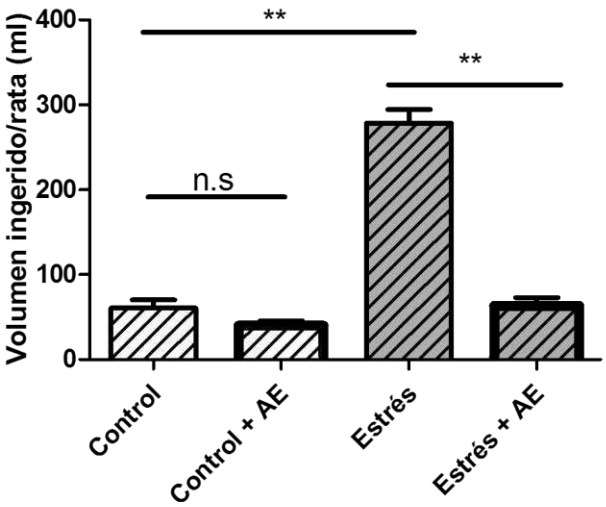



Figura 37: Volumen (ml) de 2° ingesta voluntaria de ETANOL por rata en 7 días, con un período (30 días) de ambiente enriquecido entre ingestas (n=6). ANOVA 2 factores, estrésXambiente enriquecido ($F_{1;20}$= 80,17); Control-Control+AE t=1.874 gl=10; Control-Estrés (t=11.73 gl=10); Estrés-Estrés+AE (t=11.53 gl=10).

Cuando medimos los niveles basales de corticosterona en los animales que estuvieron en un ambiente enriquecido, vimos que el grupo estresado, el cual tenía disminuidos los niveles basales (Figura 24), recuperaron los valores del grupo control (Figura 38).

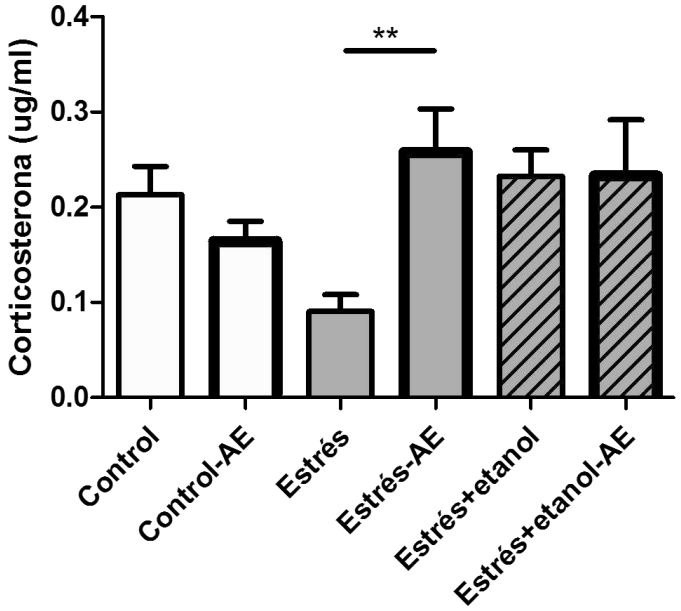



Figura 38: Niveles plasmáticos de corticosterona medidos por HPLC, n=6-8. Ratas sometidas a estrés postnatal crónico, las dos ingestas voluntarias de etanol con un período (30 días) de ambiente enriquecido entre ingestas. ANOVA de 2 vías, estrésXAE $F_{2;34}$= 5,348, p= 0,0096; Estrés-EstrésAE "t=3.776 gl=12".

**ESTUDIOS CONDUCTALES**

Para estudiar el posible efecto del ambiente enriquecido sobre la conducta en los animales estresados repetimos el conjunto de pruebas de conflicto. Se realizaron en el mismo orden establecido anteriormente (Crawley, 2007): 1-Laberinto elevado en cruz (figura 39), 2-transición luz-oscuridad (figura 40), 3-campo abierto (figura 41).

**1-Laberinto elevado en cruz**

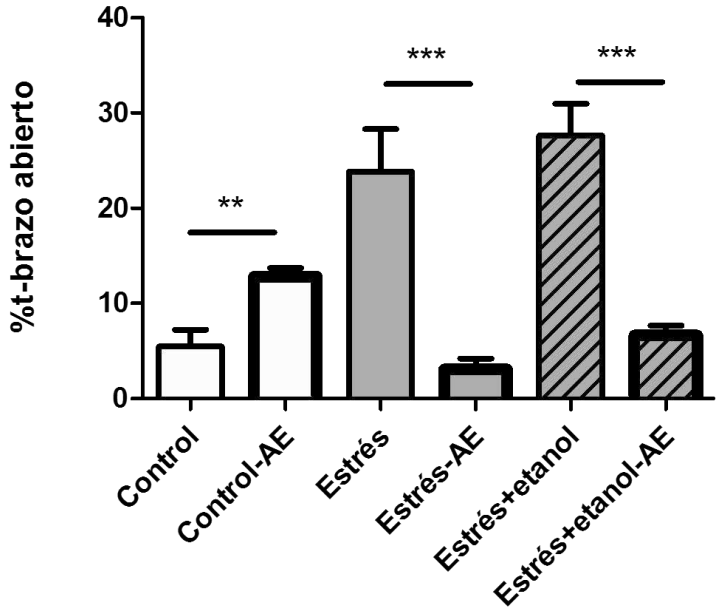



Figura 39: Porcentaje de tiempo en el brazo abierto en ratas con tratamiento estándar y ratas criadas en ambiente enriquecido durante el período entre ingestas. Controles "t=3.248 gl=27", Estrés "t=5.421 gl=18", Estrés+etanol "t=6.703 gl=21". n=8-11.

**2-Transición luz-oscuridad**

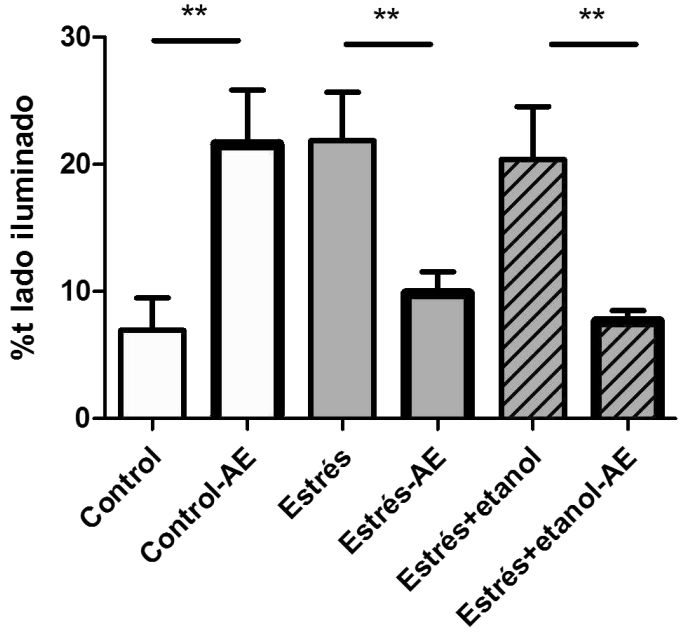



Figura 40: Porcentaje de tiempo en el lado iluminado en ratas con tratamiento estándar y ratas criadas en ambiente enriquecido durante el período entre ingestas. Controles " "t=3.112 gl=27"", Estrés " "t=2.977 gl=21"", Estrés+etanol " "t=3.279 gl=22"". n=8-11.

**3-Campo abierto**

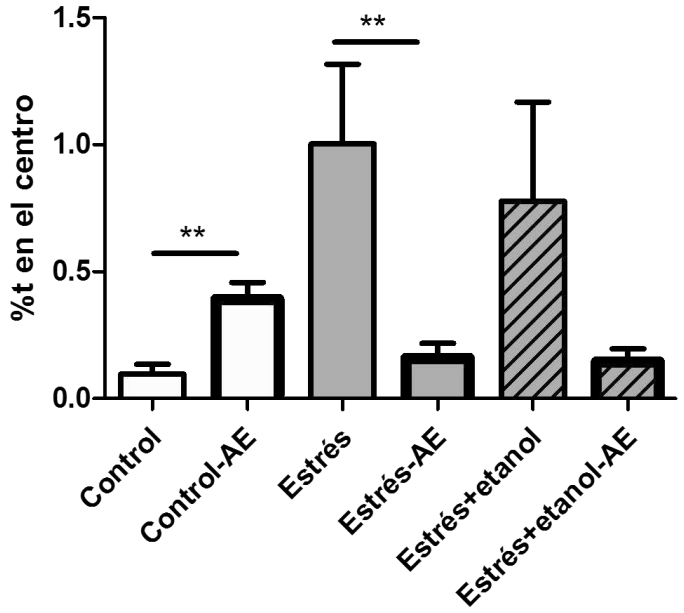



Figura 41: Porcentaje de tiempo en el lado iluminado en ratas con tratamiento estándar y ratas criadas en ambiente enriquecido durante el período entre ingestas. Controles "t=4.019 gl=26", Estrés "t=3.218 gl=18", Estrés+etanol "t=2.055 gl=19". n=8-11.

Cuando los animales son expuestos a un ambiente enriquecido se puede distinguir una reversión en los grupos estresados, volviendo a los niveles de los animales control. Además se vio un efecto ansiolítico (ya descripto en bibliografía; Simpson, 2011) en los grupos controles (Figuras 39-41).

# Discusión

"Las cosas están ligadas por lazos invisibles: no se puede arrancar una flor sin molestar una estrella." Galileo Galilei

## DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis proporciona evidencias de los cambios conductuales y neuroquímicos inducidos por el estrés postnatal crónico en ratas adultas. Las principales conclusiones de este estudio, que se irán discutiendo a continuación, son las siguientes:

1- El EPC aumenta la ingesta voluntaria de etanol.
2- El tratamiento mostró alteraciones en el eje HPA y su respuesta en ratas adultas.
3- Se vieron efectos conductuales a largo plazo en las ratas estresadas en las que se encontraron aumentados los niveles de impulsividad.
4- El EPC afectó la captación de glutamato en el Hic y en la CF a través de aumentos o disminuciones en los niveles de sus transportadores, tanto gliales como neuronales. Mientras que los niveles de GLT-1 y EAAT-3 disminuyeron en los grupos estresados, los niveles de GLAST se incrementaron.
5- El ambiente enriquecido durante la adolescencia revirtió algunos de estos efectos: la ingesta de etanol, la respuesta conductual en pruebas de conflicto y los niveles de hormonas relacionadas al estrés.

Nuestro modelo experimental mostró una ingesta voluntaria de alcohol inducida por estrés postnatal crónico. Este resultado es muy importante y abre nuevos caminos para futuras investigaciones. Hemos establecido un protocolo experimental utilizando el EPC como un modelo para estudiar la influencia del ambiente temprano en el comportamiento y la neuroquímica en roedores. Es sabida la relación entre el estrés y las adicciones pero poco se sabe acerca de los mecanismos involucrados en dicha vulnerabilidad.

Se ha demostrado que el estrés agudo y el crónico aumentan la susceptibilidad a la adicción, así como las tasas de recaída (Briand y Blendy, 2010). Análisis de comorbilidad indican que existe una mayor prevalencia de la adicción en pacientes diagnosticados con trastornos de ansiedad y depresión (Ford y cols., 2009; Herrero y cols., 2008) sugieriendo que eventos estresantes durante la vida pueden predisponer a las personas a convertirse en adictos y perpetuar el ciclo de la adicción (Briand y Blendy, 2010).

Nosotros proponemos este protocolo como modelo de ingesta voluntaria para seguir profundizando el conocimiento acerca de este vínculo entre el estrés y el consumo de alcohol. Obtuvimos el modelo experimental para abordar el tema e iniciamos una primera caracterización, enfocándonos en el eje HPA, la captación de Glu en dos áreas cerebrales claves y en algunas respuestas conductuales en ratas adultas. Una vez investigados estos puntos quisimos ver si era posible la reversión de esta conducta de ingesta a través de un tratamiento sin fármacos, por lo que decidimos trabajar con un ambiente enriquecido durante la adolescencia. Una vez probada la reversión en la ingesta de alcohol, medimos algunos de los parámetros antes analizados.

Un gran número de modelos animales se han desarrollado para observar no solo los efectos de las situaciones sociales específicas sobre la ingesta de alcohol, sino también para evaluar la participación de factores genéticos (Anacker y Ryabinin, 2010). Aquí encontramos un modelo útil para estudiar la ingesta voluntaria de etanol en ratas, siendo diferente el modo en el que se obtiene la preferencia, en este modelo el efecto es a largo plazo. Los modelos animales más utilizados hasta ahora proponen un estrés en el adulto en simultáneo al ofrecimiento de la bebida o droga a estudiar. El período postnatal y el vínculo entre madre e hijo parecen particularmente importante en el desarrollo, la conformación de la respuesta al estrés normal y el comportamiento emocional (Ellenbroek y Cools, 2000; Pryce y cols., 2005). Este modelo permitiría estudiar los efectos a largo plazo de estos estímulos adversos en la vida temprana y vincularlos con la vulnerabilidad al abuso de sustancias.

Lodge y Lawrence (2003) demostraron una interacción entre la desregulación del eje HPA inducida por aislamiento y el alcohol. Este estudio indicó que la activación del eje HPA era importante para la preferencia de etanol observada en ratas adultas aisladas. Consideramos que nuestro protocolo experimental proporciona un modelo apropiado para seguir investigando la relación entre el eje HPA y el consumo de etanol. Nuestros resultados demostraron una disminución en los niveles basales de las principales hormonas del eje HPA inducido por el EPC. Los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona disminuyeron en los grupos tratados, mientras que los niveles proteicos de CRH en el hipotálamo presentan una tendencia que no llega a ser significativa. Estos resultados apuntan a un menor nivel basal del eje que podría deberse al aumento en los niveles de los receptores hipocampales, MR y GR. Dichos receptores se encontraron aumentados en el hipocampo y se sabe que son los responsables de la regulación por retroalimentación negativa del eje.

Ya ha sido demostrada la capacidad de habituación del eje HPA ante la repetición de un estresor (Masini y cols., 2012) y mientras que en un principio se pensaba que era a causa de la habituación de los sistemas sensoriales, hoy se cree que podrían estar involucradas áreas cerebrales relacionadas al proceso de habituación u otro tipo de respuestas, como por ejemplo el hipocampo. Nuestro modelo muestra no sólo una habituación con niveles disminuidos de las hormonas implicadas frente a la repetición del estímulo, sino también que dicho efecto es a largo plazo. Hemos hallado estos niveles disminuidos aún en la edad adulta, 60 días después de haber comenzado el tratamiento. Además determinamos la capacidad de respuesta del eje HPA y también encontramos esta reducción. Los animales generan una respuesta, pero el pico hormonal sigue siendo menor que en los controles.

Al no encontrar diferencias en los niveles de CRH, sugerimos que podría deberse a que los cambios en esta hormona, río arriba de los últimos efectores, son siempre menores en cuanto a su magnitud. Un cambio pequeño en las concentraciones de CRH genera una variación considerablemente mayor en los niveles de corticosterona. Podríamos estar impedidos, en cuanto a las técnicas disponibles, de ver diferencias en CRH, pero es probable que ese cambio haya ocurrido, ya que en los niveles de corticosterona sí observamos un efecto del tratamiento. Con los datos obtenidos se plantea un modelo de los efectos del estrés sobre estos parámetros hormonales (Figura 42).

Estos resultados muestran el gran efecto que tiene el EPC sobre el SNC en desarrollo, cómo puede ejercer efectos a largo plazo y alterar la respuesta al estrés a lo largo de la vida de un individuo. Del mismo modo, se abre un camino posible para profundizar los mecanismos involucrados en el aumento de ingesta de alcohol por estrés. Las consecuencias del estrés sobre el eje HPA quedan demostrados y se vieron alterados por el consumo de alcohol. Los parámetros analizados podrían ser uno de los vínculos entre el ambiente adverso y el inicio en el consumo de bebidas, pero para afirmar una relación y ampliar el conocimiento al respecto, hacen falta un gran número de experimentos que sería muy interesante realizar, tanto a nivel celular como conductual.

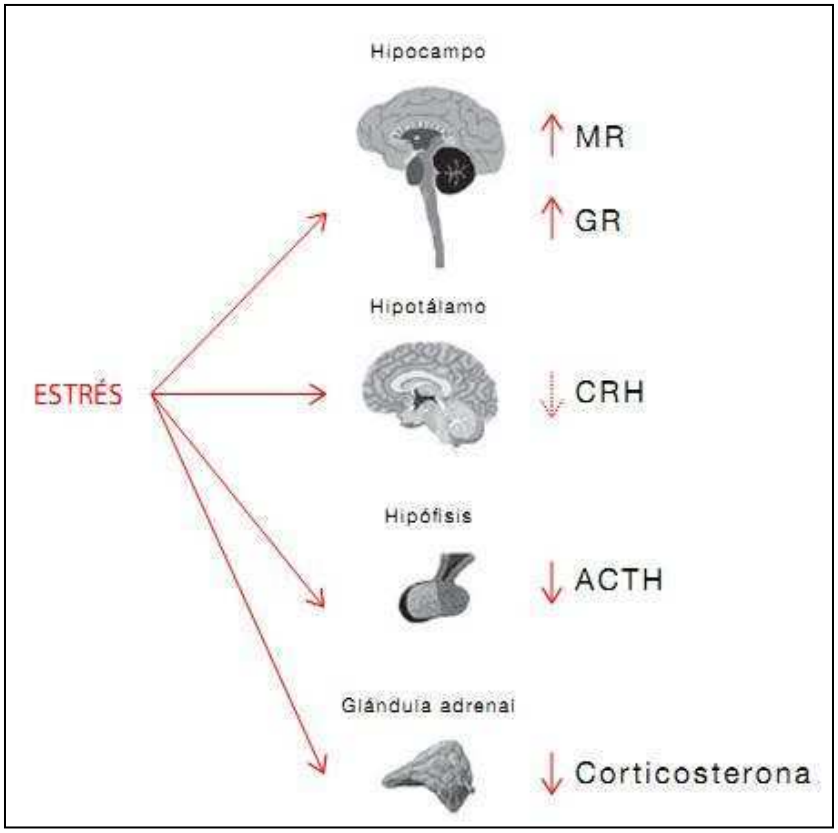



Figura 42: Efectos del EPC sobre el eje HPA.

Por otro lado, tenemos los animales que fueron expuestos al EPC y bebieron alcohol. En estos animales encontramos aumentado el receptor GR pero no el MR. Mientras que se encuentran disminuidas CRH y ACTH, no se observan alteraciones en los niveles de corticosterona con respecto al grupo control. Esto habla de niveles plasmáticos de corticosterona que sortearon la disminución del tratamiento de EPC. Es sabido que el etanol aumenta los niveles plasmáticos de corticosterona a distintas dosis en roedores, tanto adolescentes como en adultos (Willey y cols., 2012), pero poco se sabe de los mecanismos involucrados. La disminución en los niveles de MR hipocampal podrían explicar dicho fenómeno, ya que son los principales involucrados en la regulación del eje HPA por retroalimentación negativa. Otro punto a tener en cuenta acerca de estos receptores es su influencia en la relación de la expresión de moléculas pro- y anti-apoptóticas. Mientras que GR induce la muerte celular, se ve el efecto contrario con la activación de MR (Almeida y cols., 2000). Este grupo que bebe alcohol tendría desequilibrada dicha relación y seguramente una mayor tasa de muerte neuronal en el hipocampo. Se conoce que el etanol induce la muerte celular a dosis medias y altas por diversas vías y en diferentes sistemas (Okłota y cols., 2009.). Podría ser esta una nueva

vía por la cual el etanol induciría la muerte neuronal en el hipocampo, a través del balance en la expresión de los receptores de corticosterona. La disminución de MR en este modelo sería un efecto negativo que llevaría a un aumento en la tasa de muerte neuronal. El estrés crónico en adultos conduce a patrones de expresión hipocampales similares (sube GR, baja MR) y su consiguiente reducción en el número de neuronas (Almeida y cols., 2000). En el modelo de EPC es posible que ocurra lo mismo (también es un estrés crónico), pero a largo plazo no se mantiene dicha relación, ya que también vemos un gran aumento en MR, lo cual podría indicar un mecanismo de compensación. Pero cuando estos animales beben alcohol, los niveles de MR disminuyen y esta situación conduce a una disminución de la retroalimentación negativa, con un aumento en los niveles de corticosterona, y su consecuente aumento en la tasa de muerte neuronal en el hipocampo.

Otro posible punto de contacto entre el estrés y el consumo de alcohol es la transmisión glutamatérgica. Están descriptos en detalle todos los efectos del etanol sobre los receptores de Glu en distintas áreas cerebrales (Komáreková y Janík, 2012; Möykkynen y Korpi, 2012). Sin embargo, no se ha estudiado este sistema en la instancia previa a la ingesta y también es poca la información acerca de los efectos tanto del estrés como del alcohol sobre los niveles extracelulares y el transporte de este NT. Por esto nos interesó estudiar el transporte de Glu en áreas claves, que relacionan al estrés y las adicciones, como son el Hic y la CF.

No encontramos diferencias significativas en los niveles de captación de Glu por EPC, sin embargo, sí hemos hallado diferencias en los niveles proteicos de los transportadores. Estudios previos de nuestro laboratorio (Odeon y cols., 2013) mostraron que el estrés agudo lleva a una disminución en los niveles de captación de Glu y se ha demostrado que un incremento en los niveles de GC aumenta los niveles extracelulares de Glu (Danbolt, 2001). Teniendo en cuenta estos datos y las variaciones en los niveles de expresión de los transportadores podemos pensar que existe un mecanismo de compensación que lleva a estabilizar la recaptación de este NT, ya que es de suma importancia mantener controlados los niveles extracelulares de Glu.

Encontramos una notable disminución en los niveles de expresión de GLT-1 (el principal recaptador en las áreas estudiadas) y EAAT-3, sin embargo vimos un claro aumento del tercer transportador presente en CF e Hic: GLAST. Este transportador glial es de baja expresión en dichas áreas en condiciones normales pero en estos animales lo encontramos en niveles muy altos. Podríamos pensar que la disminución de expresión de

la captación de Glu y su potencial consecuencia excitotóxica podría desencadenar un mecanismo de compensación a través del aumento de GLAST. Existe amplia evidencia de una regulación diferencial de las expresiones de GLT-1 y GLAST. Los astrocitos parecen expresar GLAST constitutivamente y sus niveles pueden aumentar por la activación de receptores de glutamato y por co-cultivo con neuronas. En contraste, la expresión astroglial de GLT-1 es inducida y mantenida por factores neuronales solubles, la naturaleza del factor estimulante en los medios condicionados neuronales es aún desconocida. En estudios *in vitro* de astrocitos cultivados en ausencia de neuronas se ve una alta expresión de GLAST, pero muy baja de GLT-1 (Danbolt, 2001). Como estos transportadores son esenciales para el desarrollo y son indispensables en el control de las concentraciones extracelulares de Glu, es lógico encontrar cambios en sus niveles, efectos a largo plazo y mecanismos de compensación.

Los inhibidores de los TGlus son herramientas cruciales para dilucidar las funciones fisiológicas de estos transportadores en detalle. Creímos importante trabajar con inhibidores específicos con el fin de comprender mejor el funcionamiento del sistema glutamatérgico y los efectos del tratamiento. Hicimos experimentos con el compuesto DHK (dihidrokainato), un inhibidor selectivo de GLT-1. Observamos una disminución significativa de la captación de Glu y vimos que el porcentaje de inhibición cuando GLT-1 es bloqueado es menor en los grupos estresados. Esto nos lleva a pensar que la proporción de Glu recaptado por GLT-1 es menor en los grupos tratados. Por lo que, es posible deducir que la función de GLAST en estos animales sea mayor que en los controles, lo que apoyaría la idea de un mecanismo compensatorio a través de GLAST. El incremento en sus niveles de expresión y la disminución en el porcentaje de inhibición de DHK en los grupos estresados podrían explicar que no haya diferencias en la captación a pesar de la disminución en la expresión de los transportadores: GLT-1 y EAAT-3.

En resumen, proponemos que el EPC induce una disminución en EAAT-3 y GLT-1 y un mecanismo de compensación se activaría para evitar los efectos citotóxicos. El mecanismo adaptativo incluiría una mayor función de GLAST en la captación total de Glu con un incremento significativo en sus niveles de expresión, dando lugar a un aumento en la captación, evitando de este modo incrementos en los niveles extracelulares de Glu en la hendidura sináptica.

En los grupos de ratas que beben alcohol sí se encuentran diferencias en la captación de Glu, observando que en la CF disminuye, mientras que en el Hic aumenta. Se evidencia un claro el efecto diferencial del alcohol en las distintas regiones del SNC, lo

cual puede deberse a variaciones en el curso temporal de los efectos. Es casi una norma, que si por algún motivo disminuye la captación de Glu y sus concentraciones extracelulares comienzan a aumentar, se activan distintos mecanismos que inician el incremento de la recaptación y de esta forma disminuyen los niveles de Glu. Estos mecanismos pueden ser regulaciones transcripcionales o no-transcripcionales según el área del cerebro, el transportador y otros factores (Danbolt, 2001). Nosotros proponemos que tal vez en la CF el mecanismo es más lento que en el Hic y el efecto compensador de la caída en la captación no se puede ver. Los TGlu pueden ser regulados a diferentes niveles por factores neuronales y no neuronales: transcripción, *splicing* del ARNm, traducción, localización de proteínas.

Por otro lado, también creemos posible una relación entre el comportamiento de ingesta de etanol y los efectos en el transporte de Glu. Podría el comportamiento de estos animales encontrar causa en alteraciones en la transmisión glutamatérgica, pero se necesita un mayor número de experimentos para probar esta hipótesis.

La importancia de los eventos adversos en la vida temprana sobre la neurotransmisión glutamatérgica y su impacto en la edad adulta han quedado demostrados. Expuestos los cambios inducidos por el EPC sobre el sistema glutamatérgico; es bueno resaltar que no se debe descartar un posible vínculo del sistema glutamatérgico en estas áreas con los cambios observados en el eje HPA. La corticosterona regula la expresión de los TGlu (Danbolt, 2001) y a su vez los niveles extracelulares de este NT podrían afectar el funcionamiento de los sistemas involucrados en la respuesta al estrés.

Y si continuamos analizando las relaciones entre los parámetros neuroquímicos y hormonales con el estrés y el consumo de alcohol, no hay que dejar de tener en cuenta la conducta de estos animales. Como ya hemos mencionado, nuestro modelo aumenta la ingesta de etanol y nuestro mayor hallazgo fue la obtención de un modelo animal para la ingesta voluntaria de alcohol y el comienzo de su caracterización. Además de la conducta de ingesta anteriormente discutida, estos animales fueron sometidos a distintas pruebas comportamentales. Los resultados muestran que los animales expuestos a situaciones de estrés extremadamente traumáticas, exhiben una variedad de modificaciones neuroquímicas a largo plazo. Esto podría correlacionar con los síntomas observados en pacientes humanos con enfermedades neurológicas, emocionales o cognitivas (Sheldon y Robinson, 2007). Una de las conductas observadas en humanos, producto del estrés, es el aumento en los niveles de ansiedad.

Nosotros decidimos medir posibles alteraciones en los niveles de ansiedad en roedores, para lo cual contábamos con 3 pruebas de conflicto. En todas las pruebas pudimos ver el mismo comportamiento de los animales, que fue el aumento del tiempo de exploración en los ambientes aversivos. Esto indicaría una disminución en los niveles de ansiedad, lo cual iría en contra de lo que uno esperaría y de lo reportado hasta el momento. El laberinto elevado en cruz (EPM) y la caja de transición luz-oscuridad son unos de los modelos más ampliamente utilizados para el estudio de la ansiedad incondicionada y ha sido bien caracterizado y validado etológica y farmacológicamente (Crawley, 2007; Pellow y File, 1986; Rodgers y Dalvi, 1997). Se considera que la conducta en los brazos abiertos del laberinto indica niveles de ansiedad bajos. Los ansiolíticos, como las benzodiacepinas y dosis bajas de alcohol aumentan la conducta en los brazos abiertos y los fármacos ansiogénicos la disminuyen (Pellow y File, 1986).

Sabiendo que, tanto el estrés agudo en adolescentes y adultos como el estrés crónico en adultos provoca un aumento en los niveles del comportamiento tipo ansioso (Pryce y cols., 2005; Spencer y cols., 2014) y que las pruebas utilizadas evalúan el conflicto actividad exploratoria-ambiente aversivo, pensamos que lo que podría estar alterado en estos animales eran los niveles de impulsividad. Esto podría explicar la respuesta conductual observada en las diferentes pruebas y el aumento en el consumo de etanol. Realizamos entonces una prueba específica para esta conducta, llamada prueba de emergencia (Paré y cols., 2001). Mediante esta prueba pudimos confirmar el aumento en los niveles de impulsividad de estos animales. Observamos una latencia de escape del 100% en animales estresados mientras que los controles nunca se atrevieron a salir del lugar seguro; la ingesta de alcohol no alteró dicha conducta. La impulsividad se ha definido como la predisposición a reaccionar de forma inesperada, rápida, y desmedida ante una situación externa que puede resultar amenazante, o ante un estímulo interno propio del individuo, sin tener una reflexión previa ni tomar en cuenta las consecuencias que pueden provocar sus actos (Moeller y cols., 2001). Es un constructo complejo que contiene elementos que se superponen con los componentes centrales de la adicción. La impulsividad puede conducir a un mayor consumo de sustancias o, alternativamente, el uso de sustancias puede promover la impulsividad. Existen estudios que apoyan ambas ideas, sobre todo en modelos animales, en los que los factores ambientales pueden ser más cuidadosamente controlados (Belin y cols., 2008; Nasrallah y cols., 2009).

Hemos hallado un aumento en la impulsividad por EPC y estos animales no presentaron diferencias conductuales con los EPC+Etanol, en ninguna de las pruebas realizadas. Por lo que podemos decir que el alcohol no modificó la impulsividad.

Una vez más, observamos un efecto a largo plazo del EPC y destacamos la importancia de la vida temprana sobre la conducta de un animal adulto. Observamos cambios conductuales, como el aumento en la ingesta de alcohol y en los niveles de impulsividad; como también a nivel neuroquímico en la CF y el Hic, y en los niveles de hormonas relacionadas al estrés. No es posible con esta primera caracterización asegurar relaciones causa-consecuencia entre los parámetros estudiados, sin embargo podemos pensar en posibles vínculos. Todos los parámetros analizados están interconectados entre sí y actúan sobre un sistema muy complejo, como es el SNC, donde las redes neuronales y las interacciones entre áreas y moléculas son innumerables. Tanto las hormonas como el NT analizado contribuyen al comportamiento del animal, que en última instancia es la respuesta final. Las manifestaciones conductuales aberrantes que se producen durante la adicción han sido juzgadas como una elección personal, pero numerosos estudios en las últimas décadas, han puesto de manifiesto una alteración subyacente a las regiones del cerebro que son elementales para los procesos normales de la motivación, la recompensa y el control inhibitorio en individuos adictos. Esto proporciona la base para una visión distinta: que la adicción es una enfermedad del cerebro y el comportamiento anormal asociado podría ser el resultado de la disfunción del tejido cerebral.

Numeramos y resaltamos los efectos a largo plazo de las situaciones adversas en la vida temprana, pero es importante la forma en que se analizan estos efectos. Nosotros no pensamos que estos efectos sean irreversibles, no por encontrar un efecto a largo plazo, hay que pensar de un modo determinista. Es por esta razón, que quisimos intervenir el tratamiento y combinar el estrés postnatal con un período de ambiente enriquecido durante la adolescencia.

Conductualmente observamos una reversión del AE sobre la ingesta de alcohol provocada por el EPC. Este es el principal resultado de la segunda parte de experimentos, ya que revirtiendo la ingesta de alcohol nos permite de aquí en adelante ahondar en la relación estrés-consumo de alcohol.

Algunos estudios indican que el AE podría ejercer un papel protector en la autoadministración de otras sustancias psicoestimulantes como la anfetamina (Bardo y cols., 2001; Green y cols., 2002), aunque este dato tampoco es consistente con el

aumento en el consumo de alcohol y de cocaína observados en otros trabajos (Fernández-Teruel y cols., 2002; Hill y Powell, 1976), o con el aumento del condicionamiento de preferencia de lugar ante la administración de agonistas k opioides (Smith y cols., 2003). En general, los resultados a favor de una autoadministración reducida en los animales en ambientes enriquecidos sólo se obtienen cuando se utilizan dosis bajas de droga.

Las inconsistencias encontradas entre los resultados del presente trabajo y de otros autores que evalúan la autoadministración de cocaína y de anfetamina podrían deberse tanto a diferentes adaptaciones neuronales en respuesta a los diferentes tipos de enriquecimiento y a los mecanismos de acción de las drogas como al modo de administración de la droga, ya que en nuestro trabajo utilizamos animales no bebedores en los que se induce la ingesta a través del estrés.

Cuando estudiamos la respuesta hormonal observamos que el AE produjo un aumento significativo en los niveles basales de corticosterona en el grupo estresado, aunque se aprecia una tendencia a la disminución en el grupo control.

En cuanto a las influencias del AE sobre los niveles basales de las hormonas del eje HPA, los resultados no son consistentes, aunque en general parecen indicar una disminución en la reactividad emocional y una mayor adaptación ante estímulos estresantes (Fox y cols., 2006).

No hay consenso con respecto a los efectos del AE sobre los niveles de corticosterona basal. Existen trabajos en los que no encontraron diferencias en los niveles basales de corticosterona (Pham y cols., 1999; Roy y cols., 2001). Otros reportes sugieren que el AE disminuye la actividad del eje HPA en condiciones basales (Larsson y cols., 2002; Mohammed y cols., 1993) o por exposición a situaciones estresantes (Francis y cols., 2002; Roy y cols., 2001; Welberg y cols., 2006). Incluso algunos describen que los animales enriquecidos presentan mayores niveles basales de corticosterona que los controles (Benaroya-Milshtein y cols., 2004; Moncek y cols., 2004). Como se puede apreciar, los resultados son muy variables y difíciles de interpretar. En nuestra investigación, los grupos que habían experimentado EPC pero que recibieron enriquecimiento mostraron un incremento de corticosterona comparados con los grupos que no fueron enriquecidos. En este caso, el AE contrarrestó los efectos negativos del EPC sobre el eje HPA. En este caso lo importante es la reversión que produce el AE sobre el efecto del EPC, más allá del aumento o la disminución y su posible significado,

para lo cual necesitaríamos completar el estudio con un mayor número de experimentos en este sentido.

Por otro lado, el AE también revirtió los efectos conductuales en las pruebas de conflicto. El tratamiento aumentó el porcentaje de tiempo en los lugares aversivos en el grupo control, lo que interpretamos como un efecto ansiolítico del tratamiento. Estas pruebas son muy utilizadas para evaluar la conducta tipo ansiosa de roedores, de manera que el aumento del tiempo en los lugares aversivos es indicativo de menores niveles de emotividad o ansiedad en el animal (Pellow y File, 1986). El resultado indica una reducción general de la emotividad, este efecto es consistente con otros trabajos (Benaroya-Milshtein y cols., 2004; Fernández-Teruel y cols., 1997; Friske y Gammie, 2005; Schneider y cols., 2006). Se ha sugerido que la disminución en la emotividad que se percibe frecuentemente en los animales enriquecidos en pruebas clásicas de ansiedad podría explicarse en términos de reducción de la fobia a la novedad, y consecuentemente, un aumento en la motivación por explorar los espacios nuevos (Fernandez-Teruel y cols., 1997; Roy y cols., 2001).

Sin embargo, cuando analizamos el efecto del AE sobre la conducta de los animales estresados (grupos E y E+E) vemos que el porcentaje de tiempo en lugares aversivos disminuye significativamente. La interpretación lineal sería un efecto ansiogénico, pero conociendo a estos animales cuyos niveles de impulsividad son muy altos, y que esta conducta influye en el desempeño en pruebas de conflicto y que en los grupos control el AE tiene un efecto ansiolítico, se podría especular que el efecto del AE en estos animales se presenta como una disminución en los niveles de impulsividad.

Los protocolos experimentales del AE varían entre diferentes laboratorios, existe variabilidad en la duración, la edad en la que se aplica, el número de animales por jaula, el tamaño de las jaulas, los objetos utilizados para el tratamiento, los cuales cambian en su composición, forma, tamaño, textura, olor y color. En conjunto, no está bien establecido cuál de los componentes del AE es el causante de los cambios que produce. La complejidad ambiental provee de mayores oportunidades para la estimulación social, somatosensorial y olfativa. Además, la novedad que se consigue cambiando periódicamente los objetos o la posición de estos en el espacio proporciona una estimulación adicional que puede mejorar la formación de mapas cognitivos. Todos estos factores pueden permitir un aumento en la estimulación, en la actividad física, y en las formas de interaccionar con los individuos que forman parte del ambiente. Pero frente a la gran variabilidad metodológica que existe en torno a este tratamiento, los resultados, en

general, apuntan a efectos positivos del AE. En nuestro trabajo de investigación, pudimos comprobar la reversión de algunos de los efectos inducidos por el EPC. El AE revirtió la ingesta de alcohol, el efecto conductual en las pruebas de conflicto y la disminución de los niveles basales de corticosterona.

Estos resultados son sólo el comienzo de un largo estudio, aunque lo fundamental de este tratamiento no farmacológico es su capacidad de reversión y la plasticidad de los animales en los que fue posible volver atrás los efectos a largo plazo inducidos por situaciones estresantes durante la vida temprana. Este tratamiento podría ayudar a profundizar el conocimiento sobre la relación entre el estrés y el consumo de drogas. Es un buen modelo, que complementa al anterior, ya que tenemos un modelo de ingesta voluntaria en el que logramos revertirla. Esto nos permite contar con una herramienta más para introducirnos en las causas de la ingesta de alcohol y los parámetros que vinculan el estrés con el inicio en el consumo.

**Conclusiones**

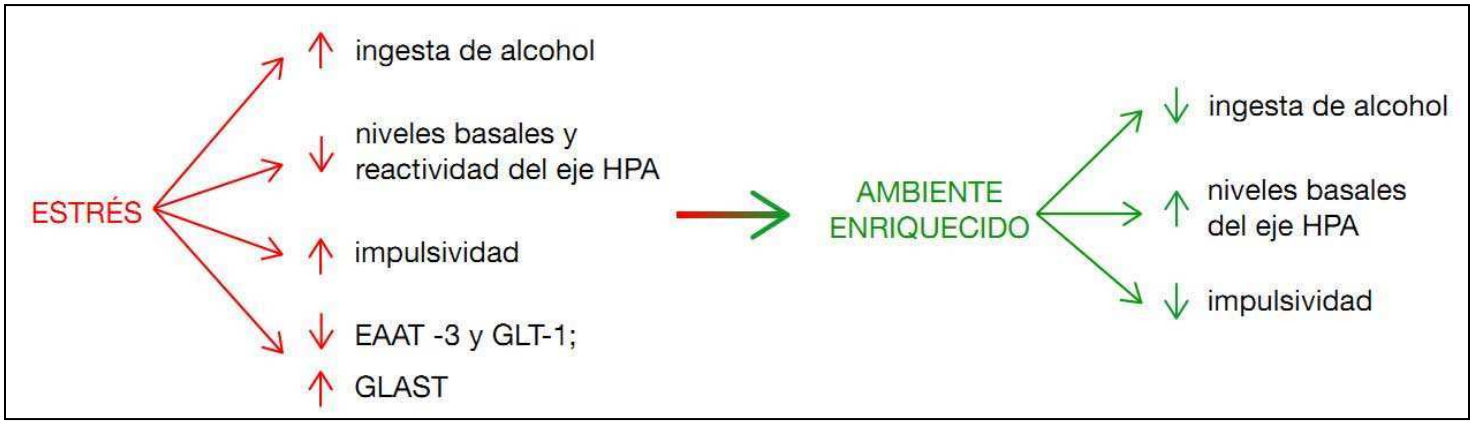



Figura 43: Principales resultados obtenidos.

Los resultados presentados nos permiten destacar la obtención de un modelo de ingesta voluntaria de alcohol, con un control no bebedor. En esta primera caracterización observamos menores niveles basales y menor reactividad del eje HPA; un aumento en los niveles de impulsividad y alteraciones en el transporte de Glu en CF e Hic. Muchos de estos efectos se pudieron revertir con un período de AE durante la adolescencia.

Seguramente todas las variables estén relacionadas entre sí, ya que los GC afectan la fisiología y el funcionamiento de diversas áreas cerebrales. Las concentraciones extracelulares de Glu son de fundamental importancia ya que su variación puede generar efectos deletéreos que afecten a la conducta o al mismo eje HPA, ya que en el Hic, por ejemplo, se encuentran localizados los receptores encargados de la retroalimentación negativa de dicho eje. A su vez la conducta expresada por el animal, la ingesta de alcohol y los niveles de impulsividad, están influenciadas por estas dos áreas cerebrales y por los parámetros estudiados. Hasta aquí estos primeros cambios encontrados, para, en el futuro, ahondar en las interrelaciones y comenzar la búsqueda de vínculos más precisos entre ellas.

El principal producto de este trabajo de tesis es la obtención del modelo. Hemos realizado una primera caracterización que nos permite plantear numerosos interrogantes que este modelo podría contestar. ¿Hay relación directa entre los niveles de GC y el consumo de alcohol? ¿Lleva la disminución en los niveles de corticosterona a un aumento

en la impulsividad? ¿Será posible revertir esta conducta de ingesta voluntaria interviniendo el eje HPA? ¿Podrían estar involucrados cambios epigenéticos en los efectos a largo plazo? ¿Cuál es el efecto del AE que lleva a revertir la conducta de ingesta? Disponemos ahora de 8 grupos experimentales que nos permitirán seguir profundizando el conocimiento acerca de este vínculo entre la adversidad en la vida temprana, el consumo de alcohol y su posible reversión.

Una vez más se ha demostrado la susceptibilidad y la vulnerabilidad que presenta la vida temprana de un individuo, la capacidad de adaptación a la adversidad y la gran plasticidad del SNC. Comprobamos que si bien las experiencias negativas durante la infancia podrían inducir al consumo de drogas y a desórdenes neuroquímicos y conductuales a largo plazo, las experiencias positivas, como crecer en un ambiente enriquecido, pueden revertir estos efectos.

# Bibliografía

**BIBLIOGRAFÍA**

Acosta, G. B., & Rubio, M. C. (1994). GABAA receptors mediate the changes produced by stress on GABA function and locomotor activity. *Neuroscience Letters*, *176*(1), 29–31.

Almeida, O. F., Condé, G. L., Crochemore, C., Demeneix, B. A., Fischer, D., Hassan, A. H., … Michaelidis, T. M. (2000). Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *14*(5), 779–90.

Anacker, A. M. J., & Ryabinin, A. E. (2010). Biological contribution to social influences on alcohol drinking: evidence from animal models. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *7*(2), 473–493.

Anisman, H., & Matheson, K. (2005). Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*(4-5), 525–546.

Anisman, H., Zaharia, M. D., Meaney, M. J., & Merali, Z. (1998). Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, *16*(3-4), 149–164.

Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P., & Amara, S. G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(8), 4155–4160.

Balcar, V. J. (2002). Molecular pharmacology of the Na+-dependent transport of acidic amino acids in the mammalian central nervous system. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *25*(3), 291–301.

Bao, X., Hui, D., Näassila, M., & Michaelis, E. K. (2001). Chronic ethanol exposure increases gene transcription of subunits of an N-methyl-D-aspartate receptor-like complex in cortical neurons in culture. *Neuroscience Letters*, *315*(1-2), 5–8.

Baracho, N. C. do V., Vicente, B. B. V., Arruda, G. D. S., Sanches, B. C. F., & Brito, J. de. (2009). Study of acute hepatotoxicity of Equisetum arvense L. in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira / Sociedade Brasileira Para Desenvolvimento Pesquisa Em Cirurgia*, *24*(6), 449–453.

Bardo, M. T., Bowling, S. L., Rowlett, J. K., Manderscheid, P., Buxton, S. T., & Dwoskin, L. P. (1994). Environmental enrichment attenuates locomotor sensitization, but not in vitro dopamine release, induced by amphetamine. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *51*(2-3), 397–405.

Bardo, M. T., Klebaur, J. E., Valone, J. M., & Deaton, C. (2001). Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology*, *155*(3), 278–284.

Belin, D., Mar, A. C., Dalley, J. W., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2008). High impulsivity predicts the switch to compulsive cocaine-taking. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5881), 1352–1355.

Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., … Pick, C. G. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *The European Journal of Neuroscience*, *20*(5), 1341–1357.

Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, *463*(1-3), 55–65.

Bowen, M. T., Carson, D. S., Spiro, A., Arnold, J. C., & McGregor, I. S. (2011). Adolescent oxytocin exposure causes persistent reductions in anxiety and alcohol consumption and enhances sociability in rats. *PloS One*, *6*(11) :e27237.

Briand, L. A., & Blendy, J. A. (2010). Molecular and genetic substrates linking stress and addiction. *Brain Research*, *1314*, 219–234.

Brunton, L., Chabner, B., & Bjorn, K. (2010). Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica - 11° Edición - Español. *Mc Graw-Hill*.

Cannon, W. (1935). Stresses and strains of homeostasis. The American Journal of the Medical Sciences. 189: 13-14.

Caudle, W. M., & Zhang, J. (2009). Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. *Experimental Neurology*, *220*(2), 230–3.

Costall, B., Kelly, M. E., Naylor, R. J., & Onaivi, E. S. (1989). The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *33*(1), 197–203.

Crabbe, J. C., Harris, R. A., & Koob, G. F. (2011). Preclinical studies of alcohol binge drinking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1216*, 24–40.

Crawley, J. (2007). *What's Wrong with My Mouse Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice* (Second Edition). WILEY-INTERSCIENCE.

Crofton, E. J., Zhang, Y., & Green, T. A. (2014). Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 49C:19-31.

Dahchour, A., & De Witte, P. (2003). Excitatory and inhibitory amino acid changes during repeated episodes of ethanol withdrawal: an in vivo microdialysis study. *European Journal of Pharmacology*, *459*(2-3), 171–178.

Dallman, M., Bhatnagar, S., & Viau, V. (2006). Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. Encyclopedia of stress 2º Edición. *Elsevier Inc- Ed. Fink, G.*, *2*, 468–476.

Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, *65*(1), 1–105.

De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, *6*(6), 463–75.

Deppermann, S., Storchak, H., Fallgatter, A. J., & Ehlis, A.-C. (2014). Stress-induced neuroplasticity: (Mal)adaptation to adverse life events in patients with PTSD - A critical overview. *Neuroscience*. 283:166-77

Dobbing, J., & Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*, *3*(1), 79–83.

Ellenbroek, B. A., & Cools, A. R. (2000). The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *23*(1), 99–106.

Erecinska, M., Cherian, S., & Silver, I. A. (2004). Energy metabolism in mammalian brain during development. *Progress in Neurobiology*, *73*(6), 397–445.

Fairman, W. A., Vandenberg, R. J., Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., & Amara, S. G. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*, *375*(6532), 599–603.

Farrell, W. J., & Alberts, J. R. (2007). Rat behavioral thermoregulation integrates with nonshivering thermogenesis during postnatal development. *Behavioral Neuroscience*, *121*(6), 1333–1341.

Fenoglio, K. A., Brunson, K. L., & Baram, T. Z. (2006). Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *27*(2), 180–192.

Fernández-Teruel, A., Driscoll, P., Gil, L., Aguilar, R., Tobeña, A., & Escorihuela, R. M. (2002). Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *73*(1), 225–231.

Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Castellano, B., González, B., & Tobeña, A. (1997). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behavior Genetics*, *27*(6), 513–526.

Figiel, M., & Engele, J. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(10), 3596–3605.

Finsterwald, C., & Alberini, C. M. (2014). Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiology of Learning and Memory*, *112*, 17–29.

Ford, J. D., Gelernter, J., DeVoe, J. S., Zhang, W., Weiss, R. D., Brady, K., Kranzler, H. R. (2009). Association of psychiatric and substance use disorder comorbidity with cocaine dependence severity and treatment utilization in cocaine-dependent individuals. *Drug and Alcohol Dependence*, *99*(1-3), 193–203.

Foster, A. C., Gill, R., Kemp, J. A., & Woodruff, G. N. (1987). Systemic administration of MK-801 prevents N-methyl-D-aspartate-induced neuronal degeneration in rat brain. *Neuroscience Letters*, *76*(3), 307–311.

Fox, C., Merali, Z., & Harrison, C. (2006). Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behavioural Brain Research*, *175*(1), 1–8.

Francis, D. D., Diorio, J., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (2002). Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(18), 7840–7843.

Friske, J. E., & Gammie, S. C. (2005). Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. *Physiology & Behavior*, *85*(2), 187–194.

Fumagalli, F., Molteni, R., Racagni, G., & Riva, M. A. (2007). Stress during development: Impact on neuroplasticity and relevance to psychopathology. *Progress in Neurobiology*, *81*(4), 197–217.

Gegelashvili, G., Dehnes, Y., Danbolt, N. C., & Schousboe, A. (2000). The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochemistry International*, *37*(2-3), 163–170.

Glowinski, J., & Iversen, L. L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *Journal of Neurochemistry*, *13*(8), 655–669.

Gonzales, R. A., & Hoffman, P. L. (1991). Receptor-gated ion channels may be selective CNS targets for ethanol. *Trends in Pharmacological Sciences*, *12*(1), 1–3.

Gray, J. D., Milner, T. A., & McEwen, B. S. (2013). Dynamic plasticity: the role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors. *Neuroscience*, *239*, 214–227.

Green, T. A., Gehrke, B. J., & Bardo, M. T. (2002). Environmental enrichment decreases intravenous amphetamine self-administration in rats: dose-response functions for fixed- and progressive-ratio schedules. *Psychopharmacology*, *162*(4), 373–378.

Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R., & Joëls, M. (2011). Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *The Journal of Endocrinology*, *209*(2), 153–167.

Guillet, B., Lortet, S., Masmejean, F., Samuel, D., Nieoullon, A., & Pisano, P. (2002). Developmental expression and activity of high affinity glutamate transporters in rat cortical primary cultures. *Neurochemistry International*, *40*(7), 661–671.

Heim, C., Plotsky, P. M., & Nemeroff, C. B. (2004). Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *29*(4), 641–648.

Herlenius, E., & Lagercrantz, H. (2004). Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology*, *190 Suppl* , S8–21.

Herrero, M. J., Domingo-Salvany, A., Torrens, M., & Brugal, M. T. (2008). Psychiatric comorbidity in young cocaine users: induced versus independent disorders. *Addiction (Abingdon, England)*, *103*(2), 284–293.

Hill, S. Y., & Powell, B. J. (1976). Cocaine and morphine self-administration: effects of differential rearing. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *5*(6), 701–704.

Irimia, C., Wiskerke, J., Natividad, L. A., Polis, I. Y., de Vries, T. J., Pattij, T., & Parsons, L. H. (2013). Increased impulsivity in rats as a result of repeated cycles of alcohol intoxication and abstinence. *Addiction Biology*. PMID:24341858

Jahng, J. W. (2011). An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. *Hormones and Behavior*, *59*(2), 213–220.

Kanai, Y., & Hediger, M. A. (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*, *360*(6403), 467–471.

Kanai, Y., & Hediger, M. A. (2003). The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *European Journal of Pharmacology*, *479*(1-3), 237–247.

Kays, J. L., Hurley, R. A., & Taber, K. H. (2014). The Dynamic Brain: Neuroplasticity and Mental Health. 24(2):118-24

Kehoe, P., Clash, K., Skipsey, K., & Shoemaker, W. J. (1996). Brain dopamine response in isolated 10-day-old rats: assessment using D2 binding and dopamine turnover. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *53*(1), 41–49.

Kim, J. J., & Diamond, D. M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews. Neuroscience*, *3*(6), 453–462.

Komáreková, I., & Janík, M. (2012). Effects of alcohol on the brain biomembranes: a review. *Soudní Lékarství / Casopis Sekce Soudního Lékarstvi Cs. Lékarské Spolecnosti J. Ev. Purkyne*, *57*(4), 75–77.

Koob, G. F. (2000). Neurobiology of addiction. Toward the development of new therapies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *909*, 170–185.

Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 217–238.

Ladd, C. O., Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (1996). Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. *Endocrinology*, *137*(4), 1212–1218.

Larsson, F., Winblad, B., & Mohammed, A. H. (2002). Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *73*(1), 193–207.

Lehmann, J., Stöhr, T., & Feldon, J. (2000). Long-term effects of prenatal stress experiences and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes. *Behavioural Brain Research*, *107*(1-2), 133–44.

Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior*, *73*(3), 255–260.

Lightman, S. L. (2008). The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *Journal of Neuroendocrinology*, *20*(6), 880–884.

Liu, X., & Weiss, F. (2002). Additive effect of stress and drug cues on reinstatement of ethanol seeking: exacerbation by history of dependence and role of concurrent activation of corticotropin-releasing factor and opioid mechanisms. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(18), 7856–7861.

Lodge, D ., & Lawrence, A. . (2003). The CRF1 receptor antagonist antalarmin reduces volitional ethanol consumption in isolation-reared fawn-hooded rats. *Neuroscience*, *117*(2), 243–247.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275.

Lu, B. S., & Zee, P. C. (2006). Circadian rhythm sleep disorders. *Chest*, *130*(6), 1915–1923.

Madrigal, J. L., Olivenza, R., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Rodrigo, J., & Leza, J. C. (2001). Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *24*(4), 420–9.

Martin, S., Henley, J. M., Holman, D., Zhou, M., Wiegert, O., van Spronsen, M., … Krugers, H. J. (2009). Corticosterone alters AMPAR mobility and facilitates bidirectional synaptic plasticity. *PloS One*, *4*(3), e4714.

Masini, C. V, Day, H. E. W., Gray, T., Crema, L. M., Nyhuis, T. J., Babb, J. A., & Campeau, S. (2012). Evidence for a lack of phasic inhibitory properties of habituated stressors on HPA axis responses in rats. *Physiology & Behavior*, *105*(2), 568–575.

Masson, J., Sagné, C., Hamon, M., & El Mestikawy, S. (1999). Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacological Reviews*, *51*(3), 439–464.

McEwen, B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *840*, 33–44.

McEwen, B. S. (2002). Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiology of Aging*, *23*(5), 921–939.

McEwen, B. S. (2005). Stressed or stressed out: what is the difference? *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, *30*(5), 315–318.

McEwen, B. S. (2006). Definitions and Concepts of Stress. Encyclopedia of stress 2º Edición. *Elsevier Inc- Ed. Fink*, *3*, 508–509.

McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological Reviews*, *87*(3), 873–904.

McGeer, E., Onley, J., & McGeer, P. (1978). Kainic acid as a tool in neurobiology. *Raven Press*, 95–121.

Meldrum, B., & Garthwaite, J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, *11*(9), 379–387.

Melendez, R. I., Hicks, M. P., Cagle, S. S., & Kalivas, P. W. (2005). Ethanol exposure decreases glutamate uptake in the nucleus accumbens. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *29*(3), 326–33.

Miczek, K. A., Yap, J. J., & Covington, H. E. (2008). Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacology & Therapeutics*, *120*(2), 102–28.

Moeller, F. G., Barratt, E. S., Dougherty, D. M., Schmitz, J. M., & Swann, A. C. (2001). Psychiatric Aspects of Impulsivity. *American Journal of Psychiatry*, *158*(11), 1783–1793.

Mohammed, A. H., Henriksson, B. G., Söderström, S., Ebendal, T., Olsson, T., & Seckl, J. R. (1993). Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behavioural Brain Research*, *57*(2), 183–191.

Moncek, F., Duncko, R., Johansson, B. B., & Jezova, D. (2004). Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *16*(5), 423–431.

Mora, F., Segovia, G., & del Arco, A. (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Research Reviews*, *55*(1), 78–88.

Möykkynen, T., & Korpi, E. R. (2012). Acute effects of ethanol on glutamate receptors. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *111*(1), 4–13.

Nasrallah, N. A., Yang, T. W. H., & Bernstein, I. L. (2009). Long-term risk preference and suboptimal decision making following adolescent alcohol use. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(41), 17600–17604.

Odeon, M. M., Salatino, A. E., Rodriguez, C. B., Scolari, M. J., & Acosta, G. B. (2010). The response to postnatal stress: Amino acids transporters and pkc activity. *Neurochemical Research*, *35*(7), 967–975.

Odeon, M.M., Salatino, A.E., & Acosta, G.B. (2013). Consequences of Postnatal Stress: Maternal Separation in Rats Induces Long-Lasting Changes on Glutamate Transporters. *Clinical & Experimental Pharmacology*, *3-121*.

Ogawa, T., Mikuni, M., Kuroda, Y., Muneoka, K., Mori, K. J., & Takahashi, K. (1994). Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *49*(4), 961–967.

Okłota, M., Niemcunowicz-Janica, A., Załuski, J., & Ptaszyńska-Sarosiek, I. (2009). [Contribution of ethanol in apoptosis induction]. *Archiwum Medycyny Sądowej I Kryminologii*, *59*(3), 238–242.

Olivenza, R., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernández, A. P., Rodrigo, J., … Leza, J. C. (2000). Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *Journal of Neurochemistry*, *74*(2), 785–791.

Ottenweller, J. E., Servatius, R. J., Tapp, W. N., Drastal, S. D., Bergen, M. T., & Natelson, B. H. (1992). A chronic stress state in rats: effects of repeated stress on basal corticosterone and behavior. *Physiology & Behavior*, *51*(4), 689–698.

Pacak, K. (2006). Acute Stress Response: Experimental. Encyclopedia of stress 2º Edición. *Elsevier Inc- Ed. Fink*, *1*, 8–16.

Paré, W. P., Tejani-Butt, S., & Kluczynski, J. (2001). The emergence test: effects of psychotropic drugs on neophobic disposition in Wistar Kyoto (WKY) and Sprague Dawley rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *25*(8), 1615–1628.

Pascual-Leone, A., Amedi, A., Fregni, F., & Merabet, L. B. (2005). The plastic human brain cortex. *Annual Review of Neuroscience*, *28*, 377–401.

Pautassi, R. M., Camarini, R., Quadros, I. M., Miczek, K. A., & Israel, Y. (2010). Genetic and environmental influences on ethanol consumption: perspectives from preclinical research. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *34*(6), 976–987.

Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *24*(3), 525–529.

Pham, T. M., Ickes, B., Albeck, D., Söderström, S., Granholm, A. C., & Mohammed, A. H. (1999). Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience*, *94*(1), 279–286.

Piepponen, T. P., Kiianmaa, K., & Ahtee, L. (2002). Effects of ethanol on the accumbal output of dopamine, GABA and glutamate in alcohol-tolerant and alcohol-nontolerant rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *74*(1), 21–30.

Pines, G., Danbolt, N. C., Bjørås, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Kanner, B. I. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, *360*(6403), 464–7.

Pryce, C. R., Rüedi-Bettschen, D., Dettling, A. C., Weston, A., Russig, H., Ferger, B., & Feldon, J. (2005). Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*(4-5), 649–674.

Purves, D. (2004). Neuroscience (Cap. 6 : Neurotransmitters, Cap. 7: Neurotransmitter Receptors and Their Effects) (3° edition.). Sinauer Associates.

Reagan, L. P., Rosell, D. R., Wood, G. E., Spedding, M., Muñoz, C., Rothstein, J., & McEwen, B. S. (2004). Chronic restraint stress up-regulates GLT-1 mRNA and protein expression in the rat hippocampus: reversal by tianeptine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(7), 2179–2184.

Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Domínguez-Salazar, E., Martínez-García, R., & Velázquez-Moctezuma, J. (2003). Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, *28*(2), 207–227.

Retana-Márquez, S., Vigueras-Villaseñor, R. M., Juárez Rojas, L., Aragón Martínez, A., & Reyes Torres, G. (2014). Sexual behavior attenuates the effects of chronic stress in body weight, testes, sexual accesory glands, and plasma testosterone in male rats. *Hormones and Behavior*, *66*(5), 766–778.

Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, B. A., & Riva, M. A. (2002). Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Molecular Psychiatry*, *7*(6), 609–16.

Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *21*(6), 801–810.

Roman, E., Gustafsson, L., Berg, M., & Nylander, I. (2006). Behavioral profiles and stress-induced corticosteroid secretion in male Wistar rats subjected to short and prolonged periods of maternal separation. *Hormones and Behavior*, *50*(5), 736–747.

Rosenzweig, M., Krech, D., Bennett, E., Diamond, M. (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *55*, 429–437.

Roy, V., Belzung, C., Delarue, C., & Chapillon, P. (2001). Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiology & Behavior*, *74*(3), 313–320.

Schneider, T., Turczak, J., & Przewłocki, R. (2006). Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *31*(1), 36–46.

Selye, H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol Metab*, *6*, 117–230.

Sheldon, A. L., & Robinson, M. B. (2007). The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochemistry International*, *51*(6-7), 333–355.

Siegel, G. J., Albers, R. W., Brady, S. T., & Price, D. L. (2006). Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects. 7th ed. (with CD-ROM). *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, *27*(2), 465–466.

Sifonios, L., Trinchero, M., Cereseto, M., Ferrero, A., Cladouchos, M. L., Macedo, G. F., … Wikinski, S. (2009). An enriched environment restores normal behavior while providing cytoskeletal restoration and synaptic changes in the hippocampus of rats exposed to an experimental model of depression. *Neuroscience*, *164*(3), 929–940.

Simpson, J., & Kelly, J. P. (2011). The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Research*, *222*(1), 246–264.

Slotboom, D. J., Konings, W. N., & Lolkema, J. S. (2001). Glutamate transporters combine transporter- and channel-like features. *Trends in Biochemical Sciences*, *26*(9), 534–539.

Smith, M. A., Bryant, P. A., & McClean, J. M. (2003). Social and environmental enrichment enhances sensitivity to the effects of kappa opioids: studies on antinociception, diuresis and conditioned place preference. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *76*(1), 93–101.

Smolen, T. N., & Smolen, A. (1989). Blood and brain ethanol concentrations during absorption and distribution in long-sleep and short-sleep mice. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *6*(1), 33–38.

Sommer, W. H., & Saavedra, J. M. (2008). Targeting brain angiotensin and corticotrophin-releasing hormone systems interaction for the treatment of mood and alcohol use disorders. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *86*(6), 723–728.

Spencer, S. J., Emmerzaal, T. L., Kozicz, T., & Andrews, Z. B. (2014). Ghrelin's Role in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Stress Response; Implications for Mood Disorders. *Biological Psychiatry*. PMID:25534754

Squire, L. (2008). *Fundamental neuroscience, (Cap. 7: Neurotransmitters; Cap. 9: Neurotransmitter receptors; Cap. 21: Early experience and critical periods)*. Elsevier Academic Press.

Sterling, P., & Eyer, J. (1988). Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. *Handbook of Life Stress, Cognition and Health.*, *John Wiley*, 629–649.

Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., & Stoffel, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(22), 10955–10959.

Tabassum, H., & Frey, J. U. (2013). The effect of acute swim stress and training in the water maze on hippocampal synaptic activity as well as plasticity in the dentate gyrus of freely moving rats: revisiting swim-induced LTP reinforcement. *Hippocampus*, *23*(12), 1291–1298.

Takarada, T., Balcar, V. J., Baba, K., Takamoto, A., Acosta, G. B., Takano, K., & Yoneda, Y. (2003). Uptake of [3H]L-serine in rat brain synaptosomal fractions. *Brain Research*, *983*(1-2), 36–47.

Trotti, D., Nussberger, S., Volterra, A., & Hediger, M. A. (1997). Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human neuronal glutamate transporter EAAC1. *The European Journal of Neuroscience*, *9*(10), 2207–2212.

Vatassery, G. T., Lai, J. C., Smith, W. E., & Quach, H. T. (1998). Aging is associated with a decrease in synaptosomal glutamate uptake and an increase in the susceptibility of synaptosomal vitamin E to oxidative stress. *Neurochemical Research*, *23*(2), 121–125.

Venero, C., & Borrell, J. (1999). Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *The European Journal of Neuroscience*, *11*(7), 2465–2473.

Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A., & Spanagel, R. (2008). Neuropharmacology of alcohol addiction. *British Journal of Pharmacology*, *154*(2), 299–315.

Volkow, N. D., & Li, T.-K. (2004). Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nature Reviews. Neuroscience*, *5*(12), 963–970.

Weiss, M. J., & Wagner, S. H. (1998). What explains the negative consequences of adverse childhood experiences on adult health? Insights from cognitive and neuroscience research. *American Journal of Preventive Medicine*, *14*(4), 356–360.

Welberg, L., Thrivikraman, K. V, & Plotsky, P. M. (2006). Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, *31*(5), 553–564.

Willey, A. R., Anderson, R. I., Morales, M., Ramirez, R. L., & Spear, L. P. (2012). Effects of ethanol administration on corticosterone levels in adolescent and adult rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *46*(1), 29–36.

Woolley, C. S., Gould, E., Sakai, R. R., Spencer, R. L., & McEwen, B. S. (1991). Effects of aldosterone or RU28362 treatment on adrenalectomy-induced cell death in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Research*, *554*(1-2), 312–315.

Wossink, J., Karst, H., Mayboroda, O., & Joëls, M. (2001). Morphological and functional properties of rat dentate granule cells after adrenalectomy. *Neuroscience*, *108*(2), 263–272.

Ye, Z.-C., & Sontheimer, H. (2002). Modulation of glial glutamate transport through cell interactions with the extracellular matrix. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, *20*(3-5), 209–217.

Zelenaia, O., Schlag, B. D., Gochenauer, G. E., Ganel, R., Song, W., Beesley, J. S., Robinson, M. B. (2000). Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. *Molecular Pharmacology*, *57*(4), 667–678.

Zhang, L. I., & Poo, M. M. (2001). Electrical activity and development of neural circuits. *Nature Neuroscience*, *4 Suppl*, 1207–1214.

Zschocke, J., Bayatti, N., Clement, A. M., Witan, H., Figiel, M., Engele, J., & Behl, C. (2005). Differential promotion of glutamate transporter expression and function by glucocorticoids in astrocytes from various brain regions. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(41), 34924–34932.

Zuo, G. C., Yang, J. Y., Hao, Y., Dong, Y. X., & Wu, C. F. (2007). Ethanol and acetaldehyde induce similar changes in extracellular levels of glutamate, taurine and GABA in rat anterior cingulate cortex. *Toxicology Letters*, *169*(3), 253–258.