

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Tesina de Grado para optar por el título de Biólogo

**EFFECTOS DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL
GESTACIONAL SOBRE PARÁMETROS
NEUROFISIOLÓGICOS Y CONDUCTUALES EN CRÍAS
ADOLESCENTES DE RATA**

Tesista: Baretta Franco David

Firma:

Directora: Rivarola María Angélica

Firma:

Co-director: Mir Franco Rafael

Firma:

2023

Tesina de Grado para optar por el título de Biólogo

**EFFECTOS DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL GESTACIONAL SOBRE
PARÁMETROS NEUROFISIOLÓGICOS Y CONDUCTUALES EN CRÍAS
ADOLESCENTES DE RATA**

Alumno: Baretta Franco David

Directora: Rivarola María Angélica

Co-director: Mir Franco Rafael

Tribunal Examinador

- Nombre y Apellido: Firma:
- Nombre y Apellido: Firma:
- Nombre y Apellido: Firma:
- Calificación:
- Fecha:

Agradecimientos

Quisiera agradecer y dedicar este trabajo a toda la gente que confió en mí y con quienes transité esta hermosa experiencia de 7 años y largos.

A la cátedra de Fisiología Animal, un hermoso grupo de personas apasionadas por su trabajo con quienes compartí el día a día. Desde ayudantes hasta profesores, siempre tuvieron buena onda y predisposición para ayudar a quien lo necesitase. Quisiera dar las gracias especialmente a mis directores, Angélica y Franco, quienes me dieron la oportunidad de realizar este estudio, me guiaron y ayudaron en todo momento.

Al tribunal evaluador, por tomarse el trabajo de sugerir y corregir este trabajo. Sus aportes sirvieron para mejorar esta investigación y lograr los mejores resultados posibles.

Al Consejo Interuniversitario de Córdoba (CIN) por otorgarme una beca de Estímulo a las vocaciones científicas, la cual colaboró en el desarrollo de este trabajo y su presentación en la Reunión Anual XXIV de la Sociedad Argentina de Biología.

A todos mis amigos, con quienes pasamos momentos hermosos e inolvidables durante tantos años estudiando, colaborando y festejando.

Finalmente, a los más importantes: mi familia, quienes más confiaron e hicieron todo lo posible para que pudiese realizar esta hermosa carrera. A pesar de la distancia, siempre estuvieron pendientes y ayudaron en todo lo posible. Mamá, papá, siempre voy a agradecerles por esta oportunidad. Espero poder corresponder a todo su esfuerzo durante tantos años a través de mis logros, tanto actuales como futuros.

A todos ustedes, muchas gracias.

Índice

Resumen.....	5
Palabras clave	6
Abstract.....	6
Keywords	7
Introducción.....	7
1. Trastornos por estrés: Una problemática actual.....	7
2. Comportamientos: ¿Cuáles son y cómo se pueden medir?.....	8
2.1 Ansiedad, interacciones sociales y exploración.	8
2.2 Pruebas para evaluar el comportamiento	9
3. Áreas cerebrales involucradas con el comportamiento	10
4. Adolescencia: Un período de cambios, plasticidad y sensibilidad.	11
5. Diferencias entre sexos.....	12
6. Plasticidad cerebral	14
6.1 Plasticidad durante la juventud	14
6.2 Estímulos ambientales y la plasticidad cerebral	15
7. Enriquecimiento Ambiental.....	17
7.1 Enriquecimiento Ambiental Gestacional: ¿Posible terapia?	19
Hipótesis	20
Objetivos	20
Materiales y métodos	20
1. Animales	21
2. Tratamientos	21
2.1 Enriquecimiento ambiental gestacional	21
2.2 Protocolo de estrés postnatal	22
2.2.1 Separación materna	22
2.2.2 Presencia de macho intruso	22
3. Pruebas conductuales	23
3.1 Elevated Plus Maze (EPM)	24
3.2 Open Field (OF)	24
3.3 Social Preference Test (SPT)	24
4. Sacrificio	25

5. Protocolo de inmunohistoquímica	26
6. Análisis estadístico	27
Resultados	28
1. Elevated Plus Maze	28
2. Open Field	31
3. Social Preference Test	36
4. Inmunohistoquímica	39
Discusión	42
1. Dimorfismo sexual en distintos comportamientos	42
2. Efecto de los tratamientos estresores	44
3. Efecto del enriquecimiento ambiental gestacional	45
4. Interacciones entre variables	46
5. Actividad de la amígdala a partir de la expresión de Fos-B	48
Conclusiones	50
Referencias bibliográficas	50

Resumen

Los trastornos de ansiedad son enfermedades muy presentes a nivel mundial. La exposición a estrés crónico durante la vida temprana, aumenta las probabilidades de padecer alguna de estas patologías. Una potencial terapia es el enriquecimiento ambiental (AE), el cual se ha visto que promueve la neurogénesis, la arborización dendrítica y la síntesis de neurotrofinas en distintas áreas cerebrales. También presenta efectos ansiolíticos, proexploratorios y prosociales en los roedores. En este trabajo se evaluó si el AE gestacional mitiga los efectos del estrés crónico durante la vida temprana, tanto a nivel comportamental como en la actividad basal de distintas áreas cerebrales implicadas en la modulación de la conducta emocional y social. Para ello se sometió a madres gestantes al AE o ambiente estándar durante la gestación. En los días postnatales (DPN) 1 a 21 se aplicó uno de los siguientes protocolos de estrés: separación materna o presencia de macho intruso y finalmente se evaluó la conducta ansiosa, exploratoria y social mediante distintos tests en DPN 42-44. También se analizó la actividad nerviosa basal mediante

inmunohistoquímica de la proteína Fos-B. Nuestros resultados indicaron que el AE gestacional tiene efectos ansiolíticos y proexploratorios, aunque no influyó en la sociabilidad de los roedores. Además se observó un dimorfismo sexual, siendo las hembras quienes presentaron menos conductas similares a ansiedad y más exploración. Los tratamientos estresores tuvieron efectos ansiolíticos y proexploratorios, existiendo una relación entre el AE y el estrés por separación materna. A nivel neuronal, resultados preliminares no muestran diferencias entre los distintos tratamientos.

Palabras clave

Enriquecimiento ambiental gestacional, estrés postnatal, diferencias sexuales, ansiedad, conducta social, Fos-B

Abstract

Anxiety disorders are very common illnesses worldwide. Early life stress exposure, increases the probability of suffering mental pathologies. A potential therapy is the environmental enrichment (EE), which has been shown to promote neurogenesis, dendritic arborization and neurotrophin synthesis in different brain areas. It also exhibits anxiolytic, pro-exploratory and pro-social effects on rodent behaviors. We evaluated whether gestational EE mitigates the effects of chronic stress during early life, both at the behavior and the neural basal activity of different brain areas involved in the modulation of emotional and social behavior. For this purpose, pregnant mothers were subjected to EE or standard environment during gestation. On postnatal days (PND) 1 to 21, a stress protocol was applied (maternal separation or presence of an intruder male) and finally, anxiety-like, exploratory and pro-social behavior was evaluated by different tests on PND 42-44. On the other hand, basal activity was analyzed by immunohistochemistry of Fos-B protein. Our results indicated that gestational EE has anxiolytic and pro-exploratory effects, although it did not influence the sociability of the rodents. Sexual dimorphism was observed, with females showing less anxiety-like behaviors and more exploration. The stressor treatments had anxiolytic and pro-exploratory effects, with a statistical interaction between EE and

maternal separation, contrary to current evidence. At neural level, preliminary results show no differences between treatments.

Keywords

Gestational environmental enrichment, postnatal stress, sexual dimorphism, anxiety, social behavior, Fos-B.

Introducción

1. Trastornos por estrés: Una problemática actual.

La Organización Mundial de la Salud informó que en 2019, 301 millones de personas presentaron algún trastorno de ansiedad, entre los que se encuentran 58 millones de niños y adolescentes. Dentro de estas patologías podemos mencionar el trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de pánico, trastorno de ansiedad social, trastorno por separación, entre otros (Organización Mundial de la Salud, s.f.).

Se ha demostrado que una exposición crónica al estrés durante la vida temprana (desde la gestación hasta la adolescencia) puede dejar secuelas neurológicas que aumentan la probabilidad de sufrir trastornos de ansiedad, además de retraso madurativo y déficit intelectual, entre otros efectos (Jurueña et al., 2020). Esto es posible a partir de una interacción compleja entre estresores ambientales y cambios epigenéticos, que derivan en alteraciones tanto en la estructura como el funcionamiento del cerebro. Es importante destacar que estos efectos pueden perdurar a lo largo de la vida, incluso hasta la vejez (Jurueña et al., 2020; Mir & Rivarola, 2022).

Cabe resaltar que esta susceptibilidad no es igual entre hombres y mujeres. Estudios indican que las mujeres tienen hasta el doble de probabilidades de sufrir estos tipos de enfermedades (Altemus et al., 2014). Estas diferencias pueden estar arraigadas al dimorfismo sexual presente en el cerebro de la mayoría de los mamíferos (Mir & Rivarola, 2022).

Es a partir de esta problemática que se planteó este trabajo, con el fin de investigar los posibles efectos benéficos de un protocolo experimental como el AE gestacional para mitigar los efectos del estrés temprano sobre distintos comportamientos de los animales como son las respuestas ansiosas, las interacciones sociales y la actividad exploratoria, teniendo en cuenta su dimorfismo sexual.

2. Comportamientos: ¿Cuáles son y cómo se pueden medir?

2.1 Ansiedad, interacciones sociales y exploración.

Una gran variedad de comportamientos se ven modificados a largo plazo debido a la exposición crónica al estrés. Entre ellos se destacan las conductas similares a la ansiedad, la actividad exploratoria y las interacciones sociales.

Los comportamientos similares a ansiedad en animales de laboratorio (que incluyen el escape, hipoactividad, congelamiento o freezing y defecaciones) son respuestas corporales innatas ejecutadas debido a estímulos impredecibles y potencialmente perjudiciales para el individuo, pudiendo ser desde objetos inertes hasta ambientes novedosos (Lezak et al., 2017).

Por otro lado, explorar abarca un conjunto de conductas realizadas por los animales para obtener información del medio que los rodea y los recursos del mismo (Thompson et al., 2018). En roedores, comportamientos exploratorios incluyen la locomoción de un lugar a otro, respuestas de orientación hacia estímulos ambientales y alzamientos sobre sus patas traseras o apoyados contra alguna superficie (rearing) (Hok et al., 2016; Thompson et al., 2018; Harro, 2018). Estos comportamientos son exhibidos en respuesta a estímulos novedosos (objetos, individuos conespecíficos o ambientes).

Finalmente, existe un amplio abanico de interacciones sociales. Por su finalidad, podemos clasificarlas como interacciones antagónicas, reproductivas, lúdicas y/o exploratorias, entre otras. La exploración social es muy recurrente por parte de los roedores en presencia de un conespecífico desconocido, ya que la información obtenida sobre este estímulo novedoso es necesaria para futuras interacciones (Scholl et al., 2019; Sterley & Bains, 2021).

2.2 Pruebas para evaluar el comportamiento

Los laberintos conductuales en condiciones de laboratorio desempeñan un papel fundamental para evaluar conductas similares a ansiedad, preferencia social y conducta exploratoria en roedores. Entre ellas, el Elevated Plus Maze, Open Field y Social Preference Test (EPM, OF y SPT por sus siglas en inglés, respectivamente) son algunas de las principales pruebas experimentales utilizadas en la investigación científica para comprender mejor las causas de trastornos psiquiátricos y neurológicos, como así también para evaluar potenciales tratamientos (Mir & Rivarola, 2022).

Tanto el EPM como el OF son utilizados para analizar el comportamiento ansioso y exploratorio de estos animales. Basados en la tigmotaxis de los mismos, se diseñaron como plataformas con áreas abiertas y cerradas para poder medir parámetros referentes a la locomoción, preferencias espaciales y exploración (Lezak et al., 2017; Kraeuter et al., 2019a; Kraeuter et al., 2019b). Los comportamientos similares a la ansiedad se evalúan a partir del porcentaje de tiempo que los sujetos permanecen en los sitios expuestos o cerrados de la arena; mayor presencia en los brazos abiertos del EPM o en la zona central del OF son interpretados como menores niveles de ansiedad y de manera recíproca, más tiempo en los brazos cerrados o en la periferia de la arena significan mayores niveles de ansiedad (Lezak et al., 2017; Kraeuter et al., 2019a; Kraeuter et al., 2019b). Por otro lado, para las conductas exploratorias se toman otros parámetros como la locomoción total, número de alzamientos con o sin apoyo y tiempo en la zona central de la arena. A mayores niveles de estos parámetros, se considera que el individuo presenta un gran despliegue de conducta exploratoria y menores niveles de ansiedad (Thompson et al., 2018; Kraeuter et al., 2019a; Kraeuter et al., 2019b).

En cuanto a la exploración social, el SPT es utilizado para evaluar niveles de sociabilidad aprovechando la tendencia de las ratas a buscar la compañía de conespecíficos en comparación a objetos inanimados (Toth & Neumann, 2013). Se coloca al individuo en una arena con dos estímulos distintos: un objeto novedoso y un individuo conespecífico enjaulado, permitiendo al sujeto de estudio recorrer libremente el espacio e interactuar con dichos estímulos. Se mide el porcentaje de tiempo que el individuo permanece cerca

de cada estímulo; mayores niveles de esta variable en el área circundante al conespecífico son interpretados como mayores niveles de sociabilidad, lo contrario puede interpretarse si el individuo pasa más tiempo cerca del objeto (Toth & Neumann, 2013).

3. Áreas cerebrales involucradas con el comportamiento

En este trabajo nos centramos en áreas claves de los comportamientos anteriormente descritos, como lo son la amígdala extendida, los núcleos hipotalámicos (núcleo paraventricular y supraóptico) y el septum lateral, evaluando los niveles de actividad neural basal de cada área.

La amígdala extendida es una estructura cerebral que abarca varias áreas altamente interconectadas entre sí y con funcionalidades similares tales como la amígdala basolateral (BLA), la amígdala central (CeA), el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) y el núcleo accumbens (NAcc) (Fox & Shackman, 2017; Baidoo & Leri, 2022). La amígdala es considerada el principal centro integrador y procesador de la información sensitiva proveniente del tálamo y, gracias a su alta conectividad con otras áreas somatomotoras y neuroendocrinas, desempeña un papel fundamental en la ejecución de los comportamientos similares a ansiedad y exploratorios (Fox & Shackman, 2017; Babaev et al., 2018; Baidoo & Leri, 2022). Por otro lado, el BNST es otra área integradora de información límbica con gran participación en la activación del eje hipotálamo hipofisario suprarrenal (HPA, por sus siglas en inglés) y el comportamiento social (Lebow & Chen, 2016).

Los núcleos hipotalámicos tienen un rol preponderante en las respuestas neuroendocrinas del organismo, regulando procesos fisiológicos y las respuestas ante el estrés (Stephens & Wand, 2012). En presencia de estímulos estresores se activan núcleos hipotalámicos como el paraventricular (PVN en inglés), parte fundamental del eje HPA (Stephens & Wand, 2012). Este sistema regula la producción y liberación de glucocorticoides, suscitando respuestas similares a la ansiedad y otros procesos fisiológicos (Stephens & Wand, 2012; Sandi & Haller, 2015).

Por otro lado junto al núcleo supraóptico (SON, en inglés), el PVN también tiene influencia en cuanto a la conducta social de los individuos debido a que ambos presentan

células secretoras de oxitocina y vasopresina (Froemke & Young, 2021). Se vio que estas hormonas promueven conductas prosociales (asertividad, formación de vínculos afectivos, apego, empatía, lactancia y comportamientos parentales) (Sandi & Haller, 2015; Froemke & Young, 2021) y además tienen efectos ansiolíticos o ansiogénicos, respectivamente (Sandi & Haller, 2015). Cabe resaltar además que existe un dimorfismo sexual en cuanto a los mecanismos reguladores subyacentes a estos comportamientos debido al efecto dimórfico que genera la oxitocina y la vasopresina en ambos sexos (Menon et al., 2022).

Para finalizar, el septum lateral (LS) es un área con un rol preponderante en la regulación de varios comportamientos. Entre ellos se incluyen las respuestas similares a la ansiedad y una gran variedad de comportamientos sociales (interactividad, juego, agresividad, comportamientos sexuales, agresividad materna, entre otros) (Wirtshafter & Wilson, 2021; Menon et al., 2022). Esto se debe por un lado a la gran interconectividad que presenta con otras áreas como la corteza prefrontal motora, hipocampo, CeA, BLA, PVN, SON y área tegmental ventral, como así también debido a la gran cantidad de receptores hormonales que presenta (oxitocina, vasopresina, dopamina, serotonina, hormonas sexuales, entre otras) (Wirtshafter & Wilson, 2021; Menon et al., 2022).

4. Adolescencia: Un período de cambios, plasticidad y sensibilidad

La pubertad y adolescencia constituyen una etapa ontogenética fundamental en los animales, en la cual los juveniles experimentan una serie de cambios cognitivos, neuroendocrinos, fisiológicos y de desarrollo que los alteran física y comportamentalmente para convertirlos en adultos (Buwalda et al., 2011; McCormick & Green, 2013; Hueston et al., 2017). En la rata, la misma transcurre entre los DPN 21 a 59 (McCormick & Green, 2013; Burke et al., 2017; Hueston et al., 2017).

En este período ocurre la maduración sexual, consistente en cambios hormonales y neuroendocrinos que ocasionan modificaciones en distintos órganos del individuo. Dentro de estos órganos se incluyen diversas áreas cerebrales (hipocampo, amígdala y corteza prefrontal, entre otras) y los circuitos conformados por sus interacciones (como el sistema límbico, vasopresinérgico y oxitocinérgico) que ocasionan variaciones en los comportamientos del individuo (Buwalda et al., 2011; McCormick & Green, 2013;

Hueston et al., 2017). Dentro de estas conductas, los comportamientos similares a ansiedad y sociales son de particular interés; por una lado debido a la gran susceptibilidad de los animales a situaciones adversas y por otro a la alta plasticidad y continuo desarrollo de las áreas cerebrales ligadas a estos comportamientos (McCormick & Green, 2013; Burke et al., 2017).

A nivel de conductas, se ha visto que roedores adolescentes presentan mayor reactividad emocional, interacciones sociales, búsqueda de nuevos estímulos y sensaciones, impulsividad, búsqueda de riesgo, habituación a la novedad y aumento de la sensibilidad a la recompensa en comparación a los adultos. Por otro lado, presentan distintas respuestas a la reestructuración del comportamiento social y al estrés durante este período (McCormick, 2013; Burke et al., 2017; Bishnoi et al., 2021).

5. Diferencias entre sexos

Los roedores al igual que los humanos presentan dimorfismo sexual a varios niveles. Éste tiene un origen multifactorial que involucra genes, hormonas y al ambiente (McCarthy & Arnold, 2011). Un actor principal de dicho dimorfismo es el gen SRY, presente en el cromosoma Y de los machos; éste origina la diferenciación de las gónadas bipotenciales en testículos. Este hecho genera una producción diferencial de hormonas sexuales intervinientes en períodos clave del desarrollo embrionario (Palanza et al., 2016; Hines, 2020). La exposición diferencial a estas hormonas en el período gestacional genera dimorfismos en varias áreas cerebrales implicadas en el comportamiento (Bonthuis, 2010; Palanza et al., 2016; Hines, 2020). Por otro lado, durante la pubertad ocurre la producción diferencial de testosterona en machos y estrógenos en hembras. El aumento de estas hormonas sexuales lleva a cambios organizacionales y activacionales de distintas áreas de manera sexualmente dimórfica, derivando en cambios en el comportamiento ansioso, social y exploratorio de los roedores (Sisk & Zehr, 2005; Domonkos et al., 2018).

En cuanto a estructuras nerviosas relacionadas al estrés, mediante inmunohistoquímica de proteínas Fos, se han observado diferencias en los niveles de activación neuronal basal de distintas áreas cerebrales tras exponer a los roedores a estresores agudos y/o crónicos. Estudios mostraron aumentos significativos en la expresión de c-Fos (factor de

transcripción de genes de expresión temprana) en el BNST tras la exposición a un estresor agudo en machos, lo cual no se observó en hembras (Urien & Bauer, 2022). Otro estudio evidenció niveles de actividad basal mayores en PVN, CeA y NAc en machos comparados con las hembras a través de la inmunomarcación de Fos-B, un marcador de actividad crónica (Westenbroek et al., 2003). Sin embargo, también existe evidencia de lo contrario, siendo las hembras quienes presentan mayor expresión de la proteína Fos-B en el PVN respecto a los machos, aunque no se reitera en CeA ni en BNST (Sterrenburg et al., 2012). Esta información sobre la actividad neuronal basal, aunque variable, evidencia una clara diferencia sexual, sin importar el agente estresor que se aplicase. También se observa dicha diferencia en los sistemas vasopresinérgicos y oxitocinérgicos, que desempeñan un papel importante en la regulación de los comportamientos sociales (Smith et al., 2017; Aspesi & Choleris, 2022).

Las diferencias neurológicas entre sexos podrían ser una de las causas del dimorfismo en el comportamiento de los individuos (Bonthuis et al., 2010; Palanza et al., 2016; Hines, 2020). Aunque es necesario resaltar la gran variabilidad de los resultados, gran parte de los mismos tienden a concluir que existen diferencias conductuales entre machos y hembras en las pruebas EPM, OF y SPT.

Se ha observado que las hembras presentan mayor locomoción, número de entradas (Scholl et al., 2019; Knight et al., 2021; Graf et al., 2023) y tiempo en brazos abiertos del EPM que los machos (Xiang et al., 2011; Scholl et al., 2019; Knight et al., 2021; Graf et al., 2023). Sin embargo, otros estudios evidencian lo contrario, siendo los machos quienes pasan más tiempo en los brazos abiertos (Bales et al., 2004; Bridges & Starkey, 2004; An et al., 2011) y en la zona central de la arena (Bridges & Starkey, 2004).

En el OF se ha visto que las hembras presentan mayores niveles de locomoción respecto a los machos (Daviu et al., 2014; Bishnoi et al., 2021). Sin embargo existe variabilidad en cuanto al tiempo en la zona central de la arena. Algunos estudios indican que tanto machos (Daviu et al., 2014; Bishnoi et al., 2021) como hembras (Kokras et al., 2018; Knight et al., 2021) pasan más tiempo en dicha área respecto a su contraparte sexual.

Finalmente, indistintamente del sexo, los roedores prefieren explorar estímulos sociales a objetos inertes (Scholl et al., 2019; Zeng et al., 2021). Sin embargo, estudios indican que las hembras pasan más tiempo con el estímulo social que los machos (Scholl et al., 2019; Zeng et al., 2021), mientras que los machos pasan más tiempo con el estímulo inerte (Zeng et al., 2021). Otros estudios indican lo opuesto, siendo que los machos pasan más tiempo interactuando con individuos conespecíficos que las hembras (Graf et al., 2023).

6. Plasticidad cerebral

El cerebro puede reorganizar su estructura y funcionalidad en base a factores genéticos y diversos estímulos tanto intrínsecos como extrínsecos (von Bernhardi et al., 2017). Dentro de los estímulos extrínsecos (ambientales) podemos encontrar a agentes estresores (físicos, químicos o sociales) como así también estímulos positivos como el AE, entre otros.

Entre los principales cambios que pueden ocurrir en la estructura cerebral, podemos mencionar la neurogénesis, migración celular, cambios en la arborización dendrítica y por consiguiente, modificaciones en las redes sinápticas (von Bernhardi et al., 2017). Estas modificaciones pueden generar variaciones en la funcionalidad del sustrato nervioso, lo que a su vez genera alteraciones en los comportamientos que realicen los individuos tanto a corto como a largo plazo (Radley & Morrison 2005; Sandi & Haller, 2015; Li et al., 2016).

Si bien el área más extensamente estudiada en plasticidad es el hipocampo, existe evidencia de que este fenómeno también ocurre en otras áreas, entre ellas la amígdala, BNST y LS (Radley & Morrison 2005; Sandi & Haller, 2015; Hodges et al., 2018).

6.1 Plasticidad durante la juventud

Si bien el cerebro presenta plasticidad durante toda la vida del individuo, la etapa perinatal y la adolescencia son los más plásticos (Li et al., 2016). En estas etapas ocurre la formación, desarrollo y maduración de los órganos y sistemas del individuo, siendo el comportamiento otro factor que se ve moldeado a partir de la influencia ambiental (Maccari et al., 2014; Sandi & Haller, 2015; Li et al., 2016).

Estudios que aplicaron protocolos de estrés durante la gestación (físicos, químicos o sociales) mostraron efectos tanto a nivel neuronal a través de modificaciones epigenéticas como comportamentales (Maccari et al., 2014). Estos efectos incluyen cambios en la plasticidad del hipocampo, actividad del eje HPA como así también en la memoria y en la frecuencia de comportamientos similares a ansiedad y depresión (Maccari et al., 2014; Sandi & Haller, 2015).

Alteraciones semejantes también se evidenciaron al aplicar agentes estresores después del parto (Maccari et al., 2014; Li et al., 2016; Houwing et al., 2019). La exposición a distintos estímulos nocivos afecta la actividad del eje HPA tanto a las madres como a las crías, lo que puede alterar la conducta materna. La interacción madre - crías es un factor ambiental a tener en cuenta en el período postnatal temprano, ya que el cuidado maternal desempeña un papel determinante en la supervivencia, adaptabilidad y comportamientos de la prole. A nivel neuronal, se han visto modificaciones epigenéticas debido a la ausencia de cuidado materno lo que altera la densidad dendrítica y afecta la supervivencia de las nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo. Por otro lado la disminución en el cuidado materno promueve las conductas similares a ansiedad en la prole a corto y largo plazo (Maccari et al., 2014).

Una vez transcurrida la infancia llegamos a la adolescencia, una etapa caracterizada por cambios significativos, como fue descrito anteriormente. Entre estos cambios, la maduración del eje HPA junto a los cambios hormonales propios de este periodo, aumenta la susceptibilidad al estrés de los individuos, afectando la plasticidad de estructuras nerviosas (Hueston et al., 2017). En resumen, la vida temprana de los individuos es una etapa altamente plástica en la cual las distintas áreas cerebrales son propensas a ser modificadas a partir de diversos estímulos ambientales tanto positivos como negativos.

6.2 Estímulos ambientales y la plasticidad cerebral

En el apartado anterior se expuso que el ambiente influye en el desarrollo de los animales, sin embargo no se ha mencionado qué efectos ocasiona.

En líneas generales, someter a los individuos a situaciones de estrés, tanto de manera aguda como crónica, genera fenotipos ansiogénicos y de menor sociabilidad. Específicamente, estudios han demostrado que los protocolos de estrés disminuyen la motivación social y los comportamientos de juego en roedores. Además, se ha observado un aumento en los niveles de agresividad y de conductas antisociales (en este último caso, al aplicar tratamientos estresores durante la adolescencia) (Sandi & Haller, 2015).

Este efecto se puede ver indistintamente si se aplica el tratamiento en el período gestacional (Said et al., 2015; Corredor et al., 2022), postnatal temprano (Moreno Martínez et al., 2020; Corredor et al., 2022) o en la adolescencia (Alves et al., 2014; Luo et al., 2014; Keeley et al., 2021). Se han aplicado distintos tipos de estresores, incluyendo de los tipos sociales (Sandi & Haller, 2015; Houwing et al., 2019; Corredor et al., 2022), físicos (Said et al., 2015; Abramova et al., 2020; Moreno Martínez et al., 2020), químicos (Alves et al., 2014; Keeley et al., 2021) o una combinación de los anteriores (Luo et al., 2014), con resultados similares. Estos resultados coinciden en que los estresores reducen la plasticidad de regiones cerebrales, alteran su estructura o bien producen cambios que exacerban la actividad de áreas reguladoras de las respuestas similares al estrés y agresividad, al mismo tiempo que aminoran otras regiones relacionadas a conductas sociales (Alves et al., 2014; Sandi & Haller, 2015). Se debe tener en cuenta que estos estímulos ambientales pueden ejercer un efecto diferencial en machos y hembras, debido al claro dimorfismo sexual existente en la especie (Ivanova et al., 2021; Corredor et al., 2022).

Sin embargo, existen otros tipos de estímulos ambientales, como el ejercicio voluntario, que generan fenotipos comportamentales ansiolíticos y prosociales. Diversos estudios utilizaron estos tratamientos como potenciales terapias para aminorar el efecto del estrés durante los períodos de mayor plasticidad cerebral (Okudan & Belviranli, 2017; Lynch et al., 2019; Moradi Kor et al., 2020). Si bien la evidencia es diversa, se ha visto que estos estímulos promueven la formación de memoria espacial a corto y largo plazo (Alomari et al., 2013), la exploración respecto a otros congéneres (Tanner et al., 2019), disminuyen los comportamientos similares a ansiedad (Okudan & Belviranli, 2017; Lynch et al., 2019; Moradi Kor et al., 2020) y promueven la neurogénesis hipocampal (Alomari et al., 2013; Okudan & Belviranli, 2017), entre otros efectos.

7. Enriquecimiento Ambiental

El AE es un protocolo experimental utilizado para analizar los efectos del ambiente sobre los individuos (Kempermann, 2019; Mir et al., 2023). Se basa en que las experiencias y los comportamientos que un individuo posee y realiza son capaces de modificar su cerebro y a partir de ello alterar, entre otras cosas, su conducta futura (Kempermann, 2019).

Para ello se combinan estímulos tanto inanimados como sociales para crear un ambiente más complejo de una manera no invasiva (Kempermann, 2019; Mir et al., 2023). De esta forma los individuos en estudio son alojados grupalmente en habitáculos más grandes que están equipados con una variedad de elementos como juguetes, ruedas para correr, túneles, plataformas, entre otros (Kempermann, 2019; Mir et al., 2023). En contraste, el grupo control es alojado en habitáculos estándar y de a pares, considerándose entonces un ambiente más empobrecido con respecto al grupo experimental (Kempermann, 2019).

Se ha visto que el AE a nivel tisular promueve el crecimiento e incrementa el peso del cerebro (Kempermann, 2019). A nivel celular, promueve la síntesis de neurotrofinas (BDNF, NGF, etc), la proliferación celular y la neurogénesis (Kempermann, 2019; Mir et al., 2023). El mecanismo sería a partir de cambios epigenéticos, por ejemplo metilación de histonas, alterando la expresión de distintos genes relacionados con la división celular (Kempermann, 2019; Mir et al., 2023). A nivel sistémico, se ha visto que disminuye la reactividad del eje HPA, aumenta la actividad metabólica y disminuye el peso corporal (Mir et al., 2023). En cuanto a los comportamientos, en líneas generales se ha visto que promueve el aprendizaje y memoria, las conductas sociales, maternales y disminuye las conductas similares a ansiedad y depresión (Mir et al., 2023). No obstante cabe resaltar que la evidencia empírica comportamental es variable, debiéndose considerar el momento en el cual se aplica el protocolo, pudiendo ser en la vida temprana, adolescencia (Dandi et al., 2018; Doreste Méndez et al., 2019) o adultez (Doreste Méndez et al., 2019). Otros factores a tener en cuenta son la duración del enriquecimiento y la combinación con otros estímulos ambientales por ejemplo, estresores (Mir et al., 2023).

A continuación se muestra un resumen de los principales efectos del AE y del estrés ambiental sobre el sustrato neuronal y conductual de roedores mediado por modificaciones

epigenéticas. La evidencia revela que tales efectos se presentan en forma sexualmente dimórfica, como se ha descrito en secciones anteriores (Fig. 1).

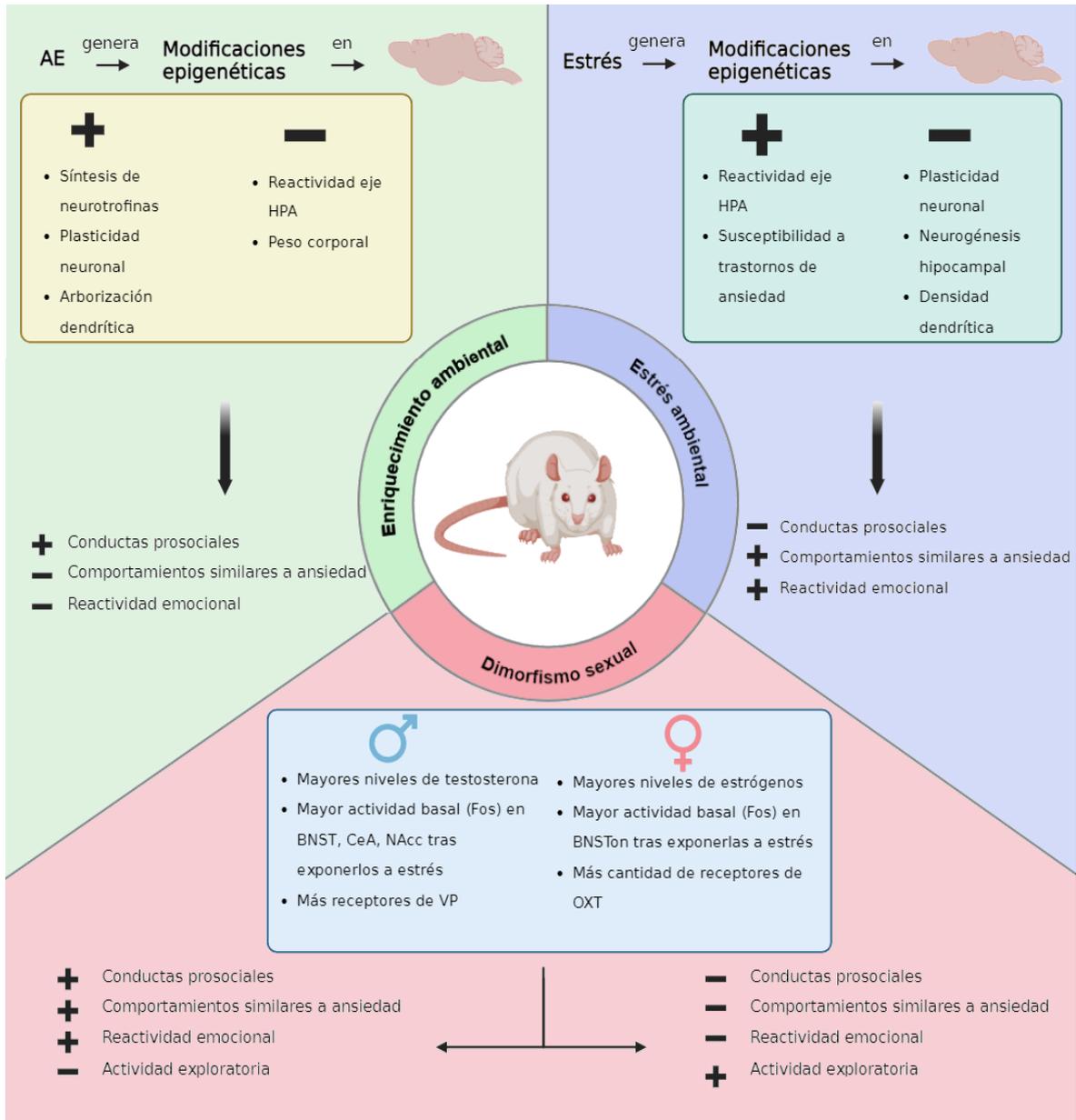


Fig. 1. Efectos del ambiente sobre el cerebro de ratas. Se resumen los principales efectos de los estímulos positivos (enriquecimiento ambiental) y negativos (estrés) sobre el sustrato neuronal a través de modificaciones epigenéticas y sobre el comportamiento ansioso, exploratorio y social. En roedores, al igual que en el resto de mamíferos, existe un claro dimorfismo sexual. Estas diferencias entre sexos ameritan estudiar los posibles efectos diferenciales del AE gestacional sexualmente por separado. BNST: Núcleo del lecho de la estría terminal; CeA: Amígdala central; NAcc: Núcleo accumbens; BNSTon: Núcleo oval del lecho de la estría terminal; VP: vasopresina; OXT: oxitocina.

Otros estudios examinaron los efectos transgeneracionales y la influencia sobre la conducta materna del AE. En estos, el protocolo se aplicó antes del emparejamiento de los progenitores (pregestacional) o después de la cópula exitosa (gestacional). Se evidenciaron efectos del AE sobre los parentales (a nivel epigenético, neuronal y comportamental), como así también sobre las crías, los cuales presentaron dimorfismo sexual. En las hembras promovieron la memoria contextual y aprendizaje como así también disminuyeron los comportamientos similares a depresión y ansiedad. Por otro lado, en los machos se observó un aumento en las conductas similares a ansiedad, salvo cuando se aplicó un agente estresor (Mir et al., 2023).

7.1 Enriquecimiento Ambiental Gestacional: ¿Posible terapia para evitar los desórdenes de conducta?

La aplicación de los distintos protocolos de estrés están diseñados para emular situaciones cotidianas estresantes. De esta manera, la privación de cuidados maternos, estrés crónico variable, presencia de intrusos o aislamiento social, son modelos de estímulos ambientales que pueden afectar a los individuos diariamente (Mir & Rivarola, 2022).

Muchos estudios trataron de aplicar el AE como potencial tratamiento preventivo al efecto de diversos agentes estresores. Estudios donde aplicaron agentes químicos perjudiciales como sevoflurano (Yin et al., 2022), estrés crónico variable durante la gestación (Guan et al., 2021) y separación materna en edad temprana (Dandi et al., 2018; Doreste Méndez et al., 2019), el AE pudo revertir algunos efectos perjudiciales sobre la memoria, aprendizaje (Guan et al., 2021; Yin et al., 2022), comportamientos similares a ansiedad (Dandi et al., 2018) y depresión (Doreste Méndez et al., 2019).

A pesar de la amplia evidencia que respalda la influencia ambiental sobre el desarrollo de los individuos, el AE en el período gestacional ha sido poco estudiado. Basándonos en estos antecedentes, en el presente trabajo postulamos al AE gestacional como un posible enfoque terapéutico que, a través de cambios en áreas cerebrales determinantes, atenúe los efectos del estrés crónico en comportamientos claves como las respuestas ansiosas, la capacidad de explorar y el interés de los individuos por establecer interacciones sociales. Si esto efectivamente se confirma, se abriría la posibilidad de utilizarlo como un potencial

tratamiento para disminuir la probabilidad de que los individuos desarrollen trastornos del estado de ánimo.

Hipótesis

El ambiente que experimentan las crías durante su gestación y lactancia producen modificaciones en la actividad basal de diferentes regiones del cerebro implicadas en la conducta social y el comportamiento ansioso que pueden expresarse en forma diferencial en función del sexo. El AE gestacional atenúa el efecto negativo del estrés temprano, sobre la conducta emocional y ansiosa en las crías en edad juvenil.

Objetivo general

Estudiar los efectos del AE gestacional sobre parámetros neurofisiológicos y conductuales en ratas macho y hembra adolescentes que fueron sometidas a diferentes formas de estrés temprano durante durante la etapa postnatal.

Objetivos específicos

- 1) Determinar si el AE gestacional puede atenuar el efecto negativo del estrés temprano, sobre la conducta similar a ansiedad en las crías macho y hembra en edad juvenil.
- 2) Evaluar los efectos del AE gestacional sobre la interacción social de las crías de ambos sexos sometidas a estrés temprano.
- 3) Analizar mediante inmunohistoquímica la actividad neuronal en áreas vinculadas al control de la conducta social y el comportamiento ansioso en crías juveniles de ambos sexos.

Materiales y Métodos

1. Animales

Se utilizaron ratas hembras vírgenes (divididas en dos cohortes diferentes) derivadas de la cepa Wistar, de dos meses de edad, mantenidas en condiciones constantes de temperatura, y ciclo luz - oscuridad (12:12), con disponibilidad de agua y comida *ad-libitum*.

Para inducir la preñez por cópula fértil, grupos de 2 a 3 hembras en etapa de proestro fueron alojadas con un macho con experiencia. La presencia de espermatozoides en el frotis vaginal la mañana siguiente fue considerada como indicador de preñez y se consideró como día gestacional 1.

2. Tratamientos

2.1 Enriquecimiento ambiental gestacional

Las hembras gestantes fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos experimentales: *Condiciones Standard o SAE* (2 hembras por caja de 40 x 30 x 20 cm), *AE* (grupos de 6 hembras por tanda alojadas en un habitáculo de mayor tamaño 90 x 60 x 75 cm), conteniendo variedad de juguetes, bloques, plataformas de escalada, ruedas para correr y tubos plásticos. La estructura interna y los juguetes fueron limpiados y reacomodados dos veces por semana, los contenedores de comida y botellas de agua también fueron movidos a diferentes lugares del recinto dos veces por semana para favorecer las actividades exploratorias.

Los tratamientos de AE gestacional perduraron durante 20 días de gestación. El día previo a la fecha estimada de parto las hembras fueron ubicadas en cajas individuales de maternidad. El día del parto fue considerado como día posnatal 0 (DPN 0). En el DPN 1, las camadas fueron homogeneizadas para alcanzar un número de 10 crías (con una relación de 1:1 machos y hembras siempre que fue posible), y las crías con sus madres fueron divididos en tres grupos experimentales de forma aleatoria: Sin estrés (SE), estrés por separación materna (SM) o estrés por presencia de un macho intruso (MI).

2.2 Protocolo de estrés postnatal

2.2.1 Separación materna

Las madres fueron separadas de sus crías durante 4,5 hs/día durante las 3 primeras semanas de vida. Cada separación se llevó a cabo retirando a la madre de la caja y colocándola sola en otro habitáculo dentro de la misma habitación. Durante cada período de separación las crías permanecieron juntas. Los ciclos de separación transcurrieron entre las 09:00 y 13:30 hs.

2.2.2 Estrés por la presencia de un macho intruso

Para este procedimiento se colocó en la caja de maternidad una rejilla que permite subdividir la misma en dos compartimientos, en uno de ellos quedó ubicada la madre con sus crías y en el otro se introdujo un macho adulto desconocido, durante 3 horas diariamente hasta DPN 21. La rejilla permitió que los animales pudiesen verse y olerse, pero no interactuar físicamente.

Los roedores SE (control) fueron mantenidos en la caja de crianza con la madre y el resto de la camada hasta el momento del destete, el cual se realizó en el DPN 21.

A partir de los tratamientos descritos, quedaron establecidos los siguientes grupos experimentales (Cuadro 1).

Sexo	Condición Prenatal	Condición Postnatal	Número de individuos por tratamiento
Hembras	SAE	SE	9
		SM	9
		MI	9
Hembras	AE	SE	12

		SM	6
		MI	8
Machos	SAE	SE	10
		SM	12
		MI	9
Machos	AE	SE	12
		SM	8
		MI	7

Cuadro 1. Grupos experimentales y sus respectivos tamaños muestrales. Se muestran todas las combinaciones entre los distintos tratamientos prenatal y postnatal, separando a los individuos por su sexo. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM: Separación materna; MI: Presencia de macho intruso.

Tras el destete, las crías fueron alojadas en grupos de 3 a 5 animales en cajas estándar separadas por sexo, con comida y agua ad libitum hasta el sacrificio de los mismos, en el día DPN 46.

Cabe destacar que para la conformación de los grupos experimentales se utilizaron crías provenientes de al menos dos madres diferentes, a fin de evitar el posible “efecto camada”.

3. Pruebas Conductuales

Para determinar los efectos del AE gestacional y el estrés postnatal sobre el comportamiento de ansiedad y la conducta social en la etapa juvenil, entre los DPN 42 a 44, machos y hembras de los diferentes grupos experimentales fueron evaluados de manera secuencial mediante las pruebas de EPM, OF y SPT.

Previamente a cada prueba, los animales fueron trasladados a la sala de experimentación con 1 hora de antelación para habituarlos. Se colocó al animal en la posición central de cada recinto y se permitió la libre circulación e interacción con su entorno durante 5 minutos. En cada prueba la conducta fue registrada con una videocámara para luego

analizar cada video mediante el software Any-maze versión 7.2 (64-bit) con el objetivo de tipificar las conductas correspondientes a cada ensayo.

Todas las plataformas, cajas y los objetos utilizados fueron limpiados entre cada sesión con una solución de alcohol 70% para evitar la presencia de claves olfatorias.

3.1 Elevated Plus Maze (EPM)

La prueba de Elevated Plus Maze fue utilizada para evaluar los comportamientos similares a ansiedad en las crías adolescentes. El recinto utilizado consistió en una plataforma de cuatro brazos (dos brazos opuestos cerrados por paredes laterales oscuras de 40 cm de altura, mientras que los otros dos no poseen paredes) elevada por un soporte a 50 cm del suelo (Kraeuter et al., 2019a).

Para analizar el comportamiento se tuvieron en cuenta las siguientes variables: porcentaje de tiempo y número de entradas en brazos abiertos, cerrados y en la región central.

3.2 Open Field (OF)

Esta prueba junto al EPM también fue utilizada para analizar los comportamientos similares a ansiedad en roedores, además de niveles de locomoción y exploración. En este caso la arena consistió de una caja de madera grande (50 x 50 x 50 cm) cuya base se encontró uniformemente dividida en sectores regulares (Kraeuter et al., 2019b).

Se tomaron en cuenta el número de cruces de líneas, porcentaje de tiempo en la región central y en la región periférica, número de alzamientos (rearing) con y sin apoyo en la pared, número de defecaciones y cantidad de acicalamiento (grooming) realizado.

3.3 Social Preference Test (SPT)

Finalmente, esta prueba fue utilizada para cuantificar la motivación a realizar comportamientos sociales. Se utilizó una caja similar a la descrita para el test Open Field (ver sección OF), agregando dos líneas extras de manera diagonal, delimitando tres zonas: zona del estímulo inerte (donde se colocó un objeto novedoso de plástico duro), zona central y zona del estímulo social (con una jaula de alambre con una rata conespecífica del mismo sexo).

Se cuantificó la preferencia del individuo por el estímulo social o inerte. Para ello se tomaron en cuenta el tiempo que el individuo se encontró en la zona del estímulo inerte y en la zona del estímulo social como así también el número de ingresos a dichas áreas. A partir de estos datos se calcularon los índices de preferencia social al dividir el número de entradas o el tiempo pasado en la zona del estímulo social sobre el número de entradas totales o el tiempo pasado en ambas zonas, respectivamente (Fig. 2).

$$\text{Índice de preferencia social} = \frac{\text{Tiempo o número de visitas a zona social}}{\text{Tiempo o número de visitas totales en ambas zonas}}$$

Fig. 2. Índice de preferencia social. Se calculó a partir de la preferencia del individuo a visitar o a pasar más tiempo investigando al estímulo social respecto al estímulo inerte. Valores mayores a 0,5 denotan que el individuo transcurrió más tiempo o visitó más veces al estímulo social respecto al objeto inerte.

4. Sacrificio

Veinticuatro horas tras realizar el último ensayo conductual (SPT), los animales fueron sacrificados. Para ello fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de hidrato de cloral 6% p/v (dosis: 0,9 ml/100g de peso corporal) y posteriormente se realizó una perfusión intracardíaca con solución salina y solución fijadora (paraformaldehído al 4% p/v).

Los cerebros tras ser removidos, fueron sumergidos en solución fijadora por 24hs a 4°C y luego almacenados en solución de sacarosa al 30% p/v. Posteriormente fueron seccionados

en cortes coronales de 40 μ m con un micrótomo de congelación a nivel de las áreas de interés. La identificación de estas áreas se realizó de acuerdo al atlas The Rat Brain (Paxinos & Watson, 2007): se consideraron la BLA (Bregma -1,92 mm a -2,92 mm), CeA (Bregma -1,92 mm a -2,92 mm), LS (1,8 mm a 0,96 mm), PVN (Bregma -1,44 mm a -2,04 mm) y SON (Bregma 0,00 mm a -1,92 mm) .

Las secciones fueron almacenadas a -20°C en solución conservadora (29% etilenglicol y 24% glicerol en solución buffer fosfato 0,1M) hasta el procedimiento de inmunohistoquímica.

A continuación se muestra un resumen del protocolo experimental considerando una línea cronológica (Fig. 3).

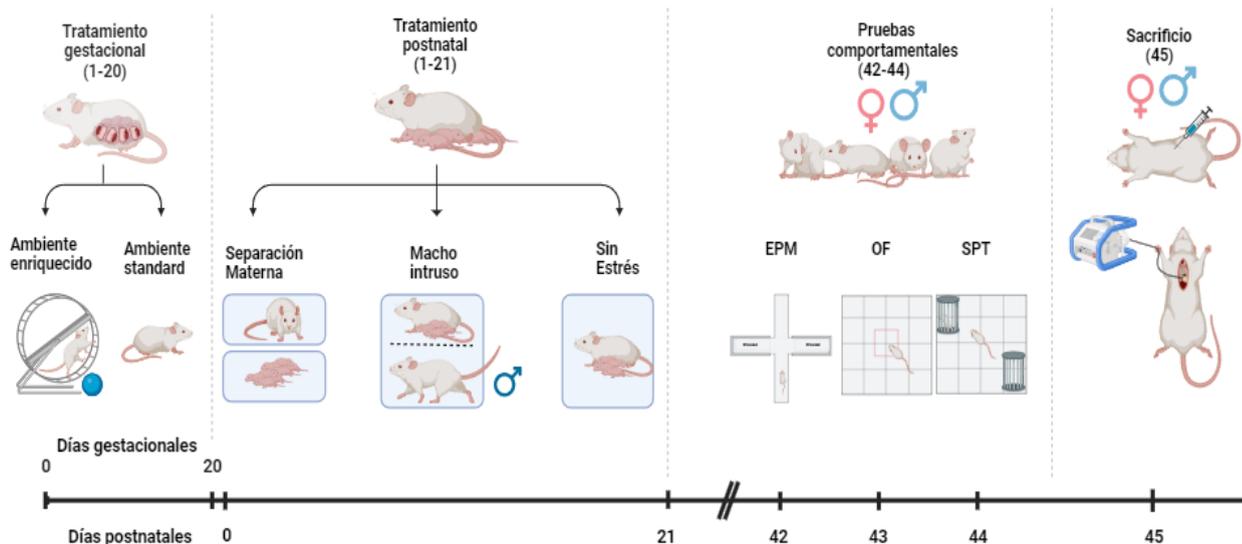


Fig. 3. Diseño experimental. Las hembras gestantes durante la preñez fueron asignadas a uno de los siguientes tratamientos: Sin ambiente enriquecido (SAE) o Ambiente enriquecido (AE). Tras el parto, la madre y sus crías fueron asignadas a un tratamiento de estrés postnatal; Sin estrés (SE), Separación materna (SM) o Macho intruso (MI) hasta el DPN 21. Los test de comportamiento (EPM, OF y SPT) fueron realizados sobre la progenie en los DPN 42 a 44.

5. Protocolo de inmunohistoquímica

Los cortes coronales almacenados fueron rehidratados en solución buffer fosfato salina (PBS) 0,01M. Posteriormente se realizó una recuperación de antígenos incubando los

cortes en buffer Citrato a 60°C por 5 min. Luego se bloqueó la peroxidasa endógena mediante solución bloqueadora (10% metanol, 10% peróxido de hidrógeno y 80% agua destilada) durante 10 min. Se incubó en solución bloqueadora de uniones inespecíficas (1% tritón puro, 5% normal horse serum y 94% PBS 0,01M) por 1 h. Luego se incubó con anticuerpo 1° anti-FRA (Fra1 Anticuerpo (C-12): sc-28310 mouse, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) en una concentración 1:1000 en solución de incubación (1% tritón puro, 99% PBS 0,01M) overnight. Al día siguiente, luego de sucesivos lavados con PBS, se incubó con anticuerpo 2° anti-mouse en solución incubadora en una relación 1:1000 durante 1 hora. Posteriormente se incubó en solución de complejo ABC (1% reactivo A, 1% reactivo B, 1% normal horse serum y 97% PBS 0,01M) durante 1 hora. Finalmente la reacción fue teñida mediante el empleo del complejo Avidin-Biotin-Peroxidasa utilizando diaminobencidina (DAB) 5 mg/ml como cromógeno en PBS y agregando 30 µl de peróxido de hidrógeno durante 7 min. Entre cada paso se realizaron 3 lavados con PBS 0,01M de 5 min cada uno.

Los cortes inmunomarcados fueron montados en portaobjetos gelatinizados y secados a temperatura ambiente por 24hs. Al día siguiente fueron aclarados mediante sumergimiento en Xileno por 1 hora y finalmente se aplicó medio de montaje DPX para adherir el cubreobjetos.

Las imágenes fueron capturadas por medio de una cámara de vídeo de alta resolución acoplada a un microscopio de campo claro Olympus BX-41 y el software Neurolucida 11. Finalmente la cuantificación de las marcas positivas en cada región cerebral de interés para FRA fue realizada mediante el empleo del software FIJI (ImageJ versión 1.54f 29 de junio del 2023) utilizando los plug-ins Multi-point y el Regions of Interest (ROI) Manager. Se determinó un área circular de tamaño estándar para cada región (25000 µm² para BLA y 12500 µm² para CeA) en estudio dentro de las cuales se identificaron y contaron las neuronas FRA positivas. Las posiciones de dichas áreas circulares dentro de la zona de interés fueron determinadas de manera azarosa para el primer corte inmunomarcado y se reiteró la posición relativa de las mismas para todos los cortes analizados. Para considerar una marca positiva se tomaron criterios referentes al tamaño y forma nuclear.

6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados aplicando un análisis de Varianza (ANOVA) a tres vías (AE x estrés temprano x sexo como factores) seguido de la prueba a posteriori de Tukey, para identificar grupos significativamente diferentes. Aquellas variables que no cumplieron los supuestos estadísticos del ANOVA paramétrico, fueron analizadas mediante ANOVA no paramétrica a través del test de Kruskal - Wallis, aplicando el mismo modelo anteriormente descrito y utilizando el método de comparación de a pares para evidenciar diferencias entre tratamientos. Las diferencias se consideraron significativas utilizando como criterio un p valor < 0.05.

El análisis fue realizado mediante el software estadístico Infostat (versión estudiantil, última actualización el 29/09/2020). Los gráficos fueron construidos mediante el software GraphPad Prism 9.

Resultados

1. Elevated Plus Maze

1.1 Actividad exploratoria-Entradas totales: Se observó una diferencia significativa entre sexos respecto a la cantidad de entradas totales ($F_{(1,98)} = 5,51$; $p = 0,021$) siendo las hembras quienes presentaron una mayor cantidad de entradas totales respecto a machos (Gráfico 1 A). Por otro lado se vio un efecto del tratamiento prenatal ($F_{(1,98)} = 16,51$; $p = 0,0001$); siendo los individuos cuya madre fue sometida a AE quienes tuvieron menor cantidad de entradas totales respecto a los individuos del tratamiento SAE (Gráfico 1 A). En cuanto a interacciones entre variables, se vio un efecto en la interacción de los tratamientos prenatal y postnatal ($F_{(2,98)} = 5,21$; $p = 0,0071$), el mismo sólo se vio en individuos sometidos a SM donde individuos del tratamiento de AE realizaron una menor cantidad de entradas totales respecto a individuos del tratamiento SAE (Gráfico 1 B). No se vieron efectos significativos al evaluar interacciones triples entre los factores en estudio (Gráfico 1 C).

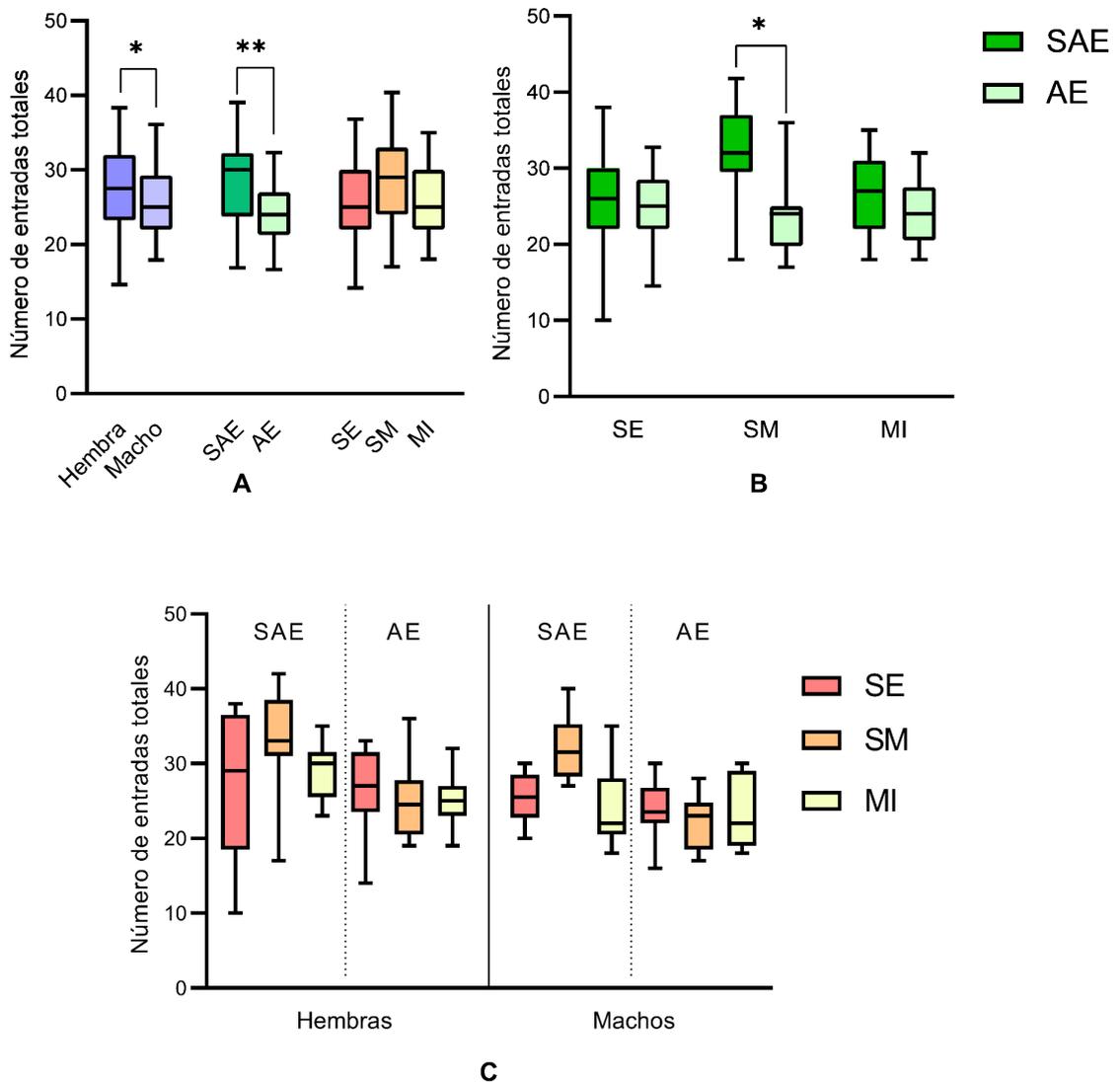


Gráfico 1. Número de entradas totales en el EPM. Se observa la locomoción de los roedores en el EPM, considerando los tratamientos por separado (A), la interacción prenatal x postnatal (B) y la interacción triple de los factores (C). Los datos son presentados en formato box-plot, la caja muestra los percentiles 25 a 75, la línea interna representa la mediana y las barras por fuera de la caja los percentiles 5 a 95. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 6-12 para todos los grupos experimentales). Diferencias entre grupos fueron realizadas mediante test de Tukey; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

1.2 Tiempo en brazos cerrados (%): Fue evidente el dimorfismo sexual en el porcentaje de tiempo transcurrido en los brazos cerrados, siendo los machos quienes pasaron una mayor cantidad de tiempo en esta área respecto a las hembras ($F_{(1,98)} = 6,84$; $p = 0,0103$) (Gráfico 2 A). Si bien no se encontraron diferencias significativas, existe una tendencia a que individuos sometidos a AE pasen menos tiempo en los brazos cerrados que los roedores del SAE ($F_{(1,98)} = 3,26$; $p = 0,0739$). No se vieron efectos de los otros factores ni de las interacciones entre las distintas variables en estudio tanto dobles como triples (Gráfico 2 B).

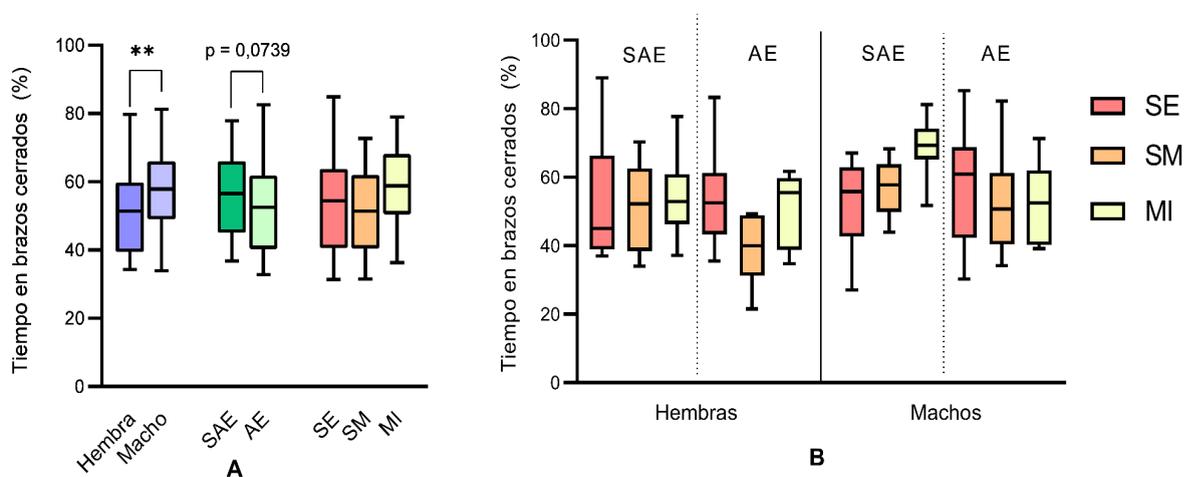


Gráfico 2. Porcentaje de tiempo del animal en los brazos cerrados del EPM. Se observa el tiempo que pasaron los roedores en la región cerrada del EPM, considerando los tratamientos por separado (A) y la interacción triple de los mismos (B). Los datos son presentados en formato box-plot, la caja muestra los percentiles 25 a 75, la línea interna representa la mediana y las barras por fuera de la caja los percentiles 5 a 95. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso ($n = 6-12$ para todos los grupos experimentales). Diferencias entre grupos fueron realizadas mediante test de Tukey; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

1.3 Tiempo en la región central (%): Se observó un efecto del tratamiento prenatal sobre el tiempo que transcurrieron los individuos en el centro del EPM ($F_{(1,98)} = 15,02$; $p = 0,0002$). Los roedores sometidos a AE pasaron una menor cantidad de tiempo en la región central del recinto en comparación a los individuos del tratamiento SAE (Gráfico 3 A). Por otro lado, si bien no hay diferencias significativas existe una tendencia a que los machos pasen más tiempo en la zona central que las hembras ($F_{(1,98)} = 3,84$; $p = 0,0528$). No se

observaron efectos diferenciales al evaluar interacciones dobles o triples entre los factores en estudio (Gráfico 3 B).

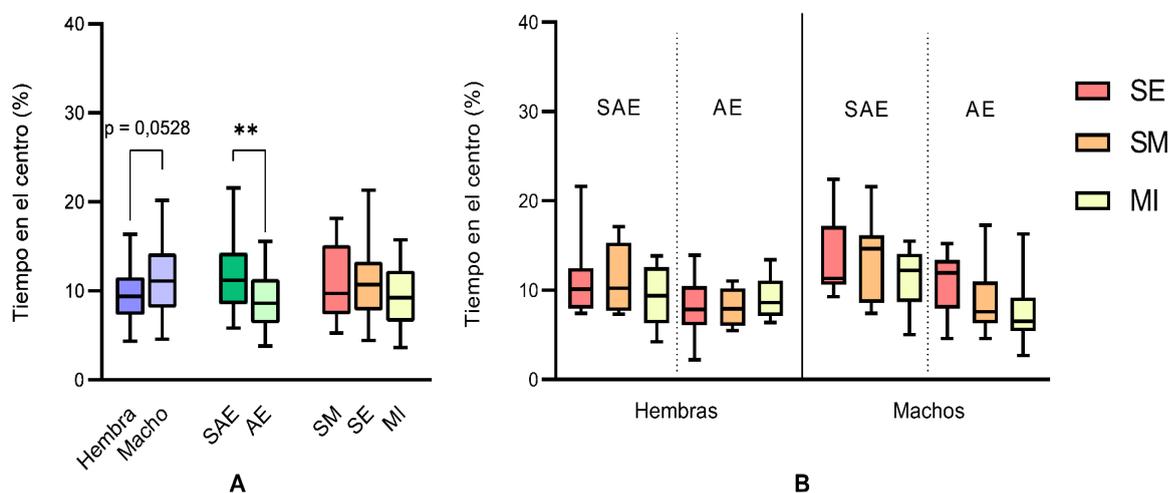


Gráfico 3. Porcentaje de tiempo del animal en el centro del EPM. Se observa el tiempo que pasaron los roedores en el centro del EPM, considerando los tratamientos por separado (A) y la interacción triple de los mismos (B). Los datos son presentados en formato box-plot, la caja muestra los percentiles 25 a 75, la línea interna representa la mediana y las barras por fuera de la caja los percentiles 5 a 95. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 6-12 para todos los grupos experimentales). Diferencias entre grupos fueron realizadas mediante test de Tukey; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

2. Open Field Test

2.1 Actividad exploratoria-Número de cruces: Se evidenció un efecto significativo tanto del sexo de los individuos como el tratamiento postnatal (Gráfico 4 A). Las hembras realizaron un mayor número de cruces respecto a los machos ($F_{(1,99)} = 6,71$; $p = 0,0110$). Por otro lado, individuos estresados mostraron un mayor número de cruces realizados ($F_{(2,99)} = 9,41$; $p = 0,0002$). No se vieron diferencias significativas al evaluar interacciones dobles o triples entre los factores en estudio (Gráfico 4 B).

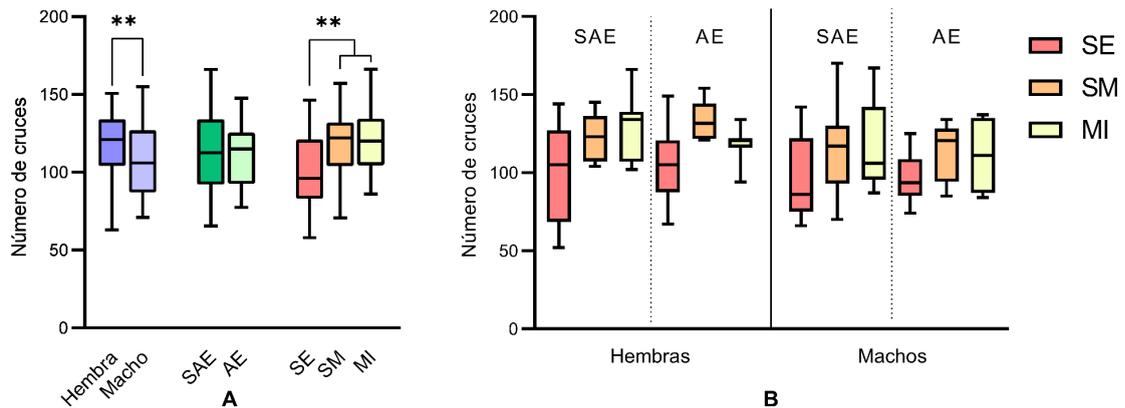


Gráfico 4. Número de cruces. Se observa la locomoción de los roedores, considerando los tratamientos por separado (A) y la interacción triple de los mismos (B). Los datos son presentados en formato box-plot, la caja muestra los percentiles 25 a 75, la línea interna representa la mediana y las barras por fuera de la caja los percentiles 5 a 95. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 6-12 para todos los grupos experimentales). Diferencias entre grupos fueron realizadas mediante test de Tukey; *: p < 0,05 ; **: p < 0,01.

2.2 Tiempo en la zona central: Similar al número de cruces, se vió una diferencia sexual en esta variable: ratas hembras presentaron mayor porcentaje de tiempo transcurrido en la región central de la arena en comparación a los machos (Gráfico 5 A) ($F_{(1,99)} = 6,80$; $p = 0,0105$). En cuanto al tratamiento prenatal, se vió que individuos del tratamiento AE pasaron más tiempo en la región central que los roedores del tratamiento SAE (Gráfico 5 A) ($F_{(1,99)} = 4,04$; $p = 0,0470$). De similar modo, individuos estresados (tanto tratamientos MI como SM) pasaron más tiempo en la región central respecto al control postnatal (Gráfico 5 A) ($F_{(2,99)} = 11,60$; $p < 0,0001$). En cuanto a interacciones dobles se evidenció una interacción entre los tratamientos prenatal y postnatal: en individuos del tratamiento SAE, aquellos roedores sometidos a estrés por MI pasaron más tiempo en la región central de la arena respecto al control SAE + SE; por otro lado, en cuanto a individuos del tratamiento AE, fueron los individuos estresados mediante SM quienes presentaron mayores niveles de tiempo transcurrido en la región central respecto al tratamiento AE + SE (Gráfico 5 B) ($F_{(2,99)} = 4,35$; $p = 0,0155$). No se vieron diferencias significativas al evaluar interacciones triples (Gráfico 5 C).

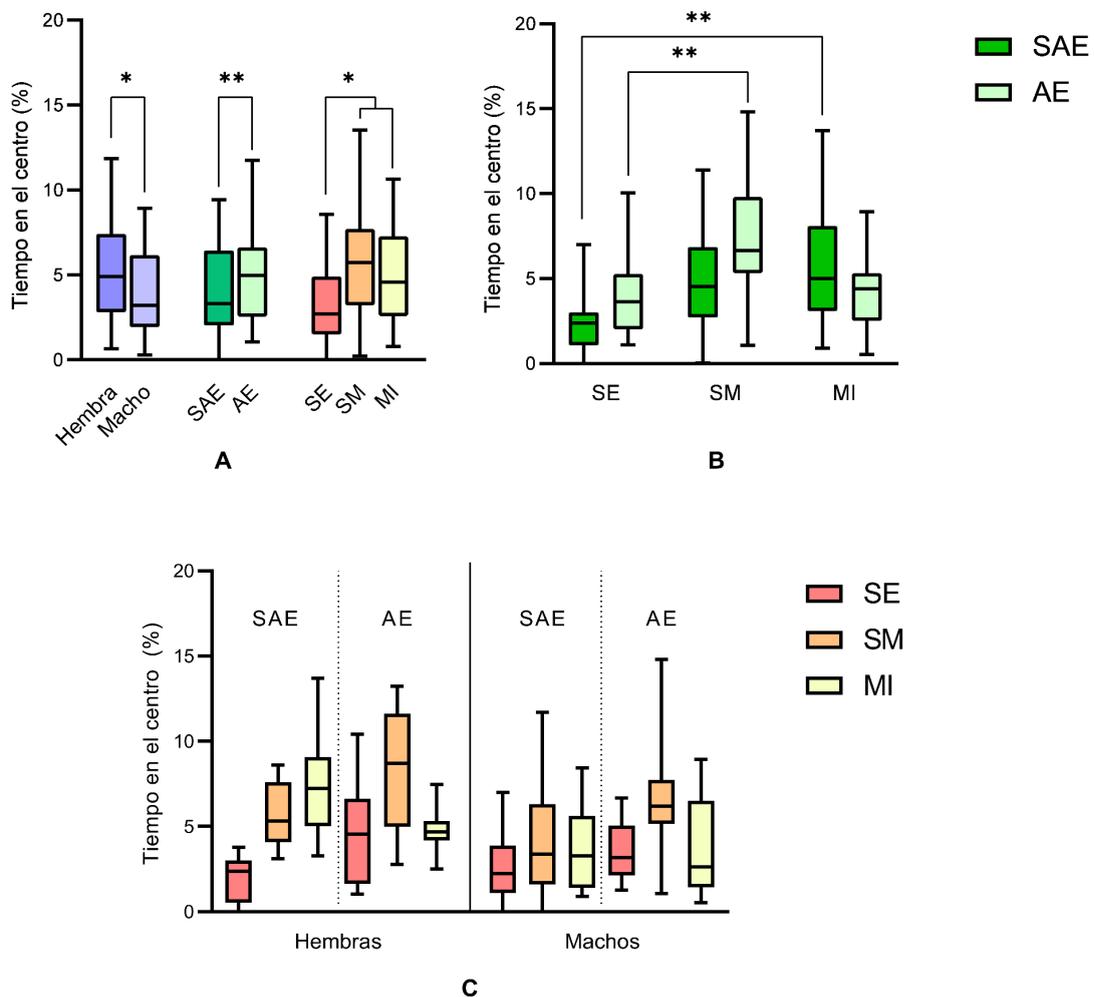


Gráfico 5. Tiempo en la región central del OF (%). Se observa el tiempo que pasaron las ratas en la región central, considerando los tratamientos por separado (A), la interacción prenatal x postnatal (B) y la interacción triple de los factores (C). Los datos son presentados en formato box-plot, la caja muestra los percentiles 25 a 75, la línea interna representa la mediana y las barras por fuera de la caja los percentiles 5 a 95. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 6-12 para todos los grupos experimentales). Diferencias entre grupos fueron realizadas mediante test de Tukey; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

2.3 Rearings contra la pared: Existe un efecto tanto del sexo de los individuos como así también del tratamiento prenatal al que fueron sometidos. Ratas hembras realizaron una mayor cantidad de alzamientos contra la pared respecto a los machos (Gráfico 6 A) ($F_{(1,99)} = 6,62$; $p = 0,0116$). Por el contrario, individuos del tratamiento AE realizaron una menor cantidad de alzamientos (Gráfico 6 A) ($F_{(1,99)} = 10,18$; $p = 0,0019$). Sin embargo, no se

evidenció un efecto del tratamiento postnatal. Tampoco fueron observadas diferencias significativas al evaluar interacciones dobles y triples entre las variables en estudio (Gráfico 6 B).

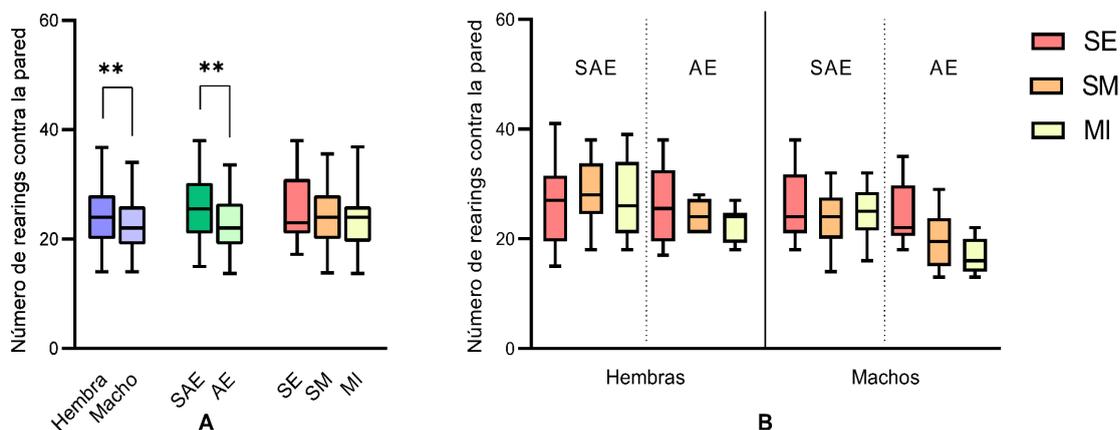


Gráfico 6. Número de rearings contra la pared. Se observa el número de alzamientos contra la pared, considerando a los tratamientos por separado (A) y la interacción triple de los mismos (B). Los datos son presentados en formato box-plot, la caja muestra los percentiles 25 a 75, la línea interna representa la mediana y las barras por fuera de la caja los percentiles 5 a 95. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 6-12 para todos los grupos experimentales). Diferencias entre grupos fueron realizadas mediante test de Tukey; *: p < 0,05 ; **: p < 0,01 .

2.4 Rearings: A nivel unifactorial se vieron efectos significativos únicamente entre niveles del tratamiento prenatal ($F_{(1,99)} = 28,29$; $p < 0,0001$). Individuos cuya madre fue expuesta al AE realizaron una mayor cantidad de rearings sin apoyo (Gráfico 7 A). A nivel de interacciones dobles, se vió un efecto entre los factores prenatal y postnatal: en individuos sometidos a estrés por SM, aquellos pertenecientes al tratamiento de AE realizaron una mayor cantidad de rearings con respecto a sus homólogos SAE (Gráfico 7 B) ($F_{(2,99)} = 4,39$; $p = 0,0149$). No se encontraron diferencias significativas al evaluar interacciones triples entre los factores (Gráfico 7 C).

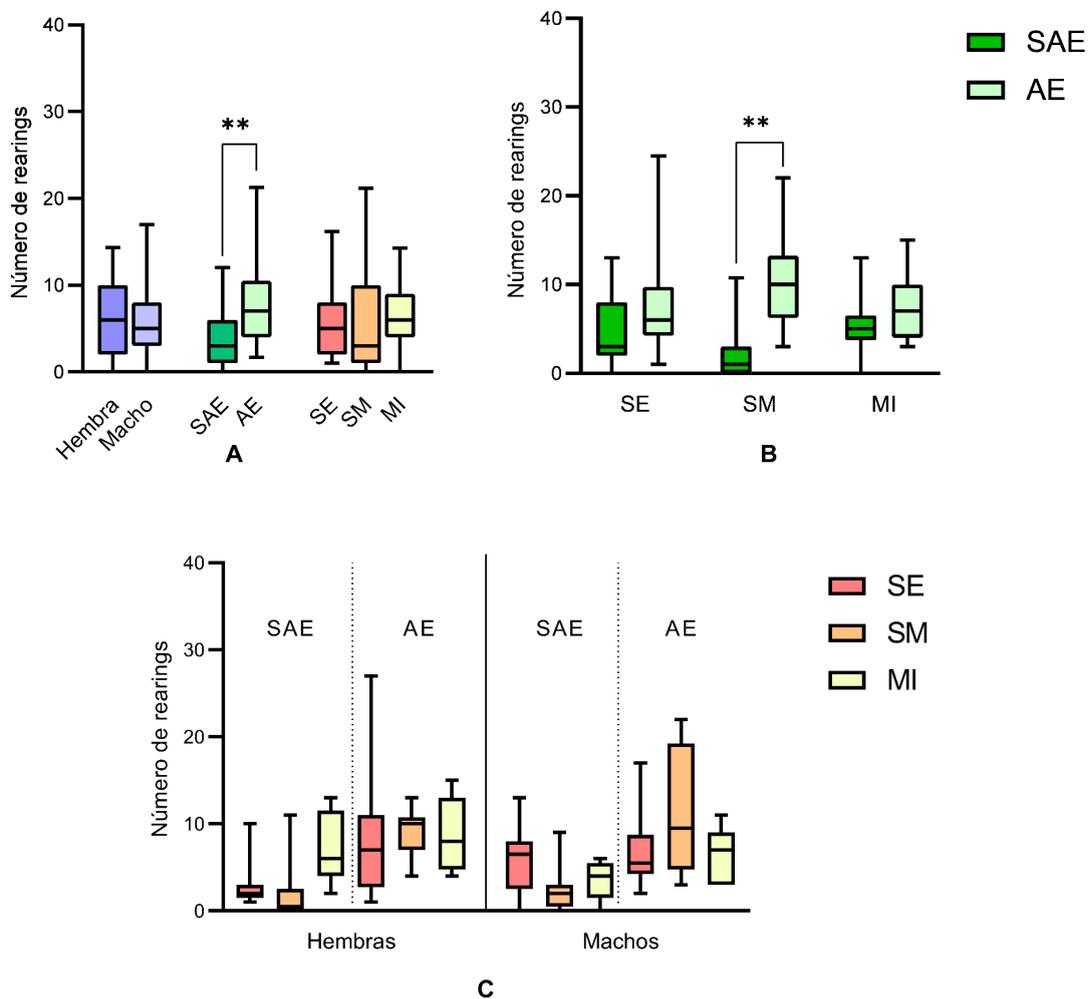


Gráfico 7. Número de rearings (sin apoyo). Se observa el número de alzamientos sin apoyo, considerando a los tratamientos por separado (A) y la interacción triple de los mismos (B). Los datos son presentados en formato box-plot, la caja muestra los percentiles 25 a 75, la línea interna representa la mediana y las barras por fuera de la caja los percentiles 5 a 95. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 6-12 para todos los grupos experimentales). Diferencias entre grupos fueron realizadas mediante test de Tukey; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

2.5 Groomings: Se vio un efecto del tratamiento postnatal sobre el número de groomings; individuos sometidos a SM o MI mostraron un menor número de groomings respecto a individuos sin estresar ($F_{(2,99)} = 10,60$; $p = 0,0001$) (Gráfico 8 A). Al evaluar interacciones dobles y triples entre los factores no se vieron diferencias significativas (Gráfico 8 B).

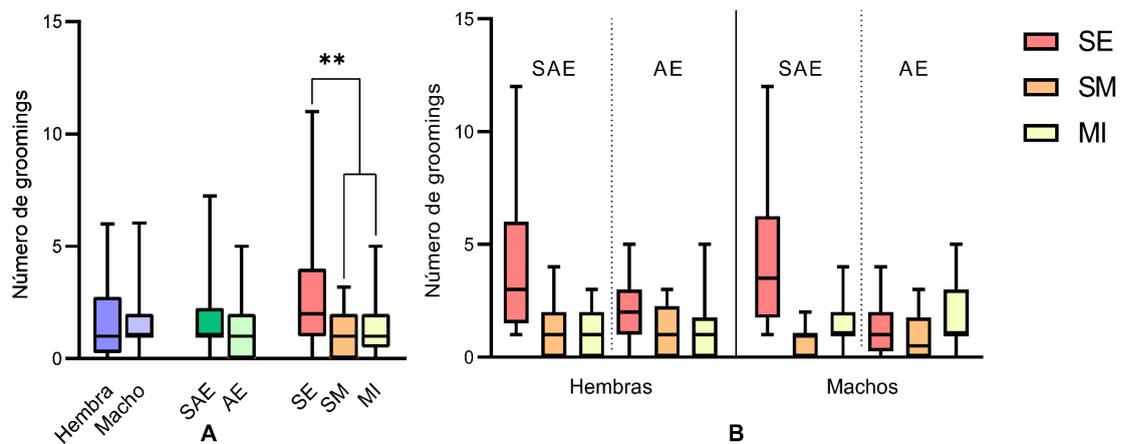


Gráfico 8. Número de groomings. Se observa el número de eventos de acicalamiento de los roedores considerando a los tratamientos por separado (A) y la interacción triple de los mismos (B). Los datos son presentados en formato box-plot, la caja muestra los percentiles 25 a 75, la línea interna representa la mediana y las barras por fuera de la caja los percentiles 5 a 95. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 6-12 para todos los grupos experimentales). Diferencias entre grupos fueron realizadas mediante test de Tukey; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

3. Social Preference Test

3.1 Actividad exploratoria-Número de visitas totales: Se observaron efectos principales tanto del tratamiento prenatal como postnatal. A nivel prenatal, roedores sometidos a AE presentaron menores niveles de visitas totales respecto a individuos del tratamiento SAE (Gráfico 9 A) ($F_{(1,99)} = 15,30$; $p = 0,002$). En cuanto al tratamiento postnatal, existe una diferencia entre individuos sometidos a estrés por MI respecto al control, pero no al comparar individuos del tratamiento SM con el respectivo tratamiento (Gráfico 9 A) ($F_{(2,99)} = 15,30$; $p = 0,002$) . En cuanto al sexo de los individuos, no existen diferencias significativas pero sí una tendencia a que las hembras presenten un mayor número de visitas a ambas zonas que los machos ($F_{(1,99)} = 3,69$; $p = 0,0577$). No se vieron diferencias significativas al evaluar interacciones dobles y triples entre las variables en estudio (Gráfico 9 B).

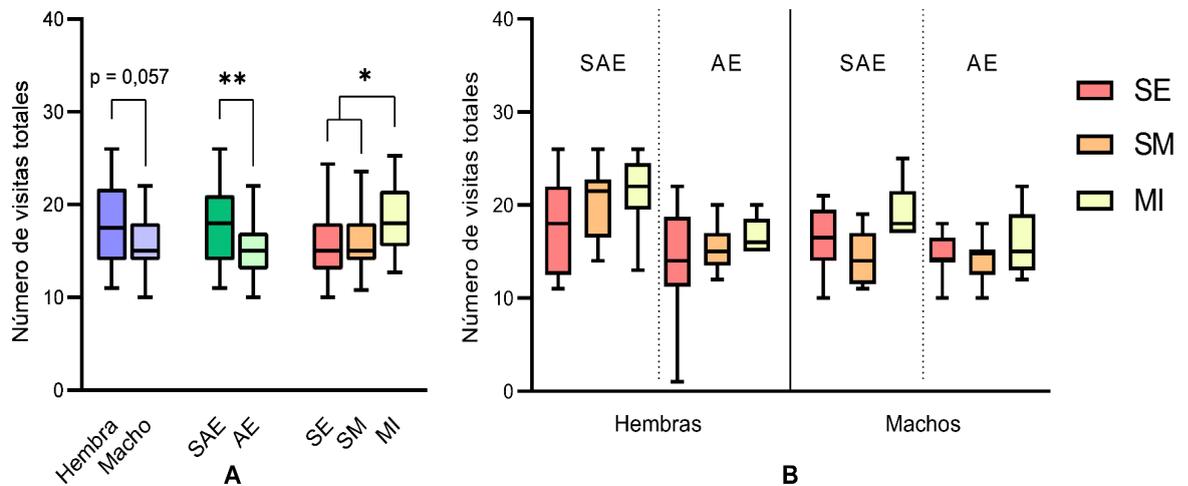


Gráfico 9. Número de visitas totales a ambas zonas (social y asocial). Se observa la locomoción de los roedores en el SPT, considerando los tratamientos por separado (A) y la interacción triple de los factores (C). Los datos son presentados en formato box-plot, la caja muestra los percentiles 25 a 75, la línea interna representa la mediana y las barras por fuera de la caja los percentiles 5 a 95. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 6-12 para todos los grupos experimentales). Diferencias entre grupos fueron realizadas mediante test de Tukey; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

3.2 Índice de preferencia (visitas a la zona del estímulo social): Si bien no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales, se vió que todos los grupos presentaron un índice por encima de 0.5, visitando más a la zona con el estímulo social respecto a la zona con el estímulo inerte (Gráfico 10). No se vieron interacciones significativas dobles o triples entre los distintos factores en estudio (Gráfico 10).

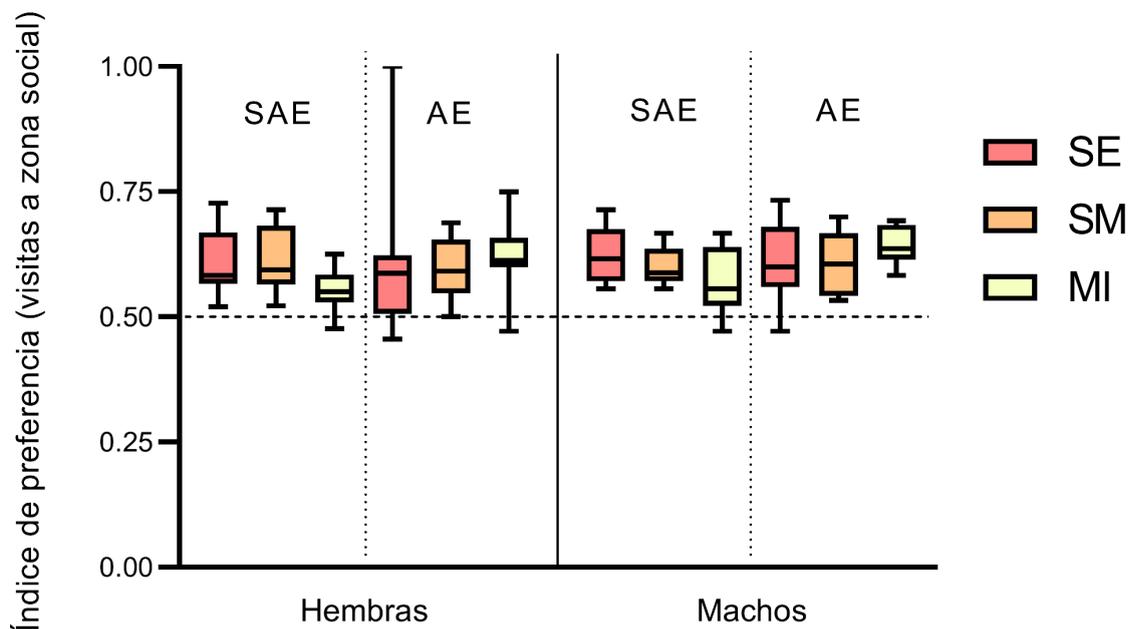


Gráfico 10. Índice de preferencia de visitas (cantidad de visitas a la zona con el estímulo social respecto a las visitas totales). Se observa la preferencia de los individuos a visitar la zona social respecto a su exploración total. Los datos son presentados en formato box-plot, la caja muestra los percentiles 25 a 75, la línea interna representa la mediana y las barras por fuera de la caja los percentiles 5 a 95. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 6-12 para todos los grupos experimentales). Diferencias entre grupos fueron realizadas mediante test de Tukey.

3.3 Índice de preferencia social (tiempo en la zona del estímulo social): No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales ni se vieron interacciones dobles o triples de los factores en estudio (Gráfico 11). Sin embargo, en todos los grupos experimentales el índice es elevado (tendiente a 1) (Gráfico 11).

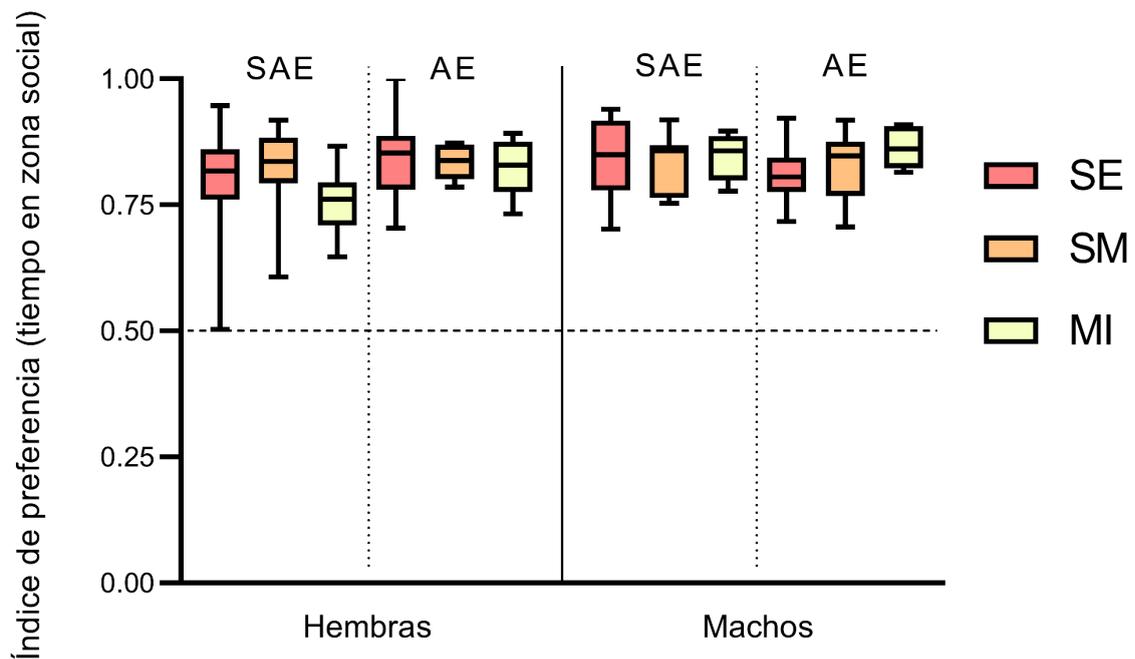


Gráfico 11. Índice de preferancia social (tiempo en zona del estímulo social respecto a tiempo en ambas zonas). Se observa la preferancia de los individuos a pasar más tiempo en la zona social respecto al tiempo total utilizado para explorar. Los datos son presentados en formato box-plot, la caja muestra los percentiles 25 a 75, la línea interna representa la mediana y las barras por fuera de la caja los percentiles 5 a 95. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 6-12 para todos los grupos experimentales). Diferencias entre grupos fueron realizadas mediante test de Tukey.

4. Inmunohistoquímica

A partir de los resultados obtenidos en las distintas pruebas comportamentales, decidimos enfocarnos en evaluar los niveles de actividad neuronal a través de la inmunomarcación de la proteína FRA-1 (o Fos-B) de las neuronas en la amígdala, distinguiendo los subnúcleos amigdalinos BLA y CeA. Esta región fue seleccionada al ser el principal centro integrador de los estímulos sensoriales y organizador de las respuestas similares a ansiedad (Fox & Shackman, 2017; Babaev et al., 2018; Hu et al., 2021; Baidoo & Leri, 2022).

Mediante la técnica de inmunohistoquímica contra Fos-B se revela una marca nuclear en el tejido nervioso, circunscrita y fácilmente detectable respecto al fondo (Fig. 4). Sin

embargo, debido a inconvenientes técnicos por causas todavía no identificadas, sólo hemos logrado realizar la inmunomarcación en dos tandas de individuos de todos los tratamientos ($n = 2$). A partir de esta situación, los datos no fueron analizados estadísticamente y los resultados descritos a continuación fueron comparados a través de su representación gráfica.

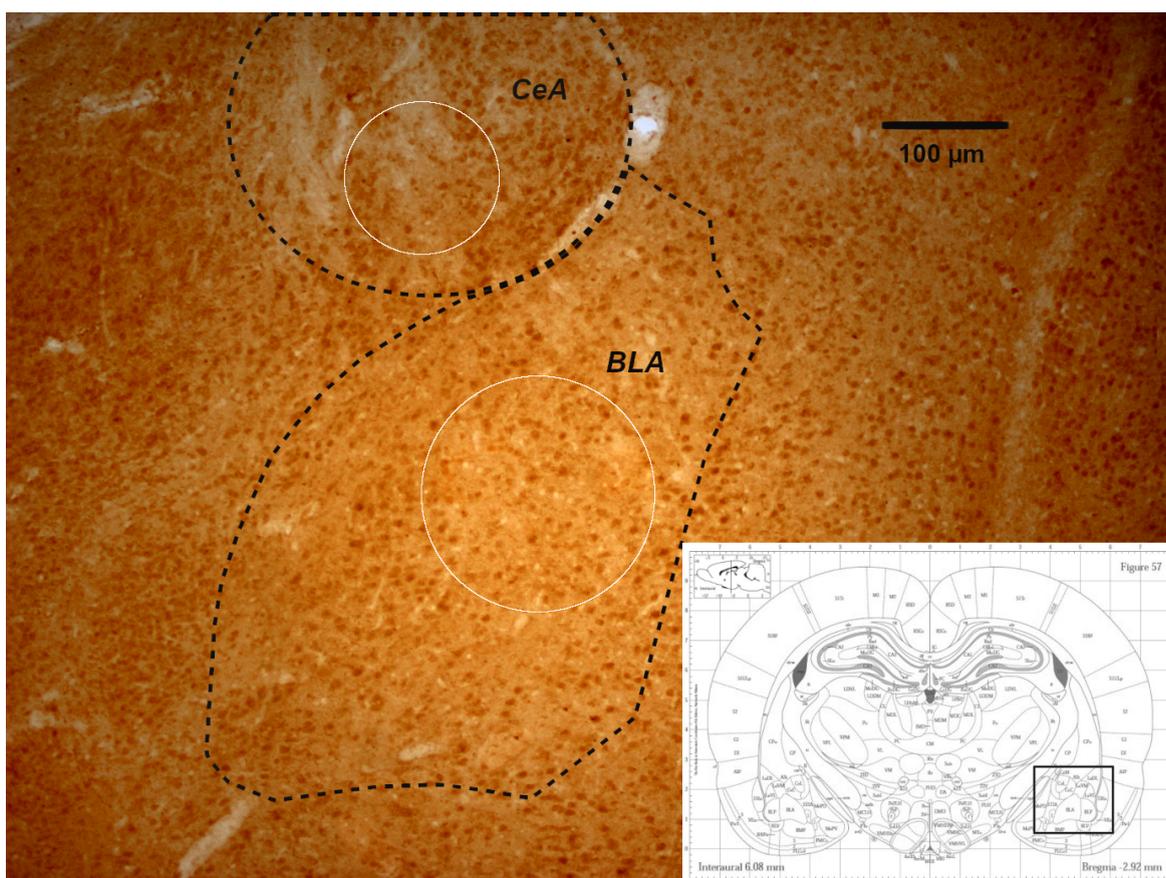


Fig. 4. Inmunomarcación de la proteína Fos-B en cortes coronales de rata cepa Wistar. La imagen pertenece a un macho + SAE + SE. Se puede observar la marca nuclear. BLA: Amígdala basolateral; CeA: Amígdala central. Los círculos blancos internos representan las áreas donde se contabilizaron las marcas Fos-B positivas. El tamaño de dichas áreas se mantuvo constante a lo largo de todos los cortes inmunomarcados analizados. En la esquina inferior derecha se muestra una figura del atlas The Rat Brain representativo del corte mostrado (Bregma -2,92 mm), resaltando el área cerebral fotografiada.

4.1 Número de neuronas Fos-B positivas en BLA: Resultados gráficos preliminares en el número de marcas positivas entre los distintos grupos experimentales, considerando a los factores por separado (Gráfico 12 A) y en el diseño experimental completo (Gráfico 12 B).

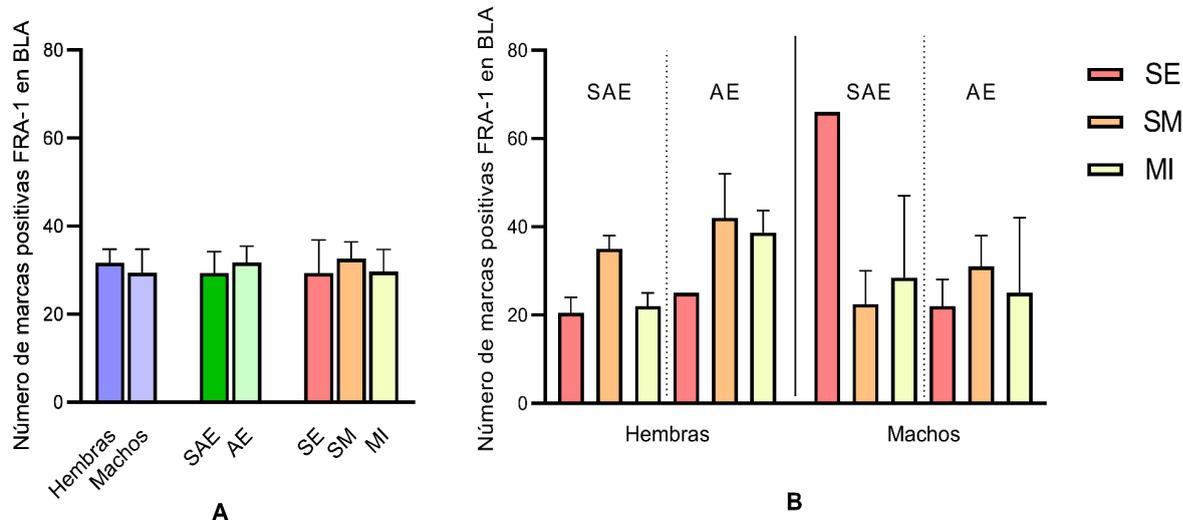


Gráfico 12. Número de neuronas FRA-1 (o Fos-B) positivas en BLA, considerando los factores por separado (A) y sus interacciones (B). Los datos son presentados en formato de gráfico de barras a partir de la media del grupo experimental y su desvío estándar. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 1-2 para cada grupo experimental).

4.2 Número de neuronas Fos-B positivas en CeA: De manera similar a la región BLA, se muestran a continuación resultados preliminares en el número de marcas positivas entre los distintos grupos experimentales, tanto al considerar los tratamientos por separado (Gráfico 13 A) o evaluando sus interacciones (Gráfico 13 B).

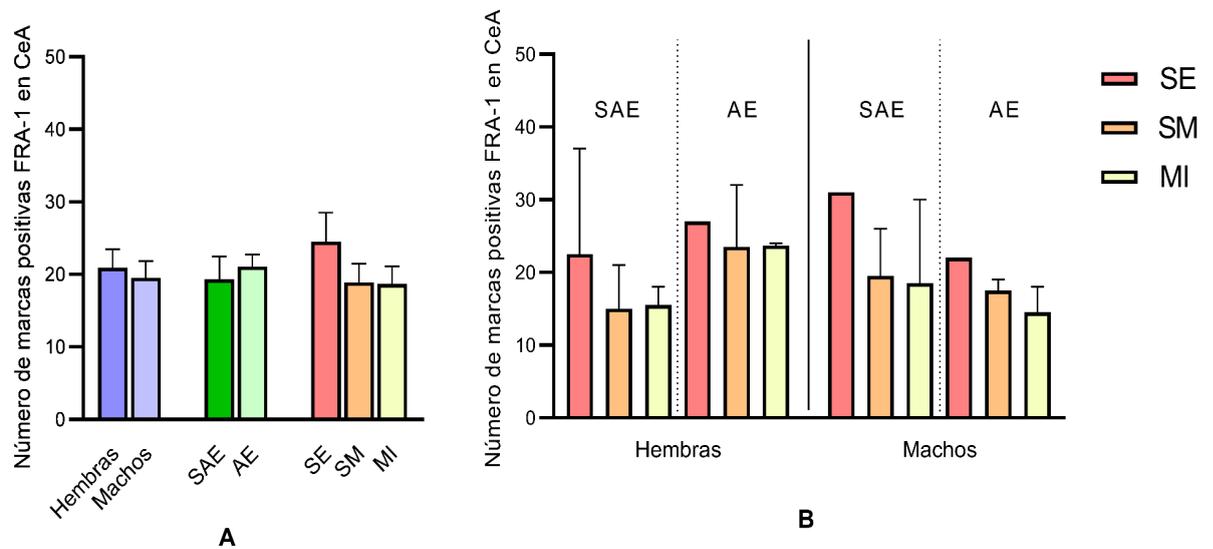


Gráfico 13. Número de neuronas FRA-1 (o Fos-B) positivas en CeA, considerando los factores por separado (A) y sus interacciones (B). Los datos son presentados en formato de gráfico de barras a partir de la media del grupo experimental y su desvío estándar. SAE: Sin ambiente enriquecido; AE: Ambiente enriquecido; SE: Sin estrés; SM; Estrés por separación materna; MI: Estrés por presencia de macho intruso (n= 1-2 para cada grupo experimental).

Discusión

1. Dimorfismo sexual en distintos comportamientos

En relación con los comportamientos exploratorios y conductas similares a ansiedad, nuestros resultados muestran dimorfismo sexual donde las hembras presentaron mayores niveles de locomoción en el EPM y el OF (Gráfico 1 A y 4 A) respecto a los machos. De manera similar, las hembras pasaron más tiempo en la zona central del OF (Gráfico 5 A) y realizaron un mayor número de rearings contra la pared (Gráfico 6 A) en comparación a los machos. Esto, sumado a que los machos pasaron un mayor porcentaje de tiempo en los brazos cerrados del EPM (Gráfico 2 A) nos permite interpretar que, en términos generales e independientemente de los tratamientos pre y postnatales, las hembras presentaron menores niveles de ansiedad y mayor comportamiento exploratorio que los machos. Estos

resultados son consistentes con la bibliografía, en donde las hembras presentaron menores niveles de ansiedad tanto en el EPM (Scholl et al., 2019; Knight et al., 2021; Graf et al., 2023) como en el OF (Knight et al., 2021). Estos resultados pueden deberse en primera medida por el dimorfismo sexual en el sustrato neuronal y por otro al aumento de los niveles de testosterona durante y después de la pubertad en machos adolescentes. En cuanto a las hembras, si bien es sabido que sus niveles hormonales varían debido al ciclo estral, estudios indican que no existen diferencias significativas entre los distintos estadios del ciclo con los niveles de ansiedad (Scholl et al., 2019). Sumado a esto, se vio que la testosterona presenta un rol organizacional fundamental en el desarrollo neurológico en la adolescencia además del período organizacional perinatal, ya que machos sometidos a gonadectomía previo a la pubertad o en los primeros días de la misma, presentaron menores niveles de ansiedad respecto a los controles (Sisk & Zehr, 2005; Domonkos et al., 2018). Lo anteriormente mencionado coincide con las diversas líneas de evidencia que sugieren que la adolescencia es un período crítico para la configuración cerebral influenciada por las hormonas sexuales (Sisk & Zehr, 2005).

En roedores en etapa adolescente, el juego es la conducta social más estudiada. En general, los machos presentan mayor frecuencia de juego social, aunque las hembras responden más rápidamente cuando se les acerca un congénere (Pellis et al., 1997). No obstante, la preferencia social ha sido poco estudiada. Similar a trabajos anteriores (Scholl et al., 2019; Zeng et al., 2021) se vio que tanto hembras como machos prefirieron visitar al estímulo social respecto al objeto inerte (Gráfico 10 y 11). Sin embargo, a diferencia de los trabajos anteriormente mencionados, no se vieron diferencias sexuales en los índices de preferencia (Gráfico 10 y 11). Se ha descrito que las interacciones sociales en los machos disminuyen en un entorno novedoso en comparación con las interacciones en un entorno familiar, sin embargo, las interacciones sociales de las hembras no son diferentes en entornos novedosos y familiares. Esta respuesta depende de la presencia de hormonas gonadales (Sisk & Zehr, 2005). En nuestro estudio los animales fueron testeados en un entorno al que fueron previamente habituados por lo que puede considerarse un ambiente familiar, igualando el comportamiento en machos y hembras. En resumen en este trabajo, de acuerdo a la evidencia empírica presentada en este estudio, existe un dimorfismo sexual en las conductas similares a ansiedad así como en la actividad exploratoria horizontal y

vertical de ratas cepa Wistar. No obstante, es importante destacar que no se encontraron diferencias significativas en lo que respecta a la preferencia social de los individuos.

2. Efecto de los tratamientos estresores

Los individuos estresados (tanto por SM o MI) tuvieron un mayor número de cruces en el OF (Gráfico 4 A), como así también en el SPT para el grupo de estrés por MI (Gráfico 9 A). También pasaron más tiempo en el centro del OF (Gráfico 5 A) y realizaron una menor cantidad de groomings (Gráfico 8 A) en comparación a los individuos control. A partir de esta información podemos concluir que las ratas estresadas presentaron menores niveles de ansiedad y mayor actividad locomotora respecto al control. No obstante, estas diferencias no fueron observadas en el número de entradas totales y el tiempo en los brazos cerrados del EPM (Gráfico 1 A y 2 A).

Similar al factor sexo, no existieron diferencias entre los distintos tratamientos sobre la preferencia social, tanto en el índice de visitas (Gráfico 10) o el índice de tiempo empleado en el área de los individuos (Gráfico 11).

Estos resultados fueron contrarios a los propuestos en la hipótesis del trabajo y la mayoría de la bibliografía, en las cuales se establece que los tratamientos estresores generan una respuesta ansiogénica y disminuyen los comportamientos sociales de estos animales (Sandi & Haller, 2015). No obstante algunos estudios mostraron resultados similares a los obtenidos, donde diversos tratamientos como la inestabilidad social, estresores crónicos impredecibles o la separación materna tuvieron un efecto ansiolítico (D'Aquila et al., 1994; Jarrar et al., 2022; Graf et al., 2023) y mejoraron la performance de los roedores en el test de preferencia social (Graf et al., 2023). Cabe resaltar que en dichos estudios la metodología varió significativamente, ya que se aplicaron protocolos de estrés durante la infancia y adolescencia (Jarrar et al., 2022), sólo en la adolescencia (Graf et al., 2023) o en la adolescencia tardía - adultez (D'Aquila et al., 1994).

Una posible interpretación puede darse en el contexto de la hipótesis match - mismatch, la cual propone que el entorno y experiencias vividas durante el desarrollo temprano pueden influir en las estrategias de los individuos para afrontar situaciones similares en el futuro

(Santarelli et al., 2014). Bajo esta hipótesis, individuos sometidos durante el desarrollo temprano a entornos adversos (estrés por SM o MI) podrían presentar una mejor adaptación a situaciones estresantes en el futuro (como lo son las pruebas comportamentales), traducándose en menores niveles de ansiedad (esta configuración experimental sería considerada un match entre los dos eventos al ser ambos experiencias estresantes). Esta configuración se contrapone a la de individuos que no tuvieron situaciones de estrés postnatal (control) que deben enfrentar los mismos entornos estresantes en el futuro (considerado un mismatch, sin estrés postnatal y con evento estresante durante la adolescencia). Por lo cual la incongruencia entre el ambiente durante el desarrollo temprano y el ambiente esperado en la adolescencia resulta en una respuesta desadaptativa (mayores niveles de ansiedad por ejemplo).

3. Efecto del enriquecimiento ambiental gestacional

El AE influyó principalmente en los comportamientos exploratorios y ansiosos de los roedores, pero al igual que en los factores anteriores no influyó en la preferencia social. En el OF, aquellos individuos sometidos al AE presentaron mayor número de rearings sin apoyo (Gráfico 7 A), aunque al mismo tiempo realizaron una menor cantidad de rearings contra la pared (Gráfico 6 A) y pasaron más tiempo en la zona central de la arena (Gráfico 5 A) que sus contrapartes del tratamiento control. Por su parte en el EPM no se vieron diferencias en los niveles de ansiedad, aunque existe una tendencia a que los roedores enriquecidos pasen menos tiempo en los brazos cerrados que sus contrapartes (Gráfico 2 A). Interesantemente se vieron diferencias en el tiempo pasado en la región central de dicho test, los individuos del tratamiento SAE pasaron más tiempo en dicha zona (Gráfico 3 A). Esta variable puede interpretarse como indecisión por parte del animal al no decidirse por la seguridad de los brazos cerrados o explorar los brazos abiertos. Finalmente, los niveles de locomoción de las ratas enriquecidas fueron menores que sus homólogas, tanto en el EPM (Gráfico 1 A) como en el SPT (Gráfico 9 A). Esto puede plantear un efecto diferencial del AE en las conductas exploratorias horizontales (deambulación) respecto a los comportamientos exploratorios verticales (rearings, lejos o contra la pared, etc).

Diversos estudios indican que el AE disminuye las conductas similares a ansiedad (Hughes & Otto, 2013; Zuena et al., 2016; Dandi et al., 2018; González-Pardo et al., 2019), aumenta la actividad exploratoria (Hughes & Otto, 2013; Dandi et al., 2018; Zuena et al., 2016), y modula diferentes comportamientos sociales entre los que se incluye, la exploración social (Gubert & Hannan, 2019). Si bien existen diferencias claves en los procedimientos (momento en el cual se aplica el protocolo de enriquecimiento o en qué consiste esta complejización ambiental) los resultados tienden a ser constantes. Interesantemente, a pesar de que este protocolo experimental resulta beneficioso en términos de actividad exploratoria vertical, se ha visto que al mismo tiempo disminuye los niveles basales de locomoción en roedores (Urakawa et al., 2013).

Considerando lo anterior, podemos aseverar que el AE gestacional es un importante modulador de conductas exploratorias y similares a ansiedad. Los efectos del mismo pueden transmitirse desde la madre a las crías, aunque todavía no se conoce el mecanismo. Existen dos principales hipótesis para este fenómeno, por un lado una vía gestacional y la otra, postnatal. En la vía gestacional, durante el embarazo los distintos estímulos del AE generan modificaciones epigenéticas en la hembra las cuales, además de afectar a su conducta, promueve otras modificaciones epigenéticas en los embriones gestantes que adquieren ventajas adaptativas en etapas posteriores de la vida (Mir et al., 2023). La otra hipótesis establece que las mejoras en el comportamiento materno debido al AE afectan el vínculo madre - cría. Variaciones en estas interacciones pueden generar alteraciones en la descendencia (por ejemplo en la expresión del factor BDNF), modificando la actividad neural de los distintos circuitos ligados al comportamiento ansioso y exploratorio (Mir et al., 2023). Independientemente de estas hipótesis, es un hecho que no es necesaria la exposición directa de las crías al AE para observar sus efectos.

4. Interacciones entre variables

Más allá de los efectos de los factores por separado anteriormente descritos, las diferencias estadísticamente significativas al evaluar interacciones entre factores fueron escasas. En líneas generales, no se encontraron diferencias estadísticas en las interacciones triples (sexo x prenatal x postnatal). No obstante, sí fueron evidentes interacciones entre los

tratamientos prenatal y postnatal en el número de entradas totales en EPM, número de rearings sin apoyo y tiempo en la región central del OF. Esto significa que la interacción entre estos factores se dio independientemente del sexo de los individuos.

Se observaron influencias del AE sobre los individuos sometidos a estrés por SM. Las crías AE + SM realizaron mayor cantidad de rearings sin apoyo en el OF (Gráfico 7 B) y presentaron menores niveles de actividad locomotora en el EPM en comparación a roedores SAE + SM (Gráfico 1 B). Estos resultados no se repitieron en individuos SE ni MI, lo que indica por un lado que los agentes estresores ejercen distintas influencias sobre los roedores y por otro lado que el AE gestacional modifica la susceptibilidad de estos animales hacia determinados estímulos estresores.

Esta variabilidad de los resultados dependiendo el agente estresor es llamativa, no obstante hipotetizamos que la misma puede deberse a que la SM y el MI son dos tratamientos estresores que alteran el vínculo madre-crías de manera diferente. En el caso de la SM, la interacción madre-crías se ve interrumpida completamente por 4,5hs/día y a causa de esto las crías realizan una serie de vocalizaciones específicas que generan estrés sobre la madre, que no puede asistirles. En contraposición, en el protocolo de estrés por MI el vínculo madre-crías no se interrumpe dado que la madre permanece junto a las crías en un espacio más confinado. Por otro lado, la susceptibilidad de la madre a sufrir estrés por la presencia de un macho intruso es variable. Análisis preliminares de nuestro laboratorio indican que algunas madres son indiferentes a la presencia del intruso, mientras que otras reaccionan de forma agresiva frente a este. Esta diferencia en la intensidad de los estímulos estresores pueden ser los causantes de los resultados anteriormente descritos.

Por otro lado, a diferencia de otros estudios donde el AE tuvo un efecto protector o mitigante contra distintos tratamientos adversos (Dandi et al., 2018; González-Pardo et al., 2019), en este trabajo fue evidente una relación compleja entre la calidad ambiental gestacional y la separación materna. Esta interacción, como hipotetizamos en la sección referente al efecto de los estresores, podría estar relacionada a un proceso de adaptación por parte de los roedores a desafíos estresantes en la adolescencia debido a la separación materna (match), la cual estaría potenciada por parte del AE a través de algún efecto epigenético sobre el sustrato neural. Algunos estudios hipotetizan que el AE es en realidad un tratamiento de estrés crónico leve, debido a que la convivencia de varios roedores en un

ambiente complejo genera cambios neuroendocrinos y promueve la neuroplasticidad, modificando diversos comportamientos en los individuos (Crofton et al., 2016). De ser cierta esta hipótesis, el AE podría considerarse otro evento match para individuos estresados durante su vida temprana, y por el contrario, para individuos SAE se trataría de un evento mismatch.

Otra interacción entre estos factores se vio en el tiempo que los individuos pasaron en la región central del OF. En individuos SAE, se vio que aquellos sometidos a estrés por MI pasaron más tiempo en la región central que sus homólogos SE (Gráfico 5 B). Análogamente, roedores estresados por SM hicieron lo propio en comparación al control (SE) bajo condiciones de AE (Gráfico 5 B). Estas diferencias denotan una susceptibilidad dispar a los tratamientos prenatales y postnatales ante eventos estresantes como lo son las pruebas comportamentales, sobre todo en una edad muy susceptible al estrés como lo es la adolescencia.

5. Actividad de la amígdala a partir de la expresión de Fos-B

La familia de proteínas FOS son genes tempranos inmediatos cuya expresión puede ser modulada por factores externos (por ejemplo, estímulos estresantes). Junto a las proteínas JUN crean factores de transcripción diméricos del tipo proteína-1. Estos factores promueven la expresión de otros genes ligados a la proliferación, diferenciación y muerte celular (Kovács et al., 2022). Debido a su expresión inmediata ante estímulos externos y sumado a que sus productos proteicos pueden persistir hasta varios días tras aplicado el estímulo, hemos analizado la cantidad de neuronas Fos B positivas en un área clave para los comportamientos ansiosos como lo es la amígdala con el fin de analizar los niveles de actividad basal de esta área.

Nuestros resultados preliminares no mostraron diferencias evidentes en los niveles de actividad por área tanto en la BLA como en el CeA, tomando como variable el número de marcas positivas de Fos-B (Gráficos 12 y 13). Aunque no podemos extraer conclusiones definitivas aún, estos resultados a priori son llamativos, debido a los evidentes efectos comportamentales que tuvieron los tratamientos prenatal y postnatal (además del

dimorfismo sexual) que no fueron reflejados en el patrón de expresión de la proteína Fos-B. Es posible que el bajo tamaño muestral ($n = 2$) recolectado hasta el momento enmascare los efectos de los distintos tratamientos y quizás al completar los grupos experimentales emerjan diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, también es posible que los efectos de los tratamientos influyan en la actividad basal de otras áreas neuronales implicadas en las conductas similares a ansiedad (BNST, NAcc, entre otras), lo que generaría los resultados comportamentales reportados.

En la bibliografía existen trabajos donde muestran un aumento en la expresión de Fos-B en distintas áreas incluyendo el BNST, NAcc, CeA y BLA tras exponerlos a un estrés impredecible como las descargas eléctricas tanto de forma aguda como crónica, restricción de movimiento o estrés crónico variable (Westenbroek et al., 2003; Kovács et al., 2022; Urien & Bauer, 2022). Del mismo modo, otros estudios indicaron que exponer a los roedores a un ambiente novedoso o a la interacción social con un congénere desconocido también aumenta los niveles de expresión de Fos-C en distintas regiones como el bulbo olfatorio, amígdala, hipocampo dorsal y PVN (Perkins et al., 2017).

Otro resultado interesante de estos estudios es el claro dimorfismo sexual de la expresión de las proteínas Fos ante estresores. Se vieron mayores niveles de Fos-B en machos en el BNST, CeA, NAcc y el PVN respecto a las hembras (Westenbroek et al., 2003; Urien & Bauer, 2022). Sin embargo, se vió el resultado opuesto en el PVN y el núcleo oval del BNST en donde las hembras estresadas mostraron mayor número de células Fos-C positivas respecto a machos estresados (Sterrenburg et al., 2012). Esta evidencia muestra un dimorfismo sexual en la actividad neuronal basal y en respuesta al estrés y que dicho dimorfismo es dependiente del área cerebral en estudio.

Finalmente, otros trabajos evaluaron los efectos del AE sobre la expresión de las proteínas Fos-B y Δ Fos-B. Se observó que aplicar un protocolo de AE tras una exposición crónica de estrés por aislamiento social disminuye los niveles de neuronas Fos positivas en la BLA en comparación a los controles (Watanasriyakul et al., 2019). Otra investigación, en este caso aplicando un protocolo de estrés crónico de derrota social, obtuvo resultados similares: el AE disminuyó el número de células Fos-B y Δ Fos-B en el PVN, mientras que lo aumentó en el NAcc y en grupos de células de la amígdala con respecto a individuos que vivieron en un ambiente estándar o empobrecido (Lehmann & Herkenham, 2011). Esta evidencia

indicaría una potencial relación entre los distintos estímulos ambientales con la capacidad de respuesta celular ante estímulos externos, siendo una de las posibles causas de las variaciones comportamentales de los individuos observadas en nuestro estudio.

6. Conclusiones

En el presente estudio demostramos la existencia de un *dimorfismo sexual* en los comportamientos de roedores. Las hembras presentaron menos conductas similares a ansiedad y mayor exploración con respecto a los machos. Por otro lado, estas diferencias sexuales no se evidenciaron en la conducta social, ya que ambos sexos mostraron una preferencia por un congénere respecto a un objeto inerte.

Los agentes *estresores* tuvieron un efecto ansiolítico y promovieron la exploración de los roedores en las distintas pruebas conductuales.

El *AE gestacional* influyó sobre la conducta de la progenie, disminuyendo las conductas similares a ansiedad y promoviendo actividades exploratorias.

No existió un efecto mitigante del AE respecto a los tratamientos estresores. Por el contrario, existió una *sinergia entre el AE y la SM*, disminuyendo las conductas similares a ansiedad y promoviendo la exploración.

Finalmente, a priori las condiciones experimentales no impactaron en los niveles de actividad neural basal de la amígdala. Es por esto que se propone completar los tamaños muestrales para evaluar los niveles de actividad basal en las áreas neuronales evaluadas, analizar otras áreas implicadas en las conductas similares a ansiedad y realizar nuevos experimentos evaluando otros parámetros neurológicos como lo pueden ser la expresión de BDNF, IGF-1, neurogénesis o la densidad dendrítica en las áreas estudiadas para poder dilucidar las causas de los efectos comportamentales por parte del AE gestacional.

Referencias bibliográficas

- Abramova, O. V., Zubkov, E. A., Zorkina, Ya. A., Morozova, A. Yu., Pavlov, K. A., & Chekhonin, V. P. (2020). Social and Cognitive Impairments in Rat Offspring after

- Ultrasound-Induced Prenatal Stress. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 168(6), 730-733. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04790-0>
- Alomari, M. A., Khabour, O. F., Alzoubi, K. H., & Alzubi, M. A. (2013). Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels. *Behavioural Brain Research*, 247, 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.007>
- Altemus, M., Sarvaiya, N., & Neill Epperson, C. (2014). Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(3), 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.05.004>
- Alves, C. J., Magalhães, A., Melo, P., De Sousa, L., Tavares, M. A., Monteiro, P. R. R., & Summavielle, T. (2014). Long-term effects of chronic cocaine exposure throughout adolescence on anxiety and stress responsivity in a Wistar rat model. *Neuroscience*, 277, 343-355. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.008>
- An, X.-L., Zou, J.-X., Wu, R.-Y., Yang, Y., Tai, F.-D., Zeng, S.-Y., Jia, R., Zhang, X., Liu, E.-Q., & Broders, H. (2011). Strain and Sex Differences in Anxiety-Like and Social Behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ Mice. *Experimental Animals*, 60(2), 111-123. <https://doi.org/10.1538/expanim.60.111>
- Aspesi, D., & Choleris, E. (2022). Neuroendocrine underpinning of social recognition in males and females. *Journal of Neuroendocrinology*, 34(2). <https://doi.org/10.1111/jne.13070>
- Babaev, O., Piletti Chatain, C., & Krueger-Burg, D. (2018). Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0063-8>
- Baidoo, N., & Leri, F. (2022). Extended amygdala, conditioned withdrawal and memory consolidation. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 113, 110435. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110435>
- Bales, K. L., Pfeifer, L. A., & Carter, C. S. (2004). Sex differences and developmental effects of manipulations of oxytocin on alloparenting and anxiety in prairie voles. *Developmental Psychobiology*, 44(2), 123-131. <https://doi.org/10.1002/dev.10165>
- Bishnoi, I. R., Ossenkopp, K., & Kavaliers, M. (2021). Sex and age differences in locomotor and anxiety-like behaviors in rats: From adolescence to adulthood. *Developmental Psychobiology*, 63(3), 496-511. <https://doi.org/10.1002/dev.22037>

- Bonthuis, P. J., Cox, K. H., Searcy, B. T., Kumar, P., Tobet, S., & Rissman, E. F. (2010). Of mice and rats: Key species variations in the sexual differentiation of brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *31*(3), 341-358. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.05.001>
- Bridges, N., & Starkey, N. (2004). Sex differences in Mongolian gerbils in four tests of anxiety. *Physiology & Behavior*, *83*(1), 119-127. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(04\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(04)00328-2)
- Burke, A. R., McCormick, C. M., Pellis, S. M., & Lukkes, J. L. (2017). Impact of adolescent social experiences on behavior and neural circuits implicated in mental illnesses. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *76*, 280-300. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.018>
- Buwalda, B., Geerdink, M., Vidal, J., & Koolhaas, J. M. (2011). Social behavior and social stress in adolescence: A focus on animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *35*(8), 1713-1721. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.10.004>
- Corredor, K., Duran, J. M., Herrera-Isaza, L., Forero, S., Quintanilla, J. P., Gomez, A., Martínez, G. S., & Cardenas, F. P. (2022). Behavioral effects of environmental enrichment on male and female wistar rats with early life stress experiences. *Frontiers in Physiology*, *13*, 837661. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.837661>
- Crofton, E. J., Zhang, Y., & Green, T. A. (2015). Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *49*, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.017>
- D'Aquila, P. S., Brain, P., & Willner, P. (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology & Behavior*, *56*(5), 861-867. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90316-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90316-6)
- Dandi, E., Kalamari, A., Touloumi, O., Lagoudaki, R., Nousiopoulou, E., Simeonidou, C., Spandou, E., & Tata, D. A. (2018). Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *67*(1), 19-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.03.003>
- Daviu, N., Andero, R., Armario, A., & Nadal, R. (2014). Sex differences in the behavioural and hypothalamic–pituitary–adrenal response to contextual fear

- conditioning in rats. *Hormones and Behavior*, 66(5), 713-723. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.09.015>
- Domonkos, E., Hodosy, J., Ostatníková, D., & Celec, P. (2018). On the Role of Testosterone in Anxiety-Like Behavior Across Life in Experimental Rodents. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 441. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00441>
- Doreste-Mendez, R., Ríos-Ruiz, E. J., Rivera-López, L. L., Gutierrez, A., & Torres-Reveron, A. (2019). Effects of Environmental Enrichment in Maternally Separated Rats: Age and Sex-Specific Outcomes. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 198. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00198>
- Fox, A. S., & Shackman, A. J. (2019). The central extended amygdala in fear and anxiety: Closing the gap between mechanistic and neuroimaging research. *Neuroscience Letters*, 693, 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.056>
- Froemke, R. C., & Young, L. J. (2021). Oxytocin, Neural Plasticity, and Social Behavior. *Annual Review of Neuroscience*, 44(1), 359-381. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-102320-102847>
- González-Pardo, H., Arias, J. L., Vallejo, G., & Conejo, N. M. (2019). Environmental enrichment effects after early stress on behavior and functional brain networks in adult rats. *PLOS ONE*, 14(12), e0226377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226377>
- Graf, A., Murray, S. H., Eltahir, A., Patel, S., Hansson, A. C., Spanagel, R., & McCormick, C. M. (2023). Acute and long-term sex-dependent effects of social instability stress on anxiety-like and social behaviours in Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, 438, 114180. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114180>
- Guan, S., Fu, Y., Zhao, F., Liu, H., Chen, X., Qi, F., Liu, Z., & Ng, T. B. (2021). The mechanism of enriched environment repairing the learning and memory impairment in offspring of prenatal stress by regulating the expression of activity-regulated cytoskeletal-associated and insulin-like growth factor-2 in hippocampus. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 26(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12199-020-00929-7>
- Gubert, C., & Hannan, A. J. (2019). Environmental enrichment as an experience-dependent modulator of social plasticity and cognition. *Brain Research*, 1717, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.033>

- Harro, J. (2018). Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. *Behavioural Brain Research*, 352, 81-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.016>
- Hines, M. (2020). Neuroscience and Sex/Gender: Looking Back and Forward. *The Journal of Neuroscience*, 40(1), 37-43. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0750-19.2019>
- Hodges, T. E., Louth, E. L., Bailey, C. D. C. & McCormick C. M. (2018). Adolescent social instability stress alters markers of synaptic plasticity and dendritic structure in the medial amygdala and lateral septum in male rats. *Brain Struct Funct* 224, 643–659. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1789-8>
- Hok, V., Poucet, B., Duvelle, É., Save, É., & Sargolini, F. (2016). Spatial cognition in mice and rats: Similarities and differences in brain and behavior. *WIREs Cognitive Science*, 7(6), 406-421. <https://doi.org/10.1002/wcs.1411>
- Houwing, D. J., Staal, L., Swart, J. M., Ramsteijn, A. S., Wöhr, M., De Boer, S. F., & Olivier, J. D. A. (2019). Subjecting Dams to Early Life Stress and Perinatal Fluoxetine Treatment Differentially Alters Social Behavior in Young and Adult Rat Offspring. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 229. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00229>
- Hueston, C. M., Cryan, J. F., & Nolan, Y. M. (2017). Stress and adolescent hippocampal neurogenesis: Diet and exercise as cognitive modulators. *Translational Psychiatry*, 7(4), e1081-e1081. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.48>
- Hughes, R. N., & Otto, M. T. (2013). Anxiolytic effects of environmental enrichment attenuate sex-related anxiogenic effects of scopolamine in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 40, 252-259. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.10.009>
- Ivanova, N., Nenčovska, Z., Atanasova, M., Laudon, M., Mitreva, R., & Tchekalarova, J. (2022). Chronic Piromelatine Treatment Alleviates Anxiety, Depressive Responses and Abnormal Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis Activity in Prenatally Stressed Male and Female Rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 42(7), 2257-2272. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01100-8>
- Jarrar, Q., Ayoub, R., Alhussine, K., Goh, K. W., Moshawih, S., Ardianto, C., Goh, B. H., & Ming, L. C. (2022). Prolonged Maternal Separation Reduces Anxiety State and Increases Compulsive Burying Activity in the Offspring of BALB/c Mice.

- Journal of Personalized Medicine, 12(11), 1921.
<https://doi.org/10.3390/jpm12111921>
- Juruena, M. F., Eror, F., Cleare, A. J. & Young, A. H. (2020). The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety. In: *Anxiety Disorders: Rethinking and Understanding Recent Discoveries* (pp. 141-154). Springer Singapore.
<https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0>
- Keeley, R. J., Himmler, S. M., Pellis, S. M., & McDonald, R. J. (2021). Chronic exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol in adolescence decreases social play behaviours. *F1000Research*, 10, 1191.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.53891.1>
- Kempermann, G. (2019). Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(4), 235-245.
<https://doi.org/10.1038/s41583-019-0120-x>
- Knight, P., Chellian, R., Wilson, R., Behnood-Rod, A., Panunzio, S., & Bruijnzeel, A. W. (2021). Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 204, 173168.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173168>
- Kokras, N., Pastromas, N., Papasava, D., de Bournonville, C., Cornil, C. A., & Dalla, C. (2018). Sex differences in behavioral and neurochemical effects of gonadectomy and aromatase inhibition in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 87, 93-107. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.10.007>
- Kovács, L. Á., Füredi, N., Ujvári, B., Golgol, A., & Gaszner, B. (2022). Age-Dependent FOSB/ Δ FOSB Response to Acute and Chronic Stress in the Extended Amygdala, Hypothalamic Paraventricular, Habenular, Centrally-Projecting Edinger-Westphal, and Dorsal Raphe Nuclei in Male Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 862098.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.862098>
- Kraeuter, A.-K.; Guest, P.C.; Sarnyai, Z. The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents. In *Pre-Clinical Models. Methods in Molecular Biology*; Guest, P., Ed.; Humana Press: New York, NY, USA, 2019a; Volume 1916, pp. 56–74.
- Kraeuter, A.-K.; Guest, P.C.; Sarnyai, Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. In *Pre-Clinical Models. Methods in Molecular*

- Biology; Guest, P.C., Ed.; Humana Press: New York, NY, USA, 2019b; Volume 1916, pp. 99–103.
- Lebow, M. A., & Chen, A. (2016). Overshadowed by the amygdala: The bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, *21*(4), 450-463. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.1>
- Lehmann, M. L., & Herkenham, M. (2011). Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *31*(16), 6159–6173. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0577-11.2011>
- Lezak, K. R., Missig, G., & Carlezon Jr, W. A. (2017). Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *19*(2), 181-191. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/wcarlezon>
- Li, K. A., Lund, E. T., & Voigt, J. P. (2016). The impact of early postnatal environmental enrichment on maternal care and offspring behaviour following weaning. *Behavioural processes*, *122*, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.11.008>
- Luo, X.-M., Yuan, S.-N., Guan, X.-T., Xie, X., Shao, F., & Wang, W.-W. (2014). Juvenile stress affects anxiety-like behavior and limbic monoamines in adult rats. *Physiology & Behavior*, *135*, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.035>
- Lynch, C. A., Porter, B., & Butler, T. R. (2019). Access to voluntary running wheel exercise: Prevention of anxiety-like behavior in chronically stressed rats, but potentiation of ethanol intake/preference. *Physiology & Behavior*, *206*, 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.03.028>
- Maccari, S., Krugers, H. J., Morley-Fletcher, S., Szyf, M., & Brunton, P. J. (2014). The Consequences of Early-Life Adversity: Neurobiological, Behavioural and Epigenetic Adaptations. *Journal of Neuroendocrinology*, *26*(10), 707-723. <https://doi.org/10.1111/jne.12175>
- McCarthy, M. M., & Arnold, A. P. (2011). Reframing sexual differentiation of the brain. *Nature Neuroscience*, *14*(6), 677-683. <https://doi.org/10.1038/nn.2834>
- McCormick, C. M., & Green, M. R. (2013). From the stressed adolescent to the anxious and depressed adult: Investigations in rodent models. *Neuroscience*, *249*, 242-257. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.063>

- Menon, R., Süß, T., Oliveira, V. E. D. M., Neumann, I. D., & Bludau, A. (2022). Neurobiology of the lateral septum: Regulation of social behavior. *Trends in Neurosciences*, 45(1), 27-40. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.10.010>
- Mir, F. R., & Rivarola, M. A. (2022). Sex Differences in Anxiety and Depression: What Can (and Cannot) Preclinical Studies Tell Us? *Sexes*, 3(1), 141-163. <https://doi.org/10.3390/sexes3010012>
- Mir, F. R., Renard, G. M., & Rivarola, M. A. (2023). Parental Enriched Environment: A Look Through Key Temporary Windows. *Journal of Neuroendocrinology*, e13308. <https://doi.org/10.1111/jne.13308>
- Moradi-Kor, N., Dadkhah, M., Ghanbari, A., Rashidipour, H., Bandegi, A. R., Barati, M., Kokhaei, P., & Rashidy-Pour, A. (2020). Protective Effects of Spirulina platensis, Voluntary Exercise and Environmental Interventions Against Adolescent Stress-Induced Anxiety and Depressive-Like Symptoms, Oxidative Stress and Alterations of BDNF and 5HT-3 Receptors of the Prefrontal Cortex in Female Rats. *Neuropsychiatric Disease and Treatment, Volume 16*, 1777-1794. <https://doi.org/10.2147/NDT.S247599>
- Moreno-Martínez, S., Tendilla-Beltrán, H., Sandoval, V., Flores, G., & Terrón, J. A. (2022). Chronic restraint stress induces anxiety-like behavior and remodeling of dendritic spines in the central nucleus of the amygdala. *Behavioural Brain Research*, 416, 113523. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113523>
- Okudan, N., & Belviranlı, M. (2017). Long-term voluntary exercise prevents post-weaning social isolation-induced cognitive impairment in rats. *Neuroscience*, 360, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.045>
- Organización Mundial de la Salud. (s.f.). Mental disorders. Recuperado el 5 de junio de 2023, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>
- Palanza, P., Nagel, S. C., Parmigiani, S., & vom Saal, F. S. (2016). Perinatal exposure to endocrine disruptors: Sex, timing and behavioral endpoints. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 7, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.11.017>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed). Academic Press/Elsevier, San Diego.
- Pellis, S. M., Field, E. F., Smith, L. K., & Pellis, V. C. (1997). Multiple Differences in the Play Fighting of Male and Female Rats. Implications for the Causes and

- Functions of Play. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(1), 105-120.
[https://doi.org/10.1016/0149-7634\(95\)00060-7](https://doi.org/10.1016/0149-7634(95)00060-7)
- Perkins, A. E., Woodruff, E. R., Chun, L. E., Spencer, R. L., Varlinskaya, E., & Deak, T. (2017). Analysis of c-Fos induction in response to social interaction in male and female Fisher 344 rats. *Brain Research*, 1672, 113-121.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.07.022>
- Radley, J. J., & Morrison, J. H. (2005). Repeated stress and structural plasticity in the brain. *Ageing Research Reviews*, 4(2), 271-287.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.03.004>
- Said, N., Lakehayli, S., Battas, O., Hakkou, F., & Tazi, A. (2015). Effects of prenatal stress on anxiety-like behavior and nociceptive response in rats. *Journal of Integrative Neuroscience*, 14(02), 223-234.
<https://doi.org/10.1142/S0219635215500107>
- Sandi, C., & Haller, J. (2015). Stress and the social brain: Behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(5), 290-304.
<https://doi.org/10.1038/nrn3918>
- Santarelli, S., Lesuis, S. L., Wang, X.-D., Wagner, K. V., Hartmann, J., Labermaier, C., Scharf, S. H., Müller, M. B., Holsboer, F., & Schmidt, M. V. (2014). Evidence supporting the match/mismatch hypothesis of psychiatric disorders. *European Neuropsychopharmacology*, 24(6), 907-918.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.02.002>
- Scholl, J. L., Afzal, A., Fox, L. C., Watt, M. J., & Forster, G. L. (2019). Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiology & Behavior*, 211, 112670.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112670>
- Sisk, C. L., & Zehr, J. L. (2005). Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26(3-4), 163-174.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.10.003>
- Smith, C. J. W., Poehlmann, M. L., Li, S., Ratnaseelan, A. M., Bredewold, R., & Veenema, A. H. (2017). Age and sex differences in oxytocin and vasopressin V1a receptor binding densities in the rat brain: Focus on the social decision-making network. *Brain Structure and Function*, 222(2), 981-1006.
<https://doi.org/10.1007/s00429-016-1260-7>

- Stephens, Mary Ann & Wand, Gary. (2012). Stress and the HPA Axis: Role of Glucocorticoids in Alcohol Dependence.. *Alcohol research : current reviews*, 34, 468-83.
- Sterley, T.-L., & Bains, J. S. (2021). Social communication of affective states. *Current Opinion in Neurobiology*, 68, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.12.007>
- Sterrenburg, L., Gaszner, B., Boerrigter, J., Santbergen, L., Bramini, M., Roubos, E. W., Peeters, B. W. M. M., & Kozicz, T. (2012). Sex-dependent and differential responses to acute restraint stress of corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat paraventricular nucleus, central amygdala, and bed nucleus of the stria terminalis. *Journal of Neuroscience Research*, 90(1), 179-192. <https://doi.org/10.1002/jnr.22737>
- Tanner, M. K., Fallon, I. P., Baratta, M. V., & Greenwood, B. N. (2019). Voluntary exercise enables stress resistance in females. *Behavioural Brain Research*, 369, 111923. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111923>
- Thompson, S. M., Berkowitz, L. E., & Clark, B. J. (2018). Behavioral and neural subsystems of rodent exploration. *Learning and Motivation*, 61, 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.lmot.2017.03.009>
- Toth, I., & Neumann, I. D. (2013). Animal models of social avoidance and social fear. *Cell and Tissue Research*, 354(1), 107-118. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1636-4>
- Urakawa, S., Takamoto, K., Hori, E., Sakai, N., Ono, T., & Nishijo, H. (2013). Rearing in enriched environment increases parvalbumin-positive small neurons in the amygdala and decreases anxiety-like behavior of male rats. *BMC Neuroscience*, 14(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-13>
- Urien, L., & Bauer, E. P. (2022). Sex Differences in BNST and Amygdala Activation by Contextual, Cued, and Unpredictable Threats. *Eneuro*, 9(1), ENEURO.0233-21.2021. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0233-21.2021>
- von Bernhardi, R., Bernhardi, L. E., & Eugénin, J. (2017). What Is Neural Plasticity?. *Advances in experimental medicine and biology*, 1015, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_1
- Watanasriyakul, W. T., Normann, M. C., Akinbo, O. I., Colburn, W., Dagner, A., & Grippo, A. J. (2019). Protective neuroendocrine effects of environmental enrichment and voluntary exercise against social isolation: Evidence for

- mediation by limbic structures. *Stress*, 22(5), 603-618.
<https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1617691>
- Westenbroek, C., Den Boer J. A., Ter Horst G. J. (2003). Gender-specific effects of social housing on chronic stress-induced limbic fos expression. *Neuroscience*, 121, 189-199.
- Wirtshafter, H. S., & Wilson, M. A. (2021). Lateral septum as a nexus for mood, motivation, and movement. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 126, 544-559. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.029>
- Xiang, X., Huang, W., Haile, C. N., & Kosten, T. A. (2011). Hippocampal GluR1 associates with behavior in the elevated plus maze and shows sex differences. *Behavioural Brain Research*, 222(2), 326-331.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.068>
- Yin, S.-W., Meng, Y.-L., Li, C., & Wang, Y. (2022). Enriched environment for offspring improves learning and memory impairments induced by sevoflurane exposure during the second trimester of pregnancy. *Neural Regeneration Research*, 17(6), 1293. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.327347>
- Zeng, H., Yu, Z., Huang, Q., & Xu, H. (2021). Attachment Insecurity in Rats Subjected to Maternal Separation and Early Weaning: Sex Differences. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15, 637678.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.637678>
- Zuena, A. R., Zinni, M., Giuli, C., Cinque, C., Alemà, G. S., Giuliani, A., Catalani, A., Casolini, P., & Cozzolino, R. (2016). Maternal exposure to environmental enrichment before and during gestation influences behaviour of rat offspring in a sex-specific manner. *Physiology & Behavior*, 163, 274-287.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.05.010>