



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES  
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

# “Efectos a largo plazo del Estrés Crónico Variado durante la adolescencia en contraste con la adultez”

*La adolescencia, ¿período crítico para el desarrollo de vulnerabilidad al estrés?*

Tesinista: Scarponi Gómez, Antonela

Firma: .....

Directora: Dra. Cotella, Evelin Mariel

Firma: .....

Co-directora: Dra. Paglini, María Gabriela

Firma: .....



*Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC – CONICET- UNC)*

# “Efectos a largo plazo del Estrés Crónico Variable durante la adolescencia en contraste con la adultez”

*La adolescencia, ¿período crítico para el desarrollo de vulnerabilidad al estrés?*

Tribunal Examinador

Dra. Suarez, Marta Magdalena

Firma: .....

Dr. Marín, Raúl Héctor

Firma: .....

Dra. Rivarola, María Angélica

Firma: .....

**Calificación:** .....

**Fecha:** .....

***"El modo en que un hombre acepta su destino y todo el sufrimiento que éste conlleva, la forma en que carga con su cruz, le da muchas oportunidades —incluso bajo las circunstancias más difíciles— para añadir a su vida un sentido más profundo. Puede conservar su valor, su dignidad, su generosidad. O bien, en la dura lucha por la supervivencia, puede olvidar su dignidad humana y ser poco más que un animal. Aquí reside la oportunidad que el hombre tiene de aprovechar o de dejar pasar las ocasiones de alcanzar los méritos que una situación difícil puede proporcionarle. Y lo que decide si es merecedor de sus sufrimientos o no lo es."***

**"El hombre en busca de sentido"**

**Viktor Frankl**

**(Neurólogo, psiquiatra y sobreviviente en campos de concentración nazis)**

## **ÍNDICE**

<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<i>Concepto de estrés</i> .....	6
<i>Eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA)</i> .....	7
<i>Adolescencia</i> .....	8
<i>Adolescencia y estrés</i> .....	10
<i>Hipótesis</i> .....	11
<i>Objetivos</i> .....	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
<i>Animales de experimentación</i> .....	13
<i>Modelo de Estrés Crónico Variado</i> .....	13
<i>Comportamiento tipo ansiedad</i> .....	15
<i>Respuesta a un estresor agudo</i> .....	16
<i>Comportamiento tipo depresión/adaptación comportamental</i> .....	17
<i>Esquemas del diseño experimental</i> .....	18
<i>Análisis estadístico</i> .....	20
<b>RESULTADOS</b> .....	21
<i>Experimento 1</i> .....	21
<i>Experimento 2</i> .....	27
<b>CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN</b> .....	33
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	40
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	41

## **RESUMEN**

El término “estrés” es asociado popularmente con eventos y consecuencias negativas, con implicancias físicas y psicológicas aunque no hay justificación para afirmar que las respuestas al estrés suponen siempre un peligro la salud y/o el bienestar. Se sabe que la respuesta de estrés difiere según la etapa ontogenética en que se encuentra el individuo siendo la adolescencia, posiblemente, un período crítico para el desarrollo de vulnerabilidad a desórdenes psiquiátricos en el adulto.

Bajo la hipótesis de que la adolescencia es un período de particular vulnerabilidad al estrés, este trabajo tiene por objetivo determinar la especificidad de los efectos a largo plazo del estrés en este periodo. **Materiales y métodos:** se utilizó un modelo de estrés crónico variado (ECV) que consiste en la aplicación de diversos estresores de manera alternada durante un periodo de 2 semanas. Se usaron ratas macho adolescentes (PND40) y adultas (PND60) y se aplicaron 2 estresores diarios y 2 veces a la semana un estresor por la noche. Los controles se mantuvieron en condiciones normales de manipulación. Se dejaron recuperar por 5 semanas luego del ECV y luego fueron evaluados conductualmente usando el laberinto en cruz elevado y el test de nado forzado y la regulación de la respuesta de estrés a través de la determinación de los niveles de corticosterona y ACTH plasmáticas en respuesta a un estresor agudo. **Resultados:** los animales estresados en la adolescencia mostraron diferencias con respecto a sus controles en las pruebas de comportamiento mientras que en la respuesta a un estresor agudo no hubo diferencias significativas. Los animales estresados durante la etapa adulta difirieron de sus controles en la respuesta de estrés, en la que presentaron una hipersecreción de ambas hormonas mientras que en las pruebas de comportamiento no presentaron diferencias. **Conclusión:** el estrés crónico variado ejerce efectos diferenciales a largo plazo en las diferentes edades: las respuestas conductuales fueron fuertemente influenciadas por anteriores experiencias estresantes durante la adolescencia mientras que la respuesta hormonal sólo se afectó cuando las ratas se sometieron al estrés siendo adultos. Por lo tanto, las secuelas del estrés crónico pueden diferir con la edad en la que ocurren los eventos estresantes, siendo la etapa adolescente un periodo de resiliencia a la desregulación del eje hipotálamo hipófiso adrenal pero susceptible de modificar el comportamiento, presentando además, los animales estresados en la adolescencia, un fenotipo comportamental pasivo frente a nuevos eventos estresantes.

## **“Efectos a largo plazo del Estrés Crónico Variable durante la adolescencia en contraste con la adultez.”**

**Palabras claves:** Estrés; estrés crónico; alostasis; carga alostática; eje hipotálamo-hipófiso-adrenal; adolescencia, Modelo de Estrés Crónico Variable.

### **INTRODUCCIÓN**

#### **Estrés**

El concepto de estrés es una idea difícil de definir ya que vulgarmente se utiliza con frecuencia de manera vaga, incluyendo indistintamente tanto al agente que lo provoca como a la respuesta. Por lo tanto el concepto es una construcción multidimensional y compleja aunque parte de un principio básico: implica la alteración de un balance o equilibrio teórico dentro de los sistemas fisiológicos (Le Moal M., 2007). De manera más restrictiva Koolhaas R et al., 2011, postularon una revisión del alcance de este concepto, proponiendo que el término estrés se limita a condiciones en las que una demanda ambiental excede la capacidad reguladora natural de un organismo, en particular en situaciones que incluyen impredecibilidad e incontrolabilidad. Esta concepción coincide con la acepción vulgar en la que el término “estrés” es asociado popularmente con eventos y experiencias negativas que tienen implicancias físicas y psicológicas. Sin embargo, no hay justificación para afirmar que las respuestas al estrés suponen siempre un peligro para la salud y/o el bienestar. De hecho, la paradoja del estrés radica en la simultaneidad de su naturaleza adaptativa y sus posibles consecuencias de mala adaptación (Korte SM et al., 2005).

Para evitar esta confusión, Korte SM et al., 2005, incluyeron los conceptos de “alostasis” al cual definieron como el proceso adaptativo para mantener estabilidad frente a los cambios, y “carga alostática” que es el costo que esto genera para el organismo. A su vez, ellos introdujeron la importancia de la variabilidad inter-individual al mencionar que las condiciones ambientales pueden afectar las cargas alostáticas de los individuos de manera diferencial debido a que estos difieren unos de otros en sus cualidades de adaptación y limitaciones ya sea por su composición genética o por sus experiencias previas. Para Logan JG et al., 2008, los conceptos de alostasis y carga alostática introdujeron la idea de que los desafíos externos

inician los mecanismos de alostasis y el estrés crónico genera la carga alostática que se asocia, en sus estudios, con peores resultados para la salud.

El cerebro cumple el rol principal en regular el proceso de alostasis y esto incluye no solamente la puesta en marcha de los mecanismos endócrinos, nerviosos y comportamentales para afrontar el evento estresante, sino también utilizar la experiencia y la memoria existente sobre un hecho similar (Korte SM et al., 2005).

Para definir claramente el concepto de estrés que le da sentido a este trabajo, consideramos como estrés al conjunto de reacciones endocrinas, nerviosas y comportamentales que tienen como finalidad que el individuo retorne a la homeostasis que ha sido alterada por estresores, considerándolo también como una respuesta adaptativa frente a los cambios internos o ambientales que representan un riesgo para el individuo.

### Eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA)

En la respuesta de estrés de los mamíferos uno de los principales actores es el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA, de las siglas en inglés de Hypothalamic-Pituitary-Adrenal) (Engelmann M et al., 2004; De Kloet ER et al., 2005a; McEwen BS., 2007). Su respuesta comienza con la activación de la región parvicelular del núcleo paraventricular (NPV), donde las neuronas que sintetizan las hormonas liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP) liberan las mismas al torrente sanguíneo (Checkley S., 1996), constituyendo el inicio de la respuesta dependiente del eje HPA (De Kloet ER et al., 2005a). CRH y AVP tienen un efecto sinérgico en la hipófisis que promueve la liberación de la hormona adenocorticotrófica (ACTH) la cual estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides desde la corteza adrenal (cortisol en humanos y corticosterona en roedores).

Los efectos de los glucocorticoides a nivel periférico son variados: promueven la gluconeogénesis, el catabolismo proteico, la redistribución de las reservas de grasas y la glucogenólisis en interacción con las catecolaminas (De Kloet ER., 2002; Tsigos C y Chrousos GP., 2002; Carrasco GA., 2003; De Kloet ER et al., 2005a), disminuyen las reacciones inflamatorias durante la respuesta de estrés (Makino S., Gold PW et al., 2002; De Kloet ER et al., 2005 b) e inhiben el crecimiento y las funciones reproductivas (Makino S., Gold PW et al., 2002; Tsigos C y Chrousos GP., 2002).

Sin embargo la función que podría considerarse como la más relevante, debido a su importancia vital, se realiza a nivel del cerebro y es la regulación de la actividad basal del eje HPA (Tsigos C y Chrousos GP., 2002; De Kloet ER et al., 2005a) y la culminación de la respuesta de estrés (Makino S., Gold PW et al., 2002; De Kloet ER et al., 2005b) inhibiendo principalmente la síntesis y secreción de ACTH y CRH en hipófisis e hipotálamo correspondientemente (Dallman MF et al., 1992; Makino S y Gold PW et al., 2002) constituyendo un ciclo de retroalimentación negativa de la secreción de glucocorticoides. Este mecanismo ocurre principalmente a nivel del NPV, y otras áreas extra hipotalámicas como el hipocampo, la corteza prefrontal y la propia glándula pituitaria (Herman JP et al., 2003).

De esta manera, estas hormonas controlan la culminación de la respuesta de estrés y facilitan a su vez la habilidad del individuo para afrontar, adaptarse y recuperarse del estrés, favoreciendo los procesos de aprendizaje y memoria relacionados al hecho (De Kloet ER et al., 1998; De Kloet ER et al., 2005 a).

### Adolescencia

Para la Organización Mundial de la Salud la adolescencia es el período comprendido entre los 10 y 19 años y está delimitada dentro del período de la juventud (entre los 10 y los 24 años). En esta etapa de la vida ocurre un profundo remodelamiento del cerebro, el cual es requerido para lograr la madurez social y sexual (Spear LP., 2000).

Frecuentemente se ha discutido la validez de modelar en animales esta etapa madurativa que algunos autores consideran ser exclusivamente humana (Bogin B., 1994). Hay quienes consideran a la adolescencia como una construcción cultural y que los factores que la definen se encuentran íntimamente asociados al momento histórico-cultural de la sociedad y por lo tanto es una etapa intrínsecamente humana. Bajo esta mirada, Sierra N., 2014, plantea que al hablar de adolescencia, hay que hacerlo desde la pluralidad de fenómenos sociales, políticos y económicos a los cuales queda asociada en cada época en la historia de la humanidad. El adolescente se construye en la relación con el Otro social y al ir cambiando en la historia, el adolescente se define y se construye con las herramientas que la cultura le provee. Por lo tanto, estas concepciones de adolescencia quedan enfocadas en el hombre y su cultura, dificultando el uso de modelos animales que puedan incluir estas variables.

Sin embargo, a favor del uso de modelos animales, Spear LP., 2000, menciona tres características principales que tienen en común los mamíferos en general durante el periodo de transición de la infancia a la adultez. Éstos son: 1) disminución de la interacción con los progenitores, acompañado de aumento de agresividad dirigida hacia los mismos; 2) aumento de la interacción entre pares y 3) aumento en la exposición a situaciones riesgosas. Estas características del comportamiento representarían adaptaciones ontogenéticas para ayudar a los adolescentes a sobrevivir en el limbo entre niñez y la edad adulta (Oppenheim RW., 1981). De esta manera, durante esta transición, los individuos de una variedad de especies se enfrentan con desafíos como adquirir las habilidades necesarias para permitir la supervivencia lejos de los cuidados parentales (Spear LP., 2000).

En cuanto a desarrollo anatómico, hay datos que muestran que tanto en roedores, como en primates no humanos, regiones del cerebro como la corteza prefrontal y sus conexiones con el sistema límbico muestran una profunda reorganización durante esta etapa (Van Eden CG et al., 1990; Jernigan TL et al., 1991; Genazzani AD et al., 1997; Sowell ER et al., 1999).

Por el contrario, los investigadores que han argumentado que la adolescencia es únicamente humana sostienen que sólo los seres humanos experimentan esta etapa basándose en la conclusión de que sólo los adolescentes humanos muestran un brote de crecimiento (Bogin B., 1994). Sin embargo, otros han concluido que los brotes de crecimiento puberal son comunes entre las especies de mamíferos (Weisfeld GE., Billings RL., 1988).

Dadas las similitudes entre las especies de mamíferos, en cuanto a las características neurológicas, conductuales y de desarrollo durante la adolescencia, los modelos animales son en la actualidad ampliamente utilizados para los fines de modelado de la biología del desarrollo y de psicopatologías en humanos. Respecto a esto último, ciertamente, ningún modelo animal puede ser similar en todos los aspectos a la complejidad de la psicopatología humana o del comportamiento humano durante la adolescencia, pero en definitiva su validez es determinada por su utilidad en la expansión de la comprensión de fenómenos en investigación, la propagación de las hipótesis más comprobables y la generación de datos para refinar el modelo y evaluar más a fondo su validez (Spear LP., 2000).

Particularmente, en nuestro modelo animal de estudio, nos guiamos de acuerdo al rango de edad en que se espera que las ratas de ambos sexos exhiban

características neurocomportamentales típicas del adolescente. Este rango comprende normalmente entre los días postnatales 28 y 60 (Spear, LP., 2000), aún cuando otros autores consideran ya como adolescencia el mismo momento después del destete, a los 21 días de edad (McCormick et al., 2008).

### Adolescencia y estrés

Se sabe que la respuesta de estrés difiere según la etapa ontogenética en que se encuentra el individuo y dado que el cerebro adolescente se encuentra bajo un profundo proceso de remodelamiento, se hipotetiza que puede llegar a ser diferencialmente susceptible a estresores y a los efectos de los altos niveles de glucocorticoides. Esto se explicaría especialmente porqué la magnitud y la duración de la respuesta hormonal al estrés es drásticamente mayor en los adolescente (Romeo RD., 2010). Esto podría deberse a que en esta etapa se está produciendo la maduración puberal del eje HPA. Como consecuencia, se cree que los adolescentes presentan mayor sensibilidad a las alteraciones inducidas por el estrés en comparación con el adulto ya que los mecanismos de retroalimentación negativa del eje HPA aún no están tan desarrollados como en el adulto. Por lo tanto, se hipotetiza que esta respuesta de estrés exacerbada, en combinación con el activo desarrollo del cerebro definirían un contexto propicio para generar vulnerabilidad a los efectos del estrés (Romeo RD., 2010; Jankord R., Solomon MB et al., 2011). En humanos, se sabe que experiencias traumáticas durante el desarrollo del cerebro pueden asociarse con psicopatologías como depresión y función neuroendocrina alterada en la adultez (Oitzl MS., Champagne DL., van der Veen R y De Kloet ER., 2010). En particular, se cree que la adolescencia constituye uno los períodos críticos para el desarrollo de vulnerabilidad a desórdenes psiquiátricos en el adulto (Andersen SL y Teicher MH., 2008). Frecuentemente se ha asociado al estrés durante la adolescencia con el primer episodio de desorden mental (Goodyer IM., 2000; Patel V, Flisher A., Hetrick S., y McGorry P., 2007). A su vez, se ha reportado que individuos con historias de depresión en la adolescencia presentan luego un alto porcentaje de continuidad del trastorno depresivo en la edad adulta (Lewinsohn PM., Rohde P., Seeley JR., Klein DN., Gotlib IH., 2000). En este sentido, Aalto-Setälä et al., 2002, realizaron un meta-análisis sobre artículos que estudiaron la continuidad de estos trastornos en los adolescentes y los resultados indicaron que los pacientes que reportaron síntomas depresivos en la adolescencia predecían un

mayor riesgo de trastornos psiquiátricos y consumo de alcohol en la adultez temprana. Contrariamente, en los sujetos que no reportaron síntomas depresivos en la adolescencia el riesgo de presentar un trastorno depresivo en la adultez temprana fue tres veces menor que para aquellos que sí los habían reportado (Aalto-Setälä et al., 2002).

---

Diversos autores se han interesado por los efectos del estrés crónico en la adolescencia. Sin embargo, no hay muchos datos acerca de cuáles son los efectos a largo plazo que el mismo puede tener en la propia regulación de la respuesta de estrés y tampoco se ha estudiado si estos cambios son exclusivos del estrés crónico durante la adolescencia o si, por el contrario, son solamente efectos a largo plazo del mismo, independientemente de la edad de exposición de los animales.

Por lo tanto, el trabajo se centra en estudiar por un lado los efectos a largo plazo del estrés crónico variado (ECV) durante la adolescencia para luego evaluar los efectos a largo plazo del mismo modelo aplicado en la adultez. Dicho modelo de estrés ha sido ampliamente utilizado para estudiar los efectos de la exposición prolongada a glucocorticoides (Ulrich-Lai et al., 2006; Herman JP y Prewitt C., 1995; Cotella EM et al., 2009, 2013, 2014). El mismo consiste en la aplicación de diversos estresores de manera alternada durante un periodo prolongado, siendo algunos de los efectos mejor conocidos la desregulación de la respuesta de estrés medida como hipersecreción de corticosterona frente a un estresor agudo (Herman JP et al., 2003) y el incremento de la sensibilidad de la glándula adrenal en respuesta a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (Ulrich-Lai YM., Herman JP., 2009).

### Hipótesis

Considerando que la adolescencia es un activo período de plasticidad en los neurocircuitos que controlan la respuesta de estrés y que la regulación de la misma se encuentra aún en desarrollo, se considera que esta etapa constituye un periodo crítico de vulnerabilidad a los efectos del estrés crónico los cuales serán persistentes en la etapa adulta. Estos efectos serán específicos de la aplicación del estrés durante la adolescencia.

## Objetivos

El objetivo general del trabajo es contribuir con el conocimiento sobre los efectos a largo plazo del estrés durante la adolescencia. Siendo ésta una etapa del desarrollo en la que se ha sugerido una importancia crítica para el inicio de desórdenes psiquiátricos, en este trabajo se intenta caracterizar algunos aspectos básicos de los efectos del estrés crónico en un modelo animal. Estos resultados tienen potencial relevancia para futuros estudios de los aspectos neurobiológicos implicados en la patofisiología de dichos desórdenes.

Como objetivo específico, se planteó caracterizar los efectos a largo plazo del estrés crónico variado aplicado durante la adolescencia sobre los comportamientos tipo ansiedad y de adaptación frente a situaciones estresantes y la respuesta del eje HPA ante un estresor agudo. Como objetivo derivado, se planteó evaluar la especificidad de los efectos de este modelo de estrés en el desarrollo, caracterizando los efectos a largo plazo (mismo tiempo de incubación) cuando el modelo de estrés es aplicado durante la etapa adulta. Mediante la secuencia de experimentos se pretendió demostrar la especificidad de los efectos del estrés durante la adolescencia.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar derivadas de una colonia SPF (*libres de patógenos específicos*) criados y mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones médicas Mercedes y Martín Ferreyra INIMEC- CONICET. Los animales fueron mantenidos en condiciones constantes con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, a 22°C con acceso a agua y comida *ad libitum*.

Este trabajo se dividió en dos experimentos: el experimento 1 consistió en la aplicación del protocolo de estrés crónico variado durante dos semanas en un grupo de ratas durante la etapa adolescente, comenzando a los 40 días de edad. Los efectos sobre el comportamiento y la respuesta de estrés fueron luego evaluados cuando los animales llegaron a los 90 días de edad. Con el objetivo de dilucidar si los efectos observados son específicos en la adolescencia, el experimento 2 consistió en la aplicación del mismo protocolo en un grupo de ratas durante la etapa adulta, comenzando a los 60 días de edad, para luego evaluar las mismas variables a largo plazo, utilizando el mismo tiempo de incubación que en el experimento 1. De esta manera, los animales fueron evaluados comenzando a los 110 días de edad. Ambos experimentos incluyeron sus respectivos controles de la misma edad. En los adolescentes, elegimos comenzar el estrés el día postnatal 40 debido a las diferencias encontradas en el trabajo de Jankord R y Solomon MB., 2011, en el que se aplicó estrés en la adolescencia temprana y tardía y se observó que en la segunda etapa, los animales fueron más vulnerables a los efectos del estrés. Por otra parte, al aplicar el protocolo de estrés a esta edad en la que ya se ha completado la pubertad (Segupta P., 2013), nos permitió estudiar los efectos de estrés crónico independientemente de los cambios hormonales de la pubertad que indudablemente tendrían importantes interacciones con los cambios endocrinos provocados por el estrés.

### **Modelo de Estrés Crónico Variado**

Se utilizó el modelo de estrés crónico variado comúnmente utilizado por Herman JP et al., 2003, con la modificación que no se utilizaron inmovilización ni nado como estresores ya que estos serían utilizados luego durante la evaluación posterior del

comportamiento de tipo depresivo y de la respuesta endocrina a un estresor agudo. Se aplicaron 2 estresores diarios durante 2 semanas. Los mismos se aplicaron uno por la mañana y otro por la tarde, evitando repetir siempre el mismo horario y el mismo estresor en los días contiguos para promover la impredecibilidad que es un aspecto clave en este tipo de protocolos. Además, dos veces a la semana se agregó un estresor por la noche. Los tipos de estresores fueron elegidos de un listado de estresores provisto por el doctor Herman que fueron validados como estresores agudos (capaces de generar incremento de corticosterona 30 minutos luego de su aplicación). El protocolo final consiste en una mezcla de estresores de tipo físico, sistémico, psicológico y social.

Los estresores que se emplearon fueron:

Hipoxia: consistió en colocar a los animales en una caja de alojamiento, adaptada para poder ser cerrada casi herméticamente mediante una tapa de Plexiglás transparente que consta de un orificio central a través del cual se conectó una manguera por la que se inyectó una mezcla de 8%O<sub>2</sub> y 92%N durante 30 minutos.

Agitación: La caja de alojamiento fue colocada sobre un agitador orbital a 100 rpm durante 1 hora.

Exposición a frío: Se colocaron los animales en grupos de 4 o 6 dentro de cajas de alojamiento de ratón (15 x 25 cm) , dentro de una heladera con sistema de ventilación. La temperatura fue establecida entre 8 y 10°C y la duración del estresor fue de una hora.

Inyección de Litio: Consistió en la aplicación de inyecciones intraperitoneales de una solución con litio en solución fisiológica (1.5 M LiCL, 2% vol/ peso corporal del animal).

Exposición a ambiente novedoso: Se colocaron los animales en un espacio circular comúnmente utilizado para evaluar la actividad en campo abierto de 30 cm de diámetro de material transparente, en el suelo de una habitación de experimentación, durante 5 minutos. Este estresor se repitió 3 veces, la primera vez el animal solo fue expuesto al ambiente novedoso, mientras que las siguientes veces se incluyeron distintos objetos en el suelo para promover la característica de ser un estímulo novel.

Alojamiento individual en espacio reducido: los animales se colocaron durante 2 horas en una caja metabólica (12 x 20 cm) con paredes y pisos de malla metálica.

Shock eléctrico: los animales fueron colocados en una caja de condicionamiento e inmediatamente fueron sometidos a un shock eléctrico (1mA, 1s).

Los estresores utilizados durante la noche fueron:

Hacinamiento: se colocaron hasta 10 animales provenientes de distintos grupos de alojamiento en una misma caja durante toda la noche.

Aislamiento individual en cajas nuevas: Los animales fueron alojados individualmente en una nueva caja durante la noche.

Los animales control sólo fueron mantenidos en condiciones normales de manipulación para limpieza y mantenimiento de las cajas.

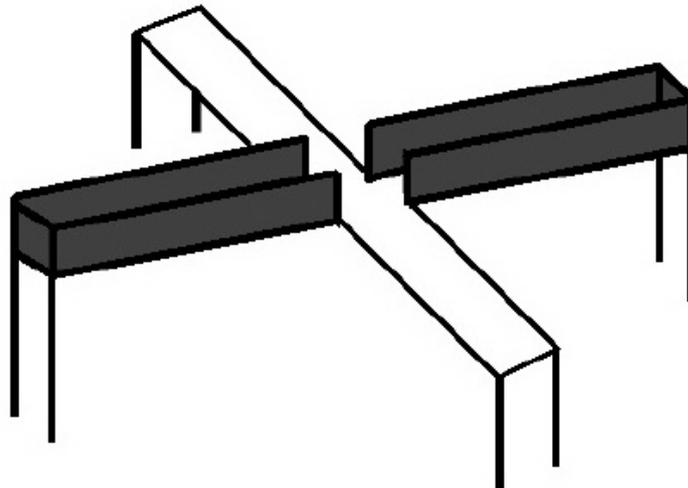
### **Comportamiento tipo ansiedad**

Para evaluar esta conducta se utilizó el laberinto en cruz elevado. El mismo consiste en una plataforma en forma de cruz de material plástico, elevada 50 centímetros del suelo. La misma presenta dos de sus brazos abiertos (sin paredes laterales, sólo pasarela) y los dos brazos restantes son cerrados (con paredes laterales cubriendo los bordes de la pasarela), ambos tipos de brazos de 7,5 cm. de ancho. El fundamento de esta evaluación radica en que la situación a la que es expuesto el animal presenta un conflicto entre el instinto de explorar un espacio nuevo y la aversión natural a los espacios abiertos y elevados, convirtiéndose en un test apto para el análisis de los niveles de ansiedad a través de parámetros como la entrada a los brazos abiertos y el porcentaje de tiempo en ellos (Handley SL y McBlane JW., 1993).

Para ello, se registró cada vez que el animal entró a los brazos abiertos o cerrados. Luego se calcularon los índices de ansiedad a través del  $\text{Porcentaje de tiempo en brazos abiertos} = \frac{\text{Tiempo en brazos abiertos}}{\text{Total tiempo Brazos abiertos+cerrados}} \times 100$  y  $\text{Porcentaje de entradas en brazos abiertos} = \frac{\text{Entradas en brazos abiertos}}{\text{entradas totales}} \times 100$ . Se consideró como entrada cuando el animal pasó dos tercios de su cuerpo de un espacio al otro. El tiempo total de la evaluación fue

de cinco minutos. Los animales fueron evaluados entre el mediodía y las primeras horas de la tarde.

La actividad de las ratas fue capturada mediante una video cámara de modo que el comportamiento pudo ser analizado posteriormente de manera ciega.



**Figura 1:** imagen ilustrativa de un laberinto en cruz elevado, con dos de sus brazos cerrados (negros) y los otros dos abiertos (blancos).

## **Respuesta de estrés**

### **Colección de muestras de sangre**

Luego de ser evaluados en el test de laberinto en cruz elevado, se esperó 5 días luego de los cuales los animales se sometieron a un estresor agudo y se tomaron muestras seriadas de sangre para la determinación de la actividad del eje HPA durante la respuesta de estrés mediante la detección de los niveles de corticosterona y ACTH. Las muestras de sangre se tomaron mediante la técnica de “tail clip” comenzando a las nueve de la mañana, asegurándose de terminar el experimento antes del mediodía. Esta técnica consiste en hacer un pequeño corte en la punta de la cola (no más de 2 mm) para extraer la sangre por goteo y recogerla en un tubo de centrifugación. El animal fue colocado en un inmovilizador cilíndrico de plástico por 30 min. La primer muestra se tomó dentro de los primeros tres minutos de inmovilizado el animal para poder reflejar los niveles basales de las hormonas, antes de que estas comiencen a ser secretadas en respuesta al estresor. Luego se tomaron a los 30, 60 y 120 minutos posteriormente. Para las muestras posteriores a la inmovilización (aquellas correspondientes a los 60 y 120 minutos),

las tomas fueron realizadas entre dos personas. Para ello, el animal fue rápidamente colocado dentro de un paño e inmovilizado por uno de los investigadores mientras otra persona tomó la muestra en menos de 3 minutos (Oitz MS et al., 2010). El animal volvió a su caja después de cada extracción.

De esta manera se puede obtener sangre para la posterior determinación de la secreción de hormonas relacionadas al estrés antes de que estas se secreten en respuesta a un estímulo (punto basal, toma 1), durante la respuesta de estrés (toma 2) y durante la fase de recuperación (toma 3 y 4) mientras ya están nuevamente en su caja. Es importante recalcar que las tomas no duraron más de 3 minutos para no provocar molestias al animal que generen una nueva respuesta de estrés.

### **Detección de corticosterona y ACTH**

Una vez obtenidas las cuatro muestras por cada animal, se centrifugaron a 1500 rpm, durante 15 minutos y a 4°C, se extrajo el plasma y se lo dividió en dos; una alícuota fue utilizada para el análisis de ACTH por electroquimioluminiscencia usando el kit comercial IMMULITE®1000 ACTH, solid-phase, two-site sequential chemiluminescent immunometric assay (DPC Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). La otra alícuota fue utilizada para el análisis de los niveles de corticosterona por radioinmunoensayo a través del kit ImmuChem Double Antibody Corticosterone I<sup>125</sup> RIA (CN Biomedicals, Costa Mesa, CA) acorde a las especificaciones de los fabricantes. Las muestras fueron mantenidas a - 20°C hasta que fueron procesadas por el bioquímico Cristian Hansen M.P. 3590 especialista en toxicología y bioquímica legal.

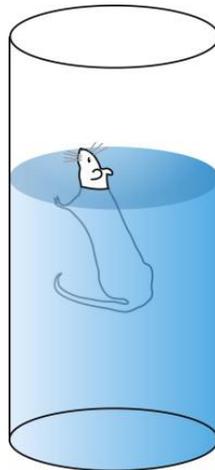
### **Adaptación comportamental en un test de nado forzado**

Cinco días después de las extracciones de sangre se llevó a cabo el test de nado forzado (FST de las siglas en inglés *forced swim test*), durante las primeras horas de la tarde.

Las ratas fueron puestas a nadar individualmente en cubas de plexiglás (80 centímetros de alto). La temperatura del agua fue de 29 +/- 2°C. Las cubas se llenaron a un nivel que impedía que los animales tocaran el fondo pero a su vez no fuera lo suficientemente alto para que pudieran escapar por la parte superior.

Una vez colocados en las cubas se registró en videos para luego analizar el comportamiento de los animales durante la prueba. La forma de medir el

desempeño de los animales fue por muestreo. Cada 5 segundos se determinó cuál de las conductas (nadar, trepar, o inmovilidad, es decir, flotar sin movimiento mayor que el necesario para mantener el flote y la estabilidad) el animal estaba llevando a cabo. El test duró diez minutos y los resultados se expresaron en % del total de posibilidades en el muestreo (en 1 minuto, 6 muestras; en 10, 120). Este modelo se utilizó para determinar si los animales que fueron previamente sujetos a estrés, adoptan más rápidamente un comportamiento inmóvil. Típicamente, el tiempo total empleado en inmovilidad y/o la duración de tiempo hasta la transición del comportamiento activo al comportamiento pasivo son los parámetros más comúnmente analizados para esta prueba (Slatery DA., Cryan JF., 2012). Esta conducta de flotación clásicamente se ha considerado como un comportamiento de tipo depresivo. Sin embargo, recientemente se ha comenzado a discutir la validez de esta interpretación dado que más que un comportamiento representativo de una patología, esta conducta estaría reflejando una estrategia de adaptación de los animales tendiente a mejorar la conservación de la energía de los animales y así las probabilidades de supervivencia del individuo (de Kloet ER y Molendijk ML., 2016).

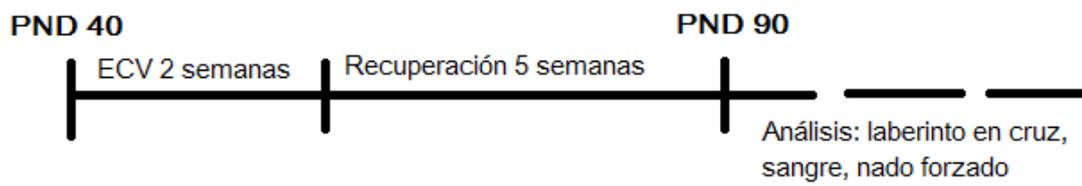


**Figura 2:** imagen ilustrativa del test de nado forzado.

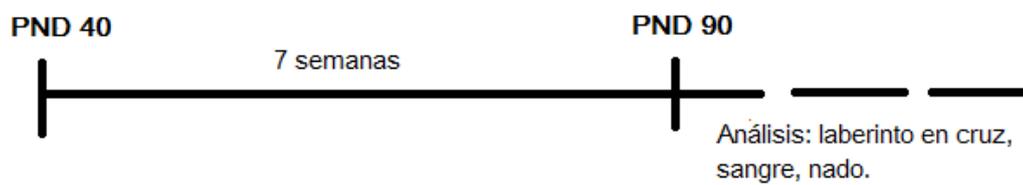
### **Esquemas del diseño experimental:**

#### **a) Experimento 1: Efectos a largo plazo del ECV en la adolescencia**

ECV

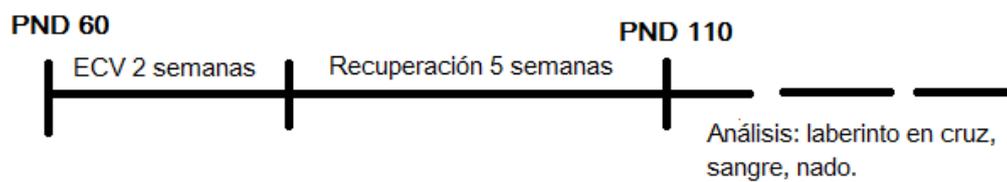


CONTROL

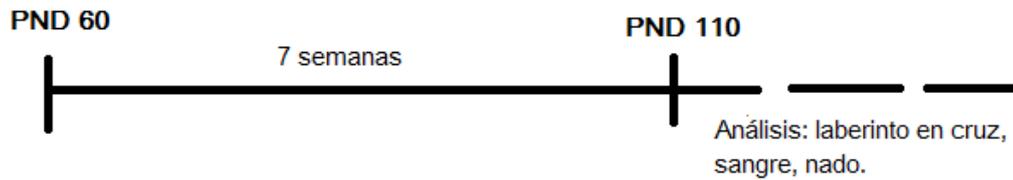


b) Experimento 2: Efectos a largo plazo del ECV en la adultez

ECV



## CONTROL



**Figura 3.** Esquemas del diseño experimental para estresados en la adolescencia para controles y estresados (a) y para estresados en la adultez, tanto para controles como estresados (b).

### **Análisis estadísticos**

Los resultados de los experimentos planteados anteriormente fueron analizados mediante los programas STATISTICA 7.0 e INFOSTAT. Para el análisis de los resultados del Laberinto en Cruz Elevado se utilizó un análisis de la varianza (ANAVA) a una vía para cada etapa (adolescencia y adultez) con un nivel de significación  $p < 0,05$ .

Para la respuesta del eje HPA (niveles de hormonas) se utilizó un ANOVA de medidas repetidas. Los factores establecidos fueron “estrés” y “tiempo”, con sus respectivos niveles y un nivel de significación  $p < 0,05$ .

A posteriori, se realizó un Test de Tukey en aquellos casos donde se encontraron diferencias significativas.

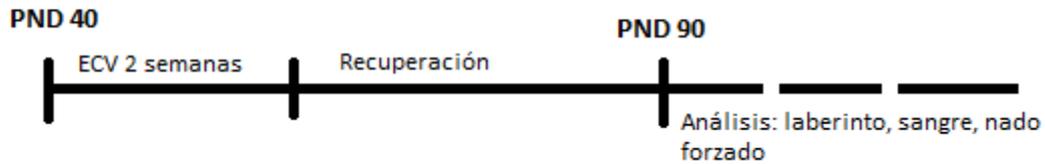
Para el Test de Nado Forzado se utilizó ANOVA y ANOVA de medidas repetidas para evaluar tanto el valor total de cada comportamiento, como así también la progresión temporal de los mismos durante la realización de la prueba.

En los casos que no se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza los datos fueron transformados a rangos.

## RESULTADOS:

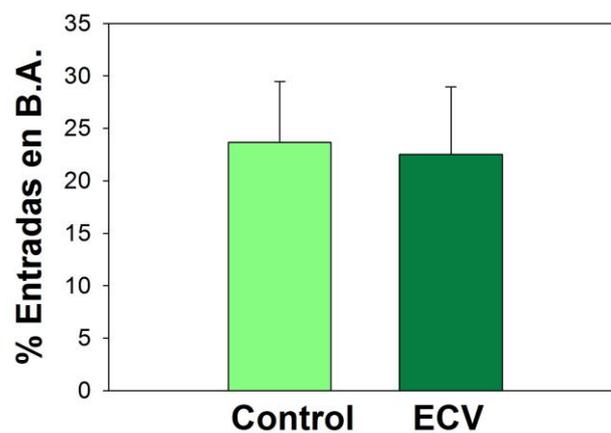
### EXPERIMENTO 1

#### Efectos a largo plazo del estrés en la adolescencia:



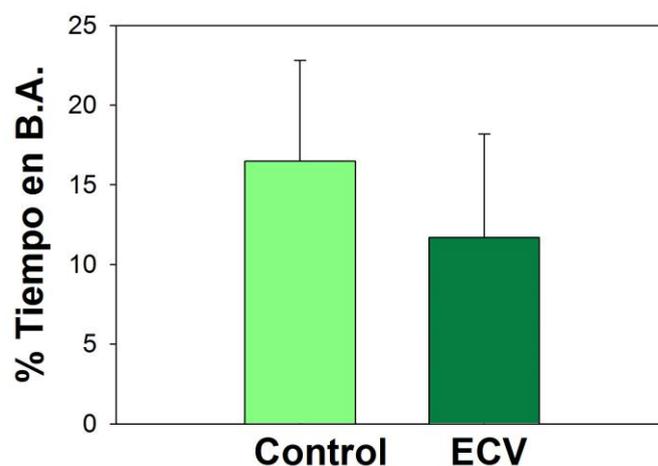
#### 1) *Comportamiento tipo ansiedad*

- Considerando el *porcentaje de entradas a los brazos abiertos*, el análisis de la varianza no presentó diferencias significativas entre estresados y controles ( $F_{1, 17} = 0,02$ ;  $p=0,90$ ). Esto indica que la condición de estrés durante la adolescencia, a largo plazo, no generó diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de entradas a los brazos abiertos del laberinto con respecto a aquellos sin experiencias estresantes en ese período. (Figura 4)



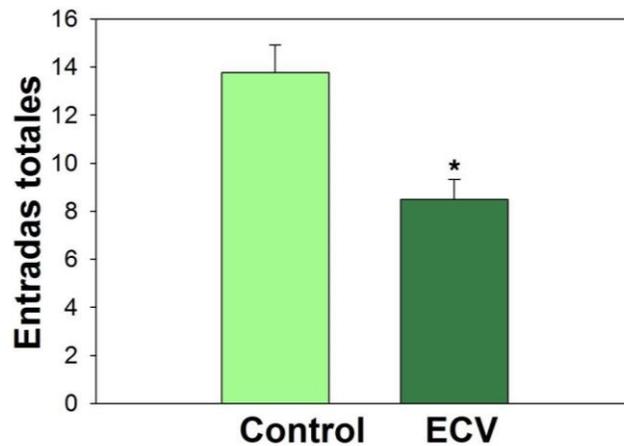
**Figura 4.** Porcentaje de entradas en brazos abiertos en 5 minutos de evaluación en el laberinto en cruz elevado en los animales sometidos a ECV en la adolescencia y evaluados en la adultez vs. sus respectivos controles. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

- Considerando la variable *porcentaje de tiempo en los brazos abiertos*, el análisis estadístico no mostró tampoco diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{1, 17} = 1, 06$ ;  $p=0,32$ ) (Figura 5). Por lo tanto, la experiencia estresante durante la adolescencia no determinó a largo plazo diferencias en los índices de ansiedad.



**Figura 5.** Porcentaje de tiempo en brazos abiertos en 5 minutos de evaluación en el laberinto en cruz elevado en los animales sometidos a ECV en la adolescencia y evaluados en la adultez vs. sus respectivos controles. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

- Al analizar el *total de entradas*, se encontraron diferencias significativas entre estresados y controles ( $F_{1, 17} = 7, 23$ ;  $p=0,016$ ), siendo menor el total de entradas en los estresados. Es decir que, si bien no presentan diferencias significativas en el porcentaje de entradas y tiempo en los brazos abiertos, sí presentan menor movilidad y/o exploración del laberinto. (Figura 6)

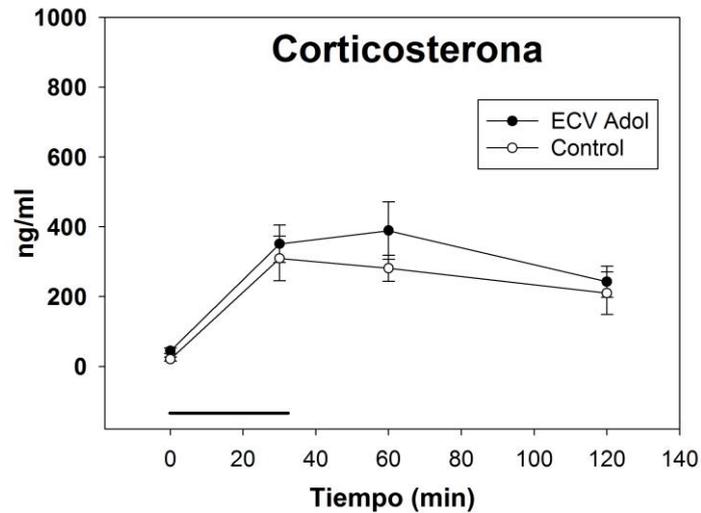


**Figura 6.** Total de entradas en los brazos en 5 minutos de evaluación en el laberinto en cruz elevado en los animales sometidos a ECV en la adolescencia y evaluados en la adultez vs. sus respectivos controles . Los datos se presentan como media  $\pm$ EE. \*  $p < 0,05$ .

## 2) Respuesta del eje HPA a un estresor agudo:

### Corticosterona:

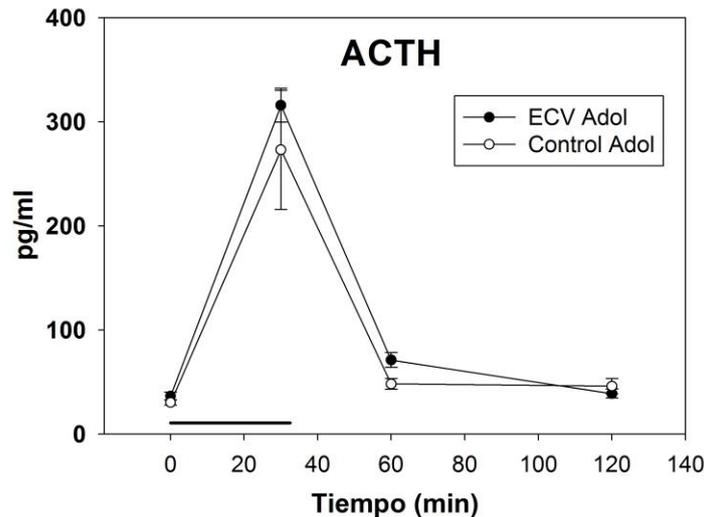
- El análisis de la varianza de medidas repetidas para esta hormona considerando los factores tratamiento con sus dos niveles (estrés y control) y tiempo con sus cuatro niveles (0, 30, 60, 120 minutos), no mostró efecto del tratamiento ( $F_{1,18} = 1,41$ ;  $p = 0,24$ ) ni interacción significativa entre este y el tiempo ( $F_{1,54} = 0,33$ ;  $p = 0,80$ ). Es decir que a lo largo del tiempo no hay diferencias en la secreción de esta hormona, lo que puede observarse en la figura 7. Por lo tanto, estresados como controles tuvieron una respuesta de estrés similar frente a un estresor agudo, sin mostrar desregulación del eje HPA.



**Figura 7.** Concentración de corticosterona (ng/ml) a lo largo del tiempo luego de un estresor agudo (inmovilización 30 min, representada por la barra horizontal) de los animales estresados en la adolescencia (ECV adol) y evaluado en el adulto vs. sus respectivos controles. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

### ACTH:

- El análisis de la varianza de medidas repetidas para esta hormona tampoco arrojó efecto significativo para el tratamiento ( $F_{1,17} = 0,94$ ;  $p=0,35$ ) ni para la interacción con el tiempo ( $F_{1,51} = 0,48$ ;  $p=0,7$ ) (Figura 8). Esto muestra que al igual que la respuesta de corticosterona, tanto los animales estresados en la adolescencia como sus respectivos controles no tuvieron diferencias en la secreción de esta hormona.

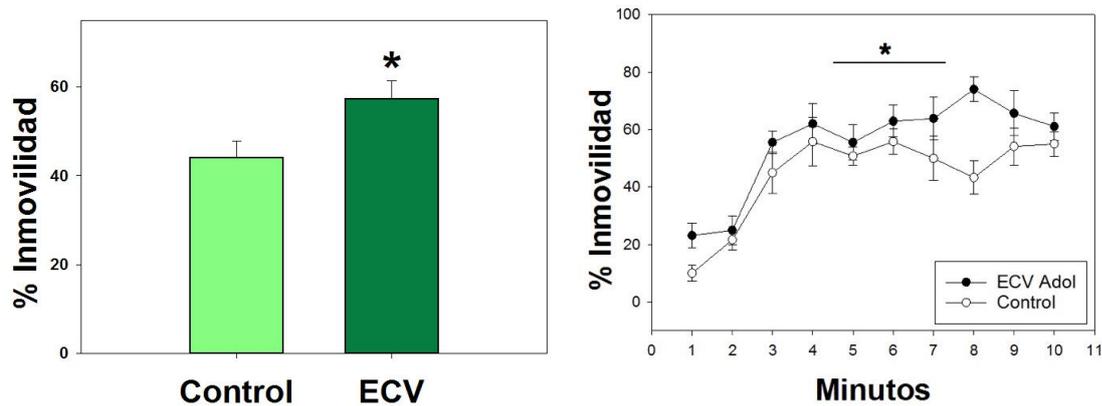


**Figura 8.** Concentración de ACTH (pg/ml) a lo largo del tiempo luego de un estresor agudo (inmovilización 30 min, representada por la barra horizontal) de los animales estresados en la adolescencia (ECV adol) y evaluados en el adulto vs. sus respectivos controles. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

### 3) Adaptación comportamental en el test de nado forzado

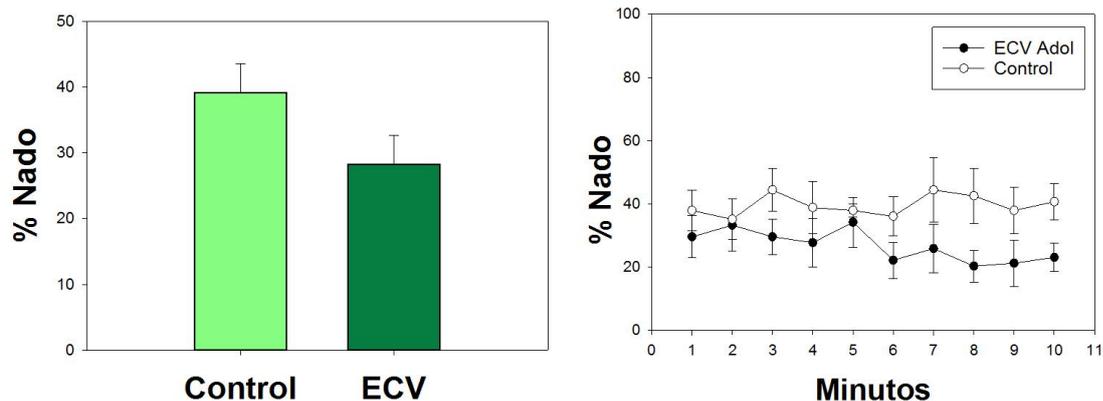
- Al analizar el porcentaje total de inmovilidad que los animales estresados en la adolescencia desplegaron durante el test de nado forzado, el tratamiento tuvo un efecto significativo ( $F_{1,17} = 6,02$ ;  $p = 0,025$ ), presentando los animales estresados un mayor porcentaje de inmovilidad durante todo el test conductual (Figura 9, panel izquierdo). Esto es coincidente con lo que clásicamente se considera comportamiento de tipo depresivo y que en la actualidad se denomina alternativamente adaptación conductual pasiva frente a una situación adversa. Por otro lado, cuando se evaluó la respuesta de los animales a lo largo de los diez minutos que duró la evaluación, si bien se observa nuevamente el efecto principal del tratamiento ( $F_{1,17} = 5,11$ ;  $p = 0,04$ ), no se observó interacción con el factor tiempo ( $F_{1,153} = 1,29$ ;  $p = 0,244$ ) (Figura 9). Sin embargo, es importante destacar que cuando se observa la respuesta de los animales a lo largo de la duración de la evaluación, los perfiles de ambos grupos comienzan a separarse visiblemente solo después de transcurrida la primera mitad del tiempo. Esto sugeriría que los animales no presentaron diferencia en su conducta a instancias iniciales del test de

comportamiento y que luego, a medida que van aprendiendo de la situación adversa inescapable, adoptan distintas estrategias de adaptación.



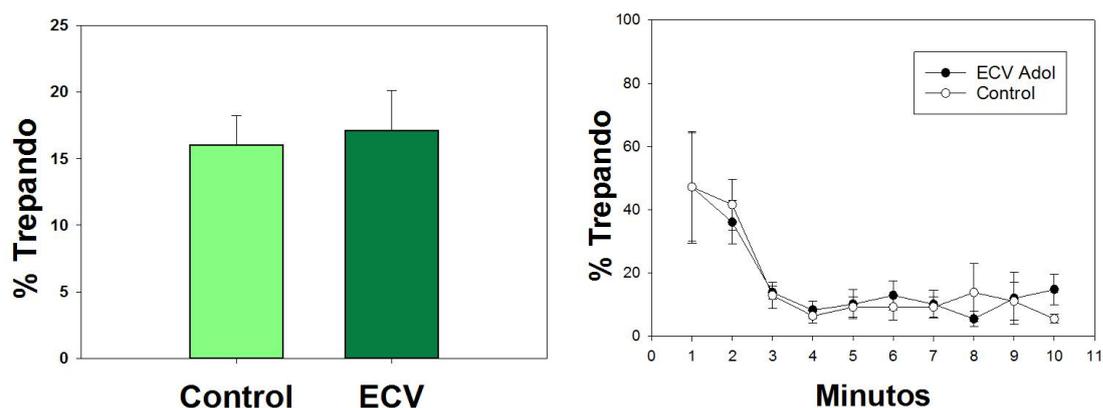
**Figura 9.** Porcentaje de inmovilidad en el test de nado forzado de los animales estresados en la adolescencia (ECV adol) y evaluados en el adulto y sus respectivos controles. Panel Izquierdo: Porcentaje total luego de 10 minutos de evaluación. Panel derecho: Porcentaje a lo largo del tiempo. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE. \*  $p < 0,05$ .

- Respecto al porcentaje de nado, el análisis de la varianza no reveló diferencias en el porcentaje total ( $F_{1,17} = 3,07$ ;  $p = 0,097$ ) ni en la respuesta durante los 10 minutos de evaluación Tratamiento ( $F_{1,17} = 2,77$ ;  $p = 0,11$ ), Tratamiento x Tiempo ( $F_{1,153} = 0,86$ ;  $p = 0,56$ ) (Figura 10). En este caso, al igual que con la inmovilización, se puede observar cómo se separan a lo largo del tiempo los perfiles de comportamiento entre los dos grupos, manteniendo los controles un nivel similar de este comportamiento a lo largo del tiempo, mientras que en los estresados se puede observar cómo la frecuencia de este comportamiento disminuye a medida que pasa el tiempo, de nuevo apoyando la idea de una adaptación pasiva frente a la situación.



**Figura 10.** Porcentaje de nado en el test de nado forzado de los animales estresados en la adolescencia (ECV adol) y evaluados en el adulto y sus respectivos controles. Panel Izquierdo: Porcentaje total luego de 10 minutos de evaluación. Panel derecho: Porcentaje a lo largo del tiempo. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

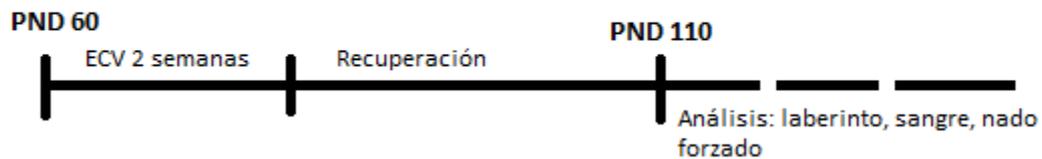
- Considerando el comportamiento de trepar las paredes de la cuba de agua, no se observaron diferencias en la respuesta total ( $F_{1,17} = 0,15$ ;  $p = 0,7$ ) ni en la respuesta en el tiempo: Tratamiento ( $F_{1,17} = 0,15$ ;  $p = 0,7$ ) ; Tratamiento x Tiempo ( $F_{1,153} = 0,58$ ;  $p = 0,81$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Porcentaje de escape activo (trepar las paredes) en el test de nado forzado de los animales estresados en la adolescencia (ECV adol) y evaluados en el adulto y sus respectivos controles. Panel Izquierdo: Porcentaje total luego de 10 minutos de evaluación. Panel derecho: Porcentaje a lo largo del tiempo. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

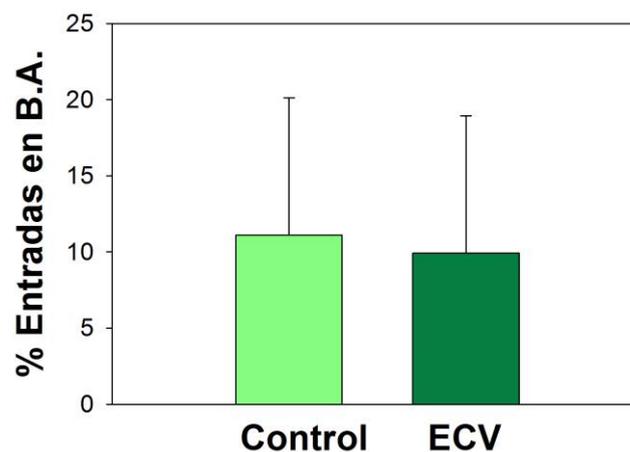
## EXPERIMENTO 2

### Efectos a largo plazo del estrés en la adultez:



#### 1) *Comportamiento tipo ansiedad*

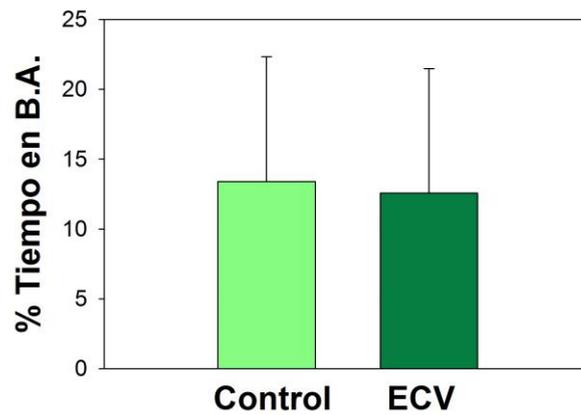
- Al analizar el *porcentaje de entradas a los brazos abiertos* el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre estresados y controles ( $F_{1, 20} = 0,0014$ ;  $p=0,97$ ). Por lo tanto, no hubo efecto a largo plazo del estrés experimentado en la etapa adulta en este índice de ansiedad (Figura 12 )



**Figura 12.** Porcentaje de entradas en los brazos abiertos en 5 minutos de evaluación en el laberinto en cruz elevado en los animales sometidos a ECV en la adultez y evaluados 5 mas semanas más tarde. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

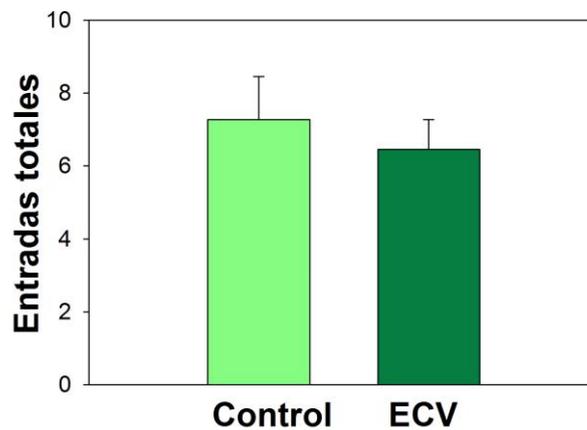
- En cuanto al análisis de la varianza para el *porcentaje de tiempo en los brazos abiertos*, tampoco se observaron diferencias entre ambos tratamientos

( $F_{1, 20} = 0,03$ ;  $p=0,85$ ), de igual manera que ocurrió en experimento 1. (Figura 13)



**Figura 13.** Porcentaje de tiempo en los brazos en 5 minutos de evaluación en el laberinto en cruz elevado en los animales sometidos a ECV en la adultez y evaluados 5 semanas más tarde. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

- Respecto al *total de entradas*, los animales que fueron estresados en la etapa adulta no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{1, 20} = 0,32$ ;  $p=0,5769$ ). (Figura 14)

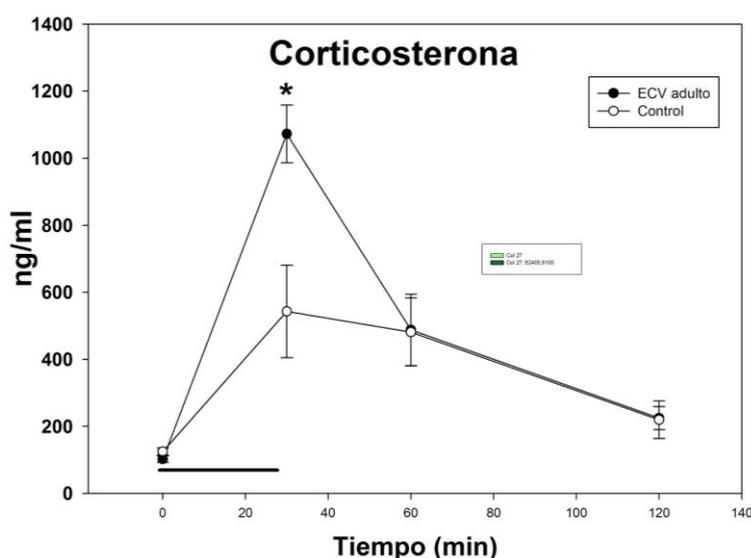


**Figura 14.** Total de entradas en los brazos en 5 minutos de evaluación en el laberinto en cruz elevado en los animales sometidos a ECV en la adultez y evaluados 5 semanas más tarde. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

## 2) Respuesta del eje HPA a un estresor agudo

## Corticosterona:

- El análisis de la varianza de medidas repetidas para esta hormona mostró un efecto principal del tratamiento ( $F_{1, 19} = 4,98$ ;  $p=0,04$ ) y efecto de la interacción entre éste y el tiempo ( $F_{1, 57} = 4,23$ ;  $p=0,009$ ). El análisis post hoc demostró que ambos tratamientos difieren en la concentración de corticosterona que se registró a los 30 minutos ( $p<0,05$ ) de comenzado el estresor. Este momento es cuando se considera que ocurre el pico de secreción de esta hormona luego de iniciada la respuesta de estrés (Figura 15).

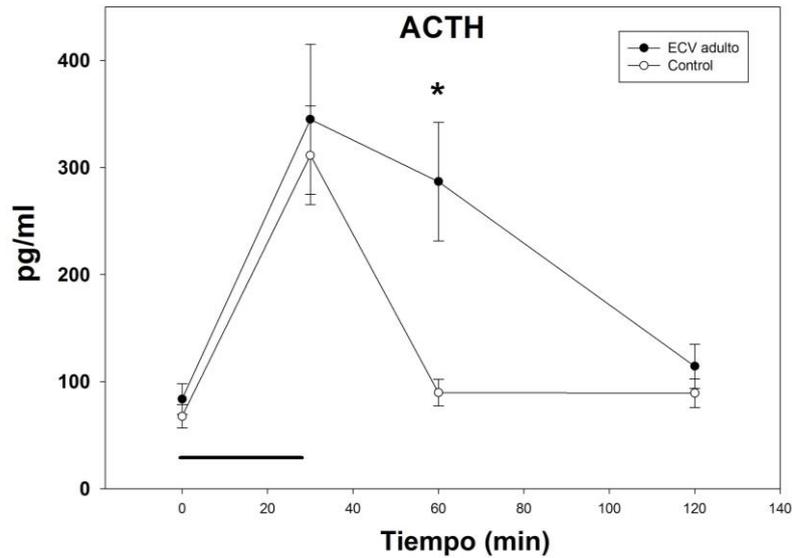


**Figura 15.** Concentración de corticosterona (ng/ml) a lo largo del tiempo luego de un estresor agudo (inmovilización 30 min, representada por la barra horizontal) de los animales estresados en la etapa adulta (ECV adulto) y evaluados 5 semanas más tarde y sus respectivos controles. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE. \*  $p<0,05$ .

## ACTH:

- Al observar la respuesta de secreción de ACTH en el tiempo, si bien el tratamiento no tuvo efecto principal ( $F_{1, 19} = 3,82$ ;  $p=0,07$ ), el efecto de la interacción entre éste y el tiempo fue estadísticamente significativa ( $F = 3,20$ ;  $p=0,03$ ) y el análisis a posteriori indicó una diferencia significativa ( $p<0,05$ ) entre los grupos a los 60 minutos de iniciado el estresor agudo, indicando un retraso en la recuperación de los niveles basales de la hormona y por lo tanto

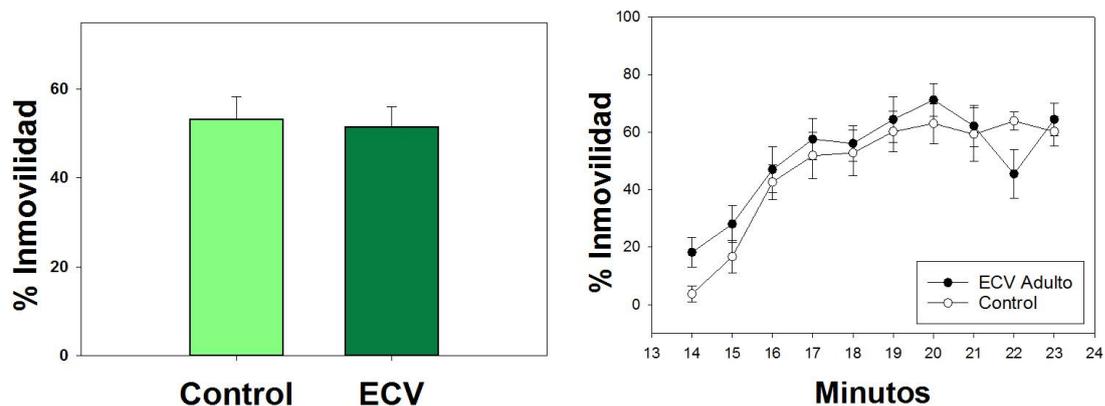
un déficit en la regulación del mecanismo de retroalimentación negativa (Figura 16).



**Figura 16.** Concentración de ACTH (pg/ml) a lo largo del tiempo luego de un estresor agudo (inmovilización 30 min, representada por la barra horizontal) de los animales estresados en la etapa adulta (ECV adulto) y evaluados 5 semanas más tarde y sus respectivos controles. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE. \*  $p < 0,05$ .

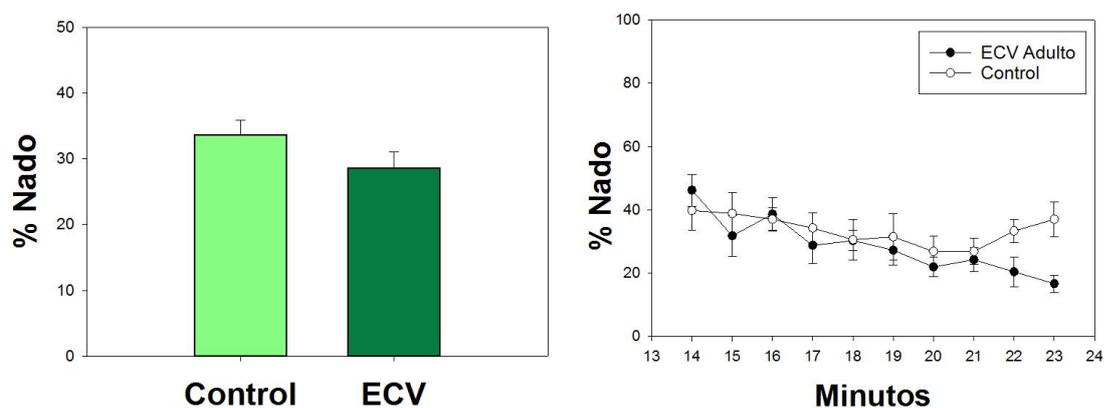
### 3) Adaptación comportamental en el test de nado forzado

- Al analizar el porcentaje de inmovilidad en los animales estresados y evaluados en la etapa adulta no se observó diferencia en la respuesta total entre los grupos ( $F_{1, 18} = 0,06$ ;  $p = 0,8$ ) ni en la interacción de la respuesta con el tiempo de evaluación Tratamiento x Tiempo ( $F_{1, 162} = 1,18$ ;  $p = 0,31$ ); Tratamiento ( $F_{1, 18} = 0,47$ ;  $p = 0,5$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** Porcentaje de inmovilidad en el test de nado forzado de los animales estresados en la adultez y evaluados en la etapa adulta (ECV adulto) y evaluado 5 semanas más tarde y sus respectivos controles. Panel Izquierdo: Porcentaje total luego de 10 minutos de evaluación. Panel derecho: Porcentaje a lo largo del tiempo. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

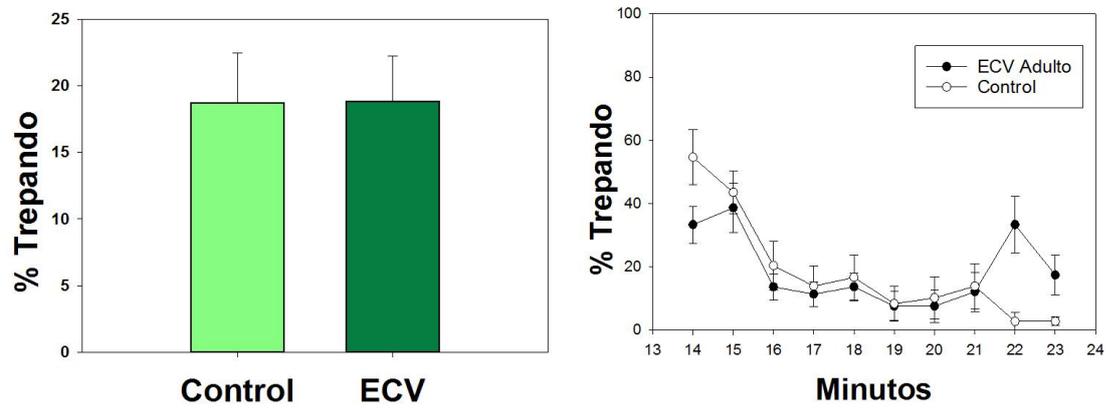
- Respecto al porcentaje de nado, tampoco se observaron diferencias para ninguna de las comparaciones: Tratamiento ( $F_{1, 18} = 2,2$ ;  $p=0,16$ ); Tratamiento ( $F_{1, 18} = 0,47$ ;  $p=0,5$ ), Tratamiento x Tiempo ( $F_{1, 162} = 0,47$ ;  $p=0,5$ ) (Figura 18).



**Figura 18.** Porcentaje de nado en el test de nado forzado de los animales estresados en la adultez y evaluados en la etapa adulta (ECV adulto) y evaluado 5 semanas más tarde y sus respectivos controles. Panel Izquierdo: Porcentaje total luego de 10 minutos de evaluación. Panel derecho: Porcentaje a lo largo del tiempo. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

- Por último, tampoco se evidenciaron efectos sobre el porcentaje de la respuesta de trepar la pared ( $F_{1, 18} = 0,00052$  ;  $p=0,98$ ). Si se observó una interacción significativa con el tiempo de evaluación ( $F_{1, 162} = 3,39$  ;  $p=0,0008$ ), Tratamiento ( $F_{1, 18} = 0,00098$  ;  $p=0,98$ ) , pero el test a posteriori no evidenció

ninguna diferencia entre los correspondientes tiempos y ambos grupos (Figura 20)



**Figura 19.** Porcentaje de escape activo (trepar las paredes) de los animales estresados en la adultez y evaluados en la etapa adulta (ECV adulto) y evaluado 5 semanas más tarde y sus respectivos controles. Panel Izquierdo: Porcentaje total luego de 10 minutos de evaluación. Panel derecho: Porcentaje a lo largo del tiempo. Los datos se presentan como media  $\pm$ EE.

## **CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN:**

A partir del trabajo realizado, se puede concluir que los efectos a largo plazo del Estrés Crónico Variado en la adolescencia difieren de los efectos del mismo cuando es aplicado en otra edad y que los efectos sobre las respuestas endocrina y conductuales al estrés son diferencialmente afectados dependiendo de la edad de la experiencia estresante. De esta manera, pudimos observar que:

1- Los animales estresados en la adolescencia muestran a largo plazo efectos conductuales como son la disminución en la actividad locomotora en el laberinto en cruz elevado y el aumento en la inmovilidad en el test de nado forzado, indicando que estos animales desarrollaron un fenotipo comportamental de adaptación pasiva frente a situaciones adversas. Sin embargo, la respuesta del eje HPA frente a un estresor agudo no fue afectada.

2- Los animales estresados en la adultez mostraron diferencias en la respuesta de secreción de corticosterona y ACTH frente a un estresor agudo, mientras que no se observaron efectos en las pruebas de comportamiento, indicando que los tipos de adaptaciones posteriores al estrés crónico dependen de la edad de exposición al protocolo de estrés.

En los últimos años, el estudio de los efectos del estrés en la adolescencia se ha convertido en un campo en amplio crecimiento dentro de las disciplinas de las neurociencias y la neuroendocrinología. Diversos autores han reportado los efectos del estrés crónico en la adolescencia utilizando diversos protocolos de estrés (Eiland L et al., 2012; Romeo RD., 2013; Chaby L et al., 2015). Otros trabajos se han enfocado en estudiar las diferencias en la respuesta de estrés y cómo ésta se ve afectada en condiciones de estrés crónico, comparando los efectos dentro de la etapa pre y post puberal dentro de la adolescencia (Romeo RD., 2010; Jankord R., Solomon MB et al., 2011). Más recientemente, algunos autores se han interesado en estudiar los efectos a largo plazo de este tipo de intervenciones dentro de esta etapa (Chaby L. y Cavigelli S. et al., 2013; Wulsin L., et al. 2016; Yohn NL. y Blendy JA., 2017). Nuestro trabajo se centró en contribuir al conocimiento de los efectos a largo plazo del estrés crónico variado, un modelo ampliamente utilizado para estudiar la desregulación del eje HPA (de Kloet ER et al., 2006; Cotella EM et al., 2013; Tsigos C. et al., 2016, Renard et al., 2007) y que también ha sido considerado como modelo de depresión (Cryan JF et al., 2002) aplicándolo en la adolescencia. A

su vez, nos interesamos en determinar si estos efectos son específicos de la edad de exposición al estrés crónico variado o si por el contrario, son solo efectos retardados de la respuesta a este protocolo, independientemente de la edad.

Respecto a los resultados del laberinto en cruz elevado y en particular a los efectos del estrés en la adolescencia, observamos que luego en la etapa adulta, si bien no se evidenciaron cambios en los índices de ansiedad, los animales presentaron menor número de entradas totales en el laberinto en cruz elevado. Tal efecto no se observó en los animales que fueron estresados en la etapa adulta, indicando que este efecto es específico de la edad a la cual los animales fueron sometidos al protocolo de estrés. Clásicamente, el número de entradas en este test conductual se utiliza como indicador general de la actividad locomotora de los animales (Weiss JM et al., 1998). En este sentido, otros autores han reportado una disminución en la actividad locomotora evaluada en un test de campo abierto en ratas que fueron sometidas a una variante de este tipo de estrés por una semana, durante la adolescencia temprana y luego evaluados a los 60 días. Los animales previamente estresados presentaron también menor número de entradas en brazos abiertos en este test, indicando un aumento del comportamiento tipo ansiedad (Luo J et al., 2014). Sin embargo, otros investigadores mostraron que el estrés de aislamiento por 1 hora durante 15 días en la adolescencia temprana provocó un leve aumento de la locomoción en los animales cuando éstos fueron evaluados 3 semanas y media más tarde (McCormick CM et al., 2008). Estos reportes contradictorios podrían deberse a diferencias en los modelos de estrés utilizados y las edades de aplicación del estrés y de evaluación. Es importante considerar también que, en el laberinto en cruz elevado, una supuesta disminución de la actividad locomotora de los animales puede en realidad confundirse con menor motivación por explorar el espacio o tal vez una mayor expresión de comportamiento de congelamiento (Weiss JM., et al 1998). Este último, es una conducta defensiva común frente a situaciones adversas que consiste en la inhibición total de movimientos excepto por los necesarios para mantener la respiración y que por lo tanto implica una disminución en la locomoción, sin tratarse de una reducción de la actividad motriz per se. Por otra parte, es interesante recalcar que los valores de los índices de ansiedad observados en este trabajo fueron considerablemente menores que los que

habitualmente se reportan para este test de comportamiento y que no se observaron diferencias entre los grupos en ninguno de los experimentos. Este resultado fue inesperado ya que se ha mostrado cómo el estrés durante la adolescencia ocasiona un aumento en el comportamiento tipo ansiedad en los adultos cuando fueron evaluados en este test comportamental (McCormick CM et al., 2008) o en el test de luz/oscuridad (Negrón-Oyarzo I et al, 2014). En este sentido, es importante destacar que, en general, se considera que una rata a la que se le permite recorrer durante 5 minutos el laberinto en cruz elevado, transcurrirá en promedio alrededor del 20-25% de ese tiempo explorando los brazos abiertos (Cárdenas J y Navarro JF., 2002). En nuestro trabajo, el promedio de exploración en los brazos abiertos fue menor al 15% del tiempo. Estos menores niveles en los índices de ansiedad observados podrían explicarse por haber utilizado un aparato de un tamaño que habitualmente se usa para animales más jóvenes, pero que para animales de las edades evaluadas, resultó ser muy pequeño, haciendo que los brazos abiertos fueran aún más atemorizantes para los animales de lo que se hubiera esperado. Esto podría explicar también la alta variabilidad observada en los datos, la baja incidencia de entradas en brazos abiertos y el reducido número de entradas totales que observamos en nuestros experimentos. Es por ello que consideramos que no es realmente posible realizar una comparación entre nuestros resultados y los de otros autores respecto a estos índices conductuales.

Para ampliar los resultados de este test, podrían incluirse mediciones de evaluaciones de toma de riesgo (del inglés *risk assessment*, que es cuando los animales se asoman por el borde del aparato observando hacia abajo) y mediciones de frecuencia y tiempo en las conductas de estirarse para explorar desde los brazos cerrados hacia los brazos abiertos (*stretch attends*), como complemento para evaluar los niveles de ansiedad.

En cuanto al análisis de respuesta del eje HPA a un estresor agudo, observamos que los animales estresados en la adolescencia no presentaron efectos en la etapa adulta, mientras que aquellos que fueron estresados en la adultez mostraron una hiperreactividad del eje al ser evaluados 5 semanas más tarde del estrés crónico. Esto indica que habría una adaptación diferencial en la regulación de la actividad del eje HPA inducido por el estrés crónico, dependiente de la edad en la que fueron sometidos a la experiencia estresante. El estrés crónico variado ha sido

ampliamente reportado por provocar la hipersecreción de estas hormonas frente a un estresor agudo (Gunnar MR et al., 2009; González F et al., 2010; Roca AJ et al., 2010). En general, este efecto se ha estudiado inmediatamente luego de la aplicación del modelo de estrés, aunque algunos autores se han propuesto evaluar sus efectos más duraderos. En este sentido, Bourke CH., Neigh GN., 2011, estudiaron el efecto del estrés crónico utilizando una combinación de inmovilización y estresores de tipo social durante la adolescencia y observaron que no hubo cambios en la respuesta de corticosterona a un estresor agudo en los machos adultos (como nosotras), aunque sí observaron un efecto de hiposecreción en las hembras. En línea con estos resultados, Wulsin et al., 2016 utilizando el mismo diseño experimental que nosotros, estudiaron los efectos a largo plazo del estrés en la adolescencia en ratas hembras de la cepa Sprague Dawley, y observaron también una disminución de la respuesta endocrina de estrés, sin embargo, cuando el mismo experimento fue repetido en machos, coincidentemente con nuestros resultados, no se observaron efectos en la respuesta a los 90 días de edad (Cotella et al., 2017, en preparación). En cuanto a los efectos a largo plazo del estrés en el adulto, Ostrander et al., 2006 sometieron machos adultos de la cepa Sprague Dawley a estrés crónico variado durante una semana y luego los evaluaron 30 días después de la finalización del mismo. En este caso, no se observaron diferencias en la respuesta a un estresor agudo, lo cual podría deberse a la diferencia en la extensión del protocolo de estrés crónico o también a diferencias entre las cepas de animales.

Nuestros resultados sugieren que, al menos para la respuesta endocrina de ACTH y corticosterona, la adolescencia sería una etapa de resiliencia a los efectos del estrés crónico ya que este no produjo una desregulación de la respuesta como sí ocurrió en los animales adultos. Esto podría explicarse por una mayor capacidad de plasticidad del cerebro adolescente, especialmente tomando en cuenta que si la regulación de los mecanismos de retroalimentación del eje HPA están en desarrollo durante esta edad (Romeo RD., 2010), los animales tendrían más posibilidades de modular la actividad de los circuitos involucrados en la regulación del eje, adaptándose a una situación de estrés crónico sin generar un fenotipo sensible al estrés como ocurrió con los animales del experimento 2.

En relación al test de nado forzado, los resultados obtenidos mostraron que los animales estresados en la adolescencia expresaron mayor inmovilidad al ser evaluados en la edad adulta, mientras que los adultos con experiencia estresante previa no mostraron diferencias con sus controles, indicando que la adaptación comportamental fue específica de la edad. Por lo tanto, se observa que la forma en que enfrentan una situación estresante inescapable como es el tanque de agua, depende de la edad en que hayan vivenciado el estrés.

Este test se ha utilizado como un modelo animal para el estudio de los efectos de fármacos antidepresivos, dado que los animales son forzados a lidiar con una situación de la que no pueden escapar por lo que tienden a expresar inmovilidad con el correr de los minutos, mientras que los animales tratados con un antidepresivo tienden a preservar el intento de escapar y mantenerse activamente a flote. A raíz de esto, durante mucho tiempo se utilizó el razonamiento inverso y se consideraba que intervenciones que incrementan la inmovilidad en este test, estarían por lo tanto promoviendo un comportamiento de tipo depresivo (Commons KG et al., 2017). Más recientemente se ha sugerido que lo más correcto es referirse a diferentes estilos de adaptación para afrontar la situación estresante, donde ciertos animales tendrán un estilo más pasivo, lo que clásicamente se llamaba tipo-depresivo (*depressive-like behavior*) (de Kloet ER y Molendijk ML., 2016, Commons et al. 2017).

Otros autores no encontraron efectos en el test de nado forzado en machos adultos que fueron estresados en la adolescencia, aunque sí observaron efectos similares a los nuestros en las hembras, sin embargo, el estrés utilizado fue aislamiento social (Hong et al., 2012) o una combinación de estresores sociales con inmovilización (Bourke CH., Neigh GN., 2011) pudiendo ser que las diferencias entre los tipos de estresores sean la explicación para la discrepancia en los resultados. A su vez, empleando el mismo diseño pero en ratas Sprague Dawley, Wulsin et al., 2016 y Cotella et al., 2017 observaron también un efecto de adaptación pasiva en el test de nado forzado, que fue únicamente observado en las hembras, por lo que no se pueden descartar efectos entre distintas cepas para este comportamiento.

A través de un análisis más global de los resultados, observamos que los animales con una historia de estrés crónico previa durante la adolescencia, presentan diferencias en los test comportamentales, sugiriendo mayores niveles de ansiedad y

una adaptación tipo pasiva frente a un estresor agudo; mientras que los adultos estresados enfrentan estas situaciones de manera conductual similar que otros adultos sin experiencia estresante previa.

Considerando que la respuesta de estrés es individual y subjetiva a la valoración del sistema de cada individuo (McCarty R et al., 1988; Ursin H. y Eriksen HR., 2004), se dice que la experiencia será estresante si el estímulo desborda la capacidad de afrontar la situación (coping) (McCarty R et al., 1988), incluyendo de esta manera en la ecuación del estrés a la naturaleza del estímulo, la experiencia del individuo y la capacidad activa individual de hacer frente a ese estímulo estresor. En nuestro trabajo vemos cómo la experiencia previa afecta las respuestas posteriores al estrés, y cómo la edad a la que se sufrió esa experiencia estresante determina distintos tipos de adaptaciones en esas respuestas.

La falta de control e incertidumbre frente a eventos estresantes se dice que produce un estado de distrés crónico, el cual se considera que incrementa la vulnerabilidad a distintas enfermedades relacionadas al estrés (Fuchs E y Flügge G., 2003; De Kloet ER et al., 2008; Miller JR et al., 2009). En nuestro trabajo pudimos observar que las respuestas comportamentales de los animales estresados en la adolescencia fueron afectadas de manera que se inclinaron hacia una estrategia de adaptación pasiva, la cual se ha relacionado con síntomas de psicopatologías asociadas al estrés como la ansiedad y la depresión (Commons KG et al., 2017) sugiriendo que durante esta ventana del desarrollo los animales presentaron una vulnerabilidad a los efectos del estrés que no se observó en los animales adultos. Sin embargo, la regulación del eje HPA, que también se ha asociado con este tipo de patologías (de Kloet ER., 2005), no fue afectada al momento de la evaluación mientras que sí hubo una desregulación en los animales estresados en la edad adulta. Esto estaría indicando que no todos los mecanismos de respuesta al estrés son vulnerables durante la adolescencia si no que los animales estresados en la adolescencia podrían ser resistentes o resilientes a este tipo de efecto. Los resultados de Jankord R et al., 2007, mostraron que el estrés crónico variado durante la adolescencia tardía provoca hipersecreción de corticosterona inmediatamente luego de la finalización del modelo de estrés. Esto sugiere que, en nuestro caso, lo más probable es que haya ocurrido lo mismo y que luego los animales fueron capaces de recuperar su respuesta durante las 5 semanas de recuperación, lo que no ocurrió en los animales

adultos. Por lo tanto, la adolescencia sería un periodo de particular resiliencia en cuanto a la regulación de la respuesta del eje HPA.

Para concluir, queremos destacar que el estrés crónico durante la adolescencia puede constituir un modelo útil para el estudio de los mecanismos que subyacen a la vulnerabilidad a trastornos emocionales y a la resiliencia en la respuesta del eje HPA. Consideramos además que nuestro trabajo es único en cuanto a que no existen muchos reportes de efectos retardados del estrés crónico luego de tantas semanas, ni en adolescentes ni en adultos.

## **AGRADECIMIENTOS:**

- A la Universidad Nacional de Córdoba y dentro de ella, a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales por ser mi casa de estudio durante estos años y permitirme formar como profesional.
- A la “comunidad de biología” toda, por dejarme ser parte de esta gran familia.
- Al Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra.
- A mis directora, Eve y co-directora Gabi por enseñarme mucho más de lo que ellas creen, no solo en lo académico sino en lo personal, por ser grandes compañeras, siempre estar dispuestas a ayudarme y dejarme formar parte de un grupo humano hermoso.
- A mis compañeros de laboratorio: Carlitos, Dami, Viqui por brindarme su experiencia y en especial al Guille, por ser el mejor compañero que podría haber tenido, de una generosidad única y que me acompañó en el día a día con mucha paciencia.
- Al laboratorio de la Dra. Laura Vivas por prestarnos equipamiento y sus espacios, a Anahí Bignante por habernos entrenado en la toma de muestras de sangre, al personal del bioterio por su dedicación y predisposición y en especial a Joaquín por su ayuda, a Soledad de Olmos por cedernos su espacio y su tiempo.
- A Cristian Hansen por su colaboración en la medición de las concentraciones de hormonas en sangre y su profesionalismo.
- A la comisión evaluadora por su constante buena predisposición y atención.
- A las amigas que me dejó la facultad por hacer hermosa esta etapa y acompañarme siempre, siendo un pilar fundamental.
- A mis amigas “del pueblo”, por estar presentes siempre.
- A Matías por ser mi compañero en todo momento y brindarme su apoyo incondicional.
- Y por último, a quienes hicieron posible esto: mi familia Orlando, Carmen y Stefanía por ser mi sostén, por hacer el esfuerzo para que llegue hasta acá y su incondicionalidad infinita.

A todos y cada uno, ¡GRACIAS!

## **BIBLIOGRAFÍA:**

- Aalto-Setälä T., Marttunen M., Tuulio-Henriksson A., Poikolainen K., Lönnqvist J., (2002): “Depressive Symptoms in Adolescence as Predictors of Early Adulthood Depressive Disorders and Maladjustment”, *The American Journal of Psychiatry*, Volume 159, Issue 7, July 2002, pp. 1235-1237.
- Andersen SL., Teicher MH., (2008): “Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression”, *Trends in Neurosciences*, Volume 31, Issue 4, Pages 183–191.
- Bogin B., (1994): “Adolescence in evolutionary perspective”. *Acta Paediatrica*, Supplement 1994;406:29–35.
- Bourke CH., Neigh GN., (2011): “Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic”. *Horm Behav.* 2011
- Cárdenas J., Navarro JF., (2002): “Modelos animales de ansiedad incondicionada (I)”, *Psiquiatría Biológica*, Vol. 9. Núm. 1: 18-32.
- Carrasco GA., Van de Kar LD., (2003): “Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.*; 463(1-3):235-72. Review.
- Chaby LE., Cavigelli SA., White A., Wang K, Braithwaite, V., (2013): “Long-term changes in cognitive bias and coping response as a result of chronic unpredictable stress during adolescence”. *Frontiers in human neuroscience*, page 107, 2013.
- Chaby E., Cavigelli SA., Hirrlinger AM., Caruso MJ., Braithwaite VA., (2015): “Chronic unpredictable stress during adolescence causes long-term anxiety”. *ELSEVIER* Volume 278, Pages 492–495

- Checkley S., (1996): "The neuroendocrinology of depression and chronic stress", *British Medical Bulletin*, Volume 52, Issue 3, Pp. 597-617.
  
- Commons KG., Cholanians AB., Babb JA., & Ehlinger DG., (2017): "The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior". *ACS Chemical Neuroscience*, 8(5), 955–960.
  
- Cotella EM., Morano R., Wulsin A., Martelle S., Herman JP., (2017, en preparación): "Glucocorticoid Receptor Inhibition Prevents Lasting Endocrine but not Behavioral Effects of Adolescent Stress".
  
- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002): "Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs". *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(5), 238–45.
  
- Dallman MF., (1992): "Complexities of stress". *Science*. 1992 Dec 18; 258(5090):1970-1.
  
- De Kloet ER., Vreugdenhil E., (1998): "Corticosteroid hormones and neuronal vulnerability: towards identification of candidate vulnerability genes". *Prog Brain Res*. 1998;117:9-22. Review.
  
- De Kloet ER., Grootendorst J., Karssen AM., Oitzl MS., (2002): "Gene x environment interaction and cognitive performance: animal studies on the role of corticosterone". *Neurobiol Learn Mem.*; 78(3):570-7.
  
- De Kloet ER., Joëls M., Holsboer F., (2005): "Stress and the brain: from adaptation to disease". *Nat Rev Neurosci.*: 463-75. Review.
  
- De Kloet ER y Molendijk ML, (2016): "Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism", *Neural Plasticity*; 2016:6503162.

- Eiland L., Ramroop J., Hill MN., Manley J., McEwen MS., (2012): "Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats". *Psychoneuroendocrinology*. Volume 37, Issue 1, Pages 39–47.
- Engelmann M., Landgraf R., Wotjak CT., (2004): "The hypothalamic–neurohypophysial system regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis under stress: an old concept revisited", *ELSEVIER, Frontiers in Neuroendocrinology*, volume 25, Pages 132–149.
- Fuchs E., Flügge G., (2003): "Chronic social stress: effects on limbic brain structures". *Physiology & Behavior*. Volume 79, Issue 3, August 2003, Pages 417–427.
- Genazzani AD., Gamba O., Sgarbi L., Gandolfi A., Corazza F., Surico N., Petraglia F., (1997): "Neuromodulatory role of opioidergic system on hypothalamus–pituitary–gonadal axis during puberty". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1997;816:76–82.
- González F., Duval F., Rabia H., (2010): "Neurobiología del estrés". *Rev. chil. neuro-psiquiatr.* v.48 n.4.
- Goodyer IM., Herbert J., Tamplin A., Altham PM., (2000): "First-episode major depression in adolescents. Affective, cognitive and endocrine characteristics of risk status and predictors of onset." *Br J Psychiatry.*; 176:142-9.
- Gunnar MR., Lupien SJ., McEwen BS., Heim C., (2009): "Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition". *Nature Reviews Neuroscience* 10, 434-445.
- Handley SL., McBlane JW., (1993): "An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs". *Journal of*

Pharmacological and Toxicological Methods. Volume 29, Issue 3, June 1993, Pages 129-138.

- Herman JP., Adams D., Prewitt C., (1995): "Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm". *Neuroendocrinology*. 1995 Feb;61(2):180-90.
- Herman JP., Figueiredo H., Mueller NK., Ulrich-Lai Y., Ostrander MM., Choi DC., Cullinan WE., (2003): "Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness", *ELSEVIER, Frontiers in Neuroendocrinology*, Volume 24, Issue 3, Pages 151–180.
- Jankord R., Solomon M., Albertz J., Flak JN., Zhang R., Herman JP., (2011): "Stress vulnerability during adolescent development in rats", *Endocrinology*. 2011;152:629–638.
- Jernigan TL., Trauner DA., Hesselink JR., Tallal PA., (1991): "Maturation of human cerebrum observed in vivo during adolescence". *Brain* 1991;114:2037–49.
- Koolhaass JM., Bartolomucci A., Buwalda B., de Boer SF., Flügge G., Korte SM., Meerlo P., Murison R., Olivier B., Palanza P., Richter-Levin G., Sgoifo A., Steimer T., Stiedl O., (2011): "Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Volume 35, Issue 5, April 2011, Pages 1291–1301
- Korte MS., Koolhaas JM., Wingfield JC., McEwen BS., (2005): "The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Volume 29, Issue 1, Pages 3–38.

- Le Moal M., (2007): "Historical approach and evolution of the stress concept: A personal account", *Psychoneuroendocrinology*, Aug;32 Suppl 1:S3-9.
- Lewinsohn PM., Rohde P., Seeley JR., Klein DN., Gotlib IH., (2002): "Natural Course of Adolescent Major Depressive Disorder in a Community Sample: Predictors of Recurrence in Young Adults", *The American Journal of Psychiatry*, Volume 157, Issue 10, October 2000, pp. 1584-1591.
- Logan JG., Barksdale DJ., (2008): "Allostasis and allostatic load: expanding the discourse on stress and cardiovascular disease". *J Clin Nurs.*: 201-8. Review.
- Lucki I., (1997): "The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs", *Behav Pharmacol.* 1997 Nov;8(6-7):523-32.
- 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.
- Makino S., Hashimoto K., Gold PW., (2002): "Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress", *ELSEVIER, Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Volume 73, Issue 1, Pages 147–158.
- McCarty R., Natelson BH., Ottenweller JE., Cook JA., Pitman D., Tapp WN., (1988): "Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response". *Physiol Behav.* 1988;43(1):41-6.
- McCormick CM., Smith C., Mathews Z., (2008): "Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats". *Behavioural Brain Research*. Volume 187, Issue 2, Pages 228–238.

- McCormick CM., Green MR., (2013): "From the stressed adolescent to the anxious and depressed adult: Investigations in rodent models". ELSEVIER, Neuroscience. Volume 249, Pages 242–257.
- McEwen BS., (2007): "Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain", Physiological Reviews Published, Vol. 87 no. 3, Pages 873-904.
- Micó, JA., Gibert-Rahola J., Berrocoso E., Rojas-Corrales MO., (2002): "Antidepressant-like effects of tramadol and other central analgesics with activity on monoamines reuptake, in helpless rats", Life Sciences, Volume 72, Issue 2, 29 November 2002, Pages 143–152.
- Miller JR., Brougham RR., Zail CM., Mendoza CM., (2009): "Stress, Sex Differences, and Coping Strategies Among College Students". Current Psychology. Volume 28, Issue 2, pp 85–97.
- Montenegro H., (2000): "La psiquiatría del niño y del adolescente" Revista chilena de neuro-psiquiatría, v.38 n.3 Santiago, jul. 2000.
- Negrón-Oyarzo I., Pérez M. Á., Terreros G., Muñoz P., Dagnino-Subiabre A., (2014). "Effects of chronic stress in adolescence on learned fear, anxiety, and synaptic transmission in the rat prelimbic". Behavioural Brain Research, Volume 259, 1 February 2014, Pages 342–353.
- Olf M., (1999): "Stress, depression and immunity: the role of defense and coping styles". Psychiatry Research, Volume 85, Issue 1, 18 January 1999, Pages 7–15.
- Oitzl MS., Champagne D L., van der Veen R., De Kloet R., (2010): "Brain development under stress: Hypotheses of glucocorticoid actions revisited", ELSEVIER, Neuroscience & Biobehavioral Reviews, Volume 34, Issue 6, May 2010, Pages 853–866.

- Pardo G., Sandoval A., Umbarila D., (2004): "Adolescence and depression", Universidad Nacional de Colombia Revista Colombiana de Psicología, 2004, No. 13, 13-28.
- Patel V., Flisher A.J, Hetrick S., McGorry P., (2007): "Mental health of young people: a global public-health challenge", The Lancet, Volume 369, Issue 9569, Pages 1302–1313.
- Romeo RD., (2010): "Adolescence: a central event in shaping stress reactivity", Dev Psychobiol.; 52(3):244-53.
- Renard, G. M., Rivarola, M. A., y Suárez, M. M. (2007): "Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitary-adrenal axis and behavior". International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience, 25(6), 373–9.
- Romeo RD., Mc Ewen B., (2006): "Stress and the Adolescent Brain", Annals of the New York academy of science, Volume 1094, Resilience in Children, pages 202–214.
- Romeo RD., (2013): "The teenage brain: The Stress Response and the Adolescent Brain". Association for psychocological science, Vol 22, Issue 2.
- Roca AJ., (2010): "ESTRÉS Y ENFERMEDAD. ENFOQUE PSICONEUROINMUNOENDOCRINO". Revista medicina, Vol. 32, núm. 3.
- Sengupta P., (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. International Journal of Preventive Medicine, 4(6), 624–30. Retrieved from

- SIERRA NORMA 2014 Adolescencia, subjetividad y contexto socio-cultural. Facultad de Ciencias Humanas. Universidad Nacional de San Luis (Argentina). Argonautas, Año 4, N° 4: 67- 78.
- Slattery, D. A., & Cryan, J. F. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols*, 7(6), 1009–1014.
- Sowell ER., Thompson PM., Holmes CJ., Jernigan TL., Toga AW., (1999): “In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions”. *Nature Neuroscience* 1999;2:859–61.
- Spear LP., (2000): “The adolescent brain and age-related behavioral manifestations”, *ELSEVIER, Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Volume 24, Issue 4, Pages 417–463.
- Sterlemann V., Rammes G., Wolf M., Liebl C., Ganea K., Müller MB., Schmidt, MV., (2010): “Chronic social stress during adolescence induces cognitive impairment in aged mice”. Volume 20, Issue 4, Pages 540–549.
- Tasker JG., Franco AJ., Scullen T., Zsombok A., Salahudeen AA., Di S., Herman JP., (2016): “Sensitization of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in a Male Rat Chronic Stress Model”, *Endocrinology*, Volume 157, Issue 6.
- Teicher MH., Andersen SL., (2008): “Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression”. *Cell press*, Volume 31, Issue 4, Pages 183–191.
- Tsigos C., Kyrou I., Kassi E., Chrousos GP., (2016): “Stress, Endocrine Physiology and Pathophysiology”. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors 2016.

- Tsigos C., Chrousos GP., (2002): “Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress”, *Journal of psychosomatic research*, Volume 53, Issue 4, Pages 865–87.
- Ulrich-Lai YM., Figueiredo HF., Ostrander MM., Choi DC., Engeland WC., Herman JP., (2006): “Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner”. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Nov;291(5):E965-73. Epub 2006 Jun 13.
- Ulrich-Lai YM., Herman JP., (2009): “Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses”, *Nature Reviews Neuroscience* 10, 397-409.
- Ursin H., Eriksen HR., (2004): “The cognitive activation theory of stress”. *Psychoneuroendocrinology*. Volume 29, Issue 5, June 2004, Pages 567–592.
- Van Eden CG., Kros JM., Uylings HBM., (1990): “The development of the rat prefrontal cortex: Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas”. In: Uylings HBM, van Eden CG, De Bruin JPC, Corner MA, Feenstra MGP, editors. *Progress in brain research, The prefrontal cortex: its structure, function and pathology*, vol. 85. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 169–83.
- Watson SJ., Akil H., Kabbaj M., Isgor C., (2004): “Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats”. *Hippocampus* Volume 14, Issue 5 Pages 636–648.
- Weiss S., Wadsworth G., Fletcher A., Dourish, C., (1998). “Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety”. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(2), 265–271.

- Wulsin AC., Wick-Carlson D., Packard BA., Morano R., Herman JP., (2016): “Adolescent chronic stress causes hypothalamo–pituitary–adrenocortical hypo-responsiveness and depression-like behavior in adult female rats”, *Psychoneuroendocrinology*, Volume 65, Pages 109–117.
- Yohn NL y Blendy JA., (2017): “Adolescent Chronic Unpredictable Stress Exposure Is a Sensitive Window for Long-Term Changes in Adult Behavior in Mice”. *Neuropsychopharmacology*. doi:10.1038/npp.2017.11.