



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

Cambios en aprendizaje, memoria y actividad
exploratoria producidos por la exposición de ratas
macho a ruido ambiental en edad temprana y
estrés agudo por depredador en la adultez

Tesis

que para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIA DEL COMPORTAMIENTO
(OPCIÓN NEUROCIENCIA)**

presenta

Rosa Yaveth Ruvalcaba Delgadillo

Comité tutorial

Dra. Ma. Sonia Luquín de Anda (Directora)

Dr. Joaquín García Estrada

Mtro. Sergio Meneses Ortega

Dr. Jorge Juárez González

Guadalajara, Jalisco

Enero de 2009



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CUCBA

MAESTRIA EN CIENCIAS
DEL COMPORTAMIENTO (OPCION NEUROCIENCIAS)

**CAMBIOS EN APRENDIZAJE, MEMORIA Y ACTIVIDAD EXPLORATORIA
— PRODUCIDOS POR LA EXPOSICIÓN DE RATAS MACHO A RUIDO
AMBIENTAL EN EDAD TEMPRANA, Y ESTRÉS AGUDO POR DEPREDADOR
EN LA ADULTEZ.**

ALUMNA: Rosa Yaveth Ruvalcaba Delgadillo

COMITÉ TUTELAR:

DIRECTOR: Dra en C. Ma Sonia Luquín de Anda

CO DIRECTOR: Dr en C Joaquín García Estrada

Mtro. en C. Sergio Meneses Ortega

Dr. en C. Jorge Juárez González

Enero de 2009

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por darme la vida y apoyarme en todas mis locuras.

A mis hermanos que siempre que los necesito están ahí.

A Lolita, por ser parte fundamental
de mi crecimiento en todos los sentidos

A la Dra. Sonia y al Dr. Joaquín por todo el apoyo que me brindaron y por su confianza,
Por abrirme las puertas de su laboratorio y de su casa.
Mi más profundo agradecimiento para ustedes

Al Mtro. Sergio Meneses por su tiempo y dedicación

A todos los que participaron para que esta tesis se realizara:
A Normita Moy, Posdoc. Oscar Glez, Dra. Rocío,
Dr. Diego Redolar, Marai, Mónica, Anita, Dr. Jorge Juárez,
a todos mis compañeros

Pero sobre todo a ti por hacerlo posible..

Gracias Fer

DEDICATORIAS

A mis papás Rosy y Sergio, que no solo son los mejores padres del mundo,
Además son los mejores amigos

A mis hermanos Adriel y Charlie

A Lolita, por creer en mí y ser un ejemplo de nobleza

A ti Flais esto es por ti y para ti
Ta

... y a la Pirrus

INDICE GENERAL

CRÉDITOS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
Estrés: Concepto y clasificación	10
Neuroendocrinología de la respuesta frente a estrés	12
• Sistema Simpático-Adrenomedular (SSA)	12
• Eje Hipotálamo Hipofisiario Adrenal (HHA)	12
• Los Glucocorticoides (GCs) y regulación de la respuesta frente a estrés	13
• Sistema límbico, estrés y funciones cognitivas	16
• Glucocorticoides y desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC)	17
• Vías auditivas y sistema endocrino	19
ANTECEDENTES	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	28
HIPOTESIS	29

MATERIALES Y MÉTODOS	30
Animales de experimentación	30
Obtención de suero	32
Estudio conductual:	
• Laberinto acuático radial de ocho brazos (RAWM)	33
• Prueba campo abierto (Open Field): Actividad exploratoria	34
DISEÑO EXPERIMENTAL	35
RECUADRO METODOLOGICO	36
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
RESULTADOS	38
Efecto del ruido ambiental en etapa temprana sobre la ganancia de peso	38
Efecto del estrés sobre niveles de corticosterona en suero	39
Efecto del ruido ambiental sobre el aprendizaje y la memoria de ratas jóvenes	41
Efecto del estrés sobre el aprendizaje y la memoria de ratas adultas	43
Efecto del estrés sobre la conducta de ratas jóvenes en campo abierto	47
Efecto del estrés sobre la conducta de ratas adultas en campo abierto	49
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS	65

CREDITOS INSTITUCIONALES

Proyecto IMSS clave FIS/IMSS/PROT/026. Responsable: Dr. en C. Joaquín García Estrada. Centro de Investigación Biomédica de Occidente, División de Neurociencias, Laboratorio de Neuroendocrinología Celular. IMSS. Título: *“Efectos del estrés por ruido ambiental sobre aprendizaje, memoria y reactividad astrogial en el hipocampo de ratas”*

Proyecto CONACYT clave 52545. Responsable: Dra. en C. Ma. Sonia Luquín de Anda. Departamento de Neurociencias, del Centro Universitario de ciencias de la Salud (CUCS) Universidad de Guadalajara. Con el título: *“Efectos cognoscitivos y citoarquitectura del hipocampo y corteza prefrontal de ratas sometidas a estrés agudo, pretratadas con betametasona en el último tercio de su desarrollo prenatal”*.

Becaria CONACYT, Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnología N° de Registro 205241, A partir de Marzo de 2006 a Enero de 2008.

Becaria 99147946 de marzo de 2006 a Febrero de 2008. Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social (División de Neurociencias), Laboratorio de Neuroendocrinología Celular, bajo la supervisión del Dr. en C. Joaquín García Estrada.

Laboratorio de Neurociencias y Microscopía de Alta Resolución pertenecientes al Departamento de Neurociencias del centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS) de la Universidad de Guadalajara, bajo la supervisión de la Dra. en C. Ma. Sonia Luquín de Anda.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
CA	Campo abierto
C	Control
CA	Control adulto
CORT	Corticosterona
CRH	Hormona Liberadora de la Corticotropina
EAD	Estrés agudo por depredador
ELRA	Efectos a largo plazo del ruido ambiental
GCs	Glucocorticoides
GR	Glucoreceptor
HHA	Hipotálamo Hipofisiario Adrenal
MR	Mineraloreceptor
PN	Día postnatal
PVN	Núcleo paraventricular
RA	Ruido ambiental
RA+EAD	Ruido ambiental + Estrés agudo por depredador
RAWM	Laberinto acuático radial
SNC	Sistema Nervioso Central

RESUMEN

Antecedentes: El estrés crónico o intenso modula el funcionamiento cognitivo. La respuesta fisiológica y cognitiva a eventos estresantes depende en gran parte de la experiencia temprana. El ruido ambiental es un importante generador de estrés en las sociedades modernas cuyos efectos sobre la capacidad de aprendizaje han sido poco estudiados. **Planteamiento:** Sabemos en la actualidad que diferentes modelos de estrés pueden tener efectos a corto y largo plazo sobre las habilidades cognitivas, sin embargo estos modelos parecen estar alejados de situaciones comúnmente estresantes para el humano como sería el ruido ambiental, por lo que nos propusimos evaluar los efectos del ruido ambiental y la combinación de éste estímulo con otro modelo de estrés de diferente característica y en otra etapa de la vida del sujeto, sobre las habilidades cognitivas de ratas macho. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la exposición crónica a ruido ambiental sobre la capacidad de aprendizaje espacial y actividad exploratoria de ratas macho prepúberes y los cambios producidos por la exposición a un nuevo evento estresante en la vida adulta. **Materiales y Métodos:** Un total de 84 ratas macho de 21 días de edad fueron divididas en 2 grupos y evaluadas en dos etapas experimentales. En una primera etapa (21-35 pn), la mitad de esas ratas fueron expuestas a ruido ambiental ($n=42$) y la mitad restante permaneció en condiciones normales de bioterio ($n=42$). Al día 36 de edad posnatal, un subgrupo de animales de cada condición ($n=14$) fue sometido a pruebas de aprendizaje espacial (RAWM), actividad exploratoria (campo abierto) y niveles de corticosterona (inmunoensayo enzimático). En una segunda etapa, las ratas restantes fueron utilizadas para evaluar la respuesta a un nuevo evento estresante en la vida adulta. A la edad de 90 pn, un subgrupo de animales de cada condición inicial (Control y ruido ambiental) fue expuesto a estrés por amenaza de depredación ($n=14$) y nuevamente fue comparado su rendimiento en las pruebas de aprendizaje espacial, actividad exploratoria y niveles de corticosterona. **Resultados:** La exposición a ruido ambiental redujo el rendimiento de las ratas en la prueba de RAWM durante el cuarto día de evaluación (latencia de escape: C-RA $p<0.019$; memoria de referencia $p<0.021$; memoria de trabajo $p<0.003$). Los niveles de CORT se incrementaron en respuesta al RA (C-RA $p<0.05$) y la ganancia de peso corporal se redujo durante los días 28 pn $p<0.018$, y 32 pn $p<0.03$ en el grupo C con respecto al grupo RA. De igual forma, se observó un deterioro en el rendimiento de las ratas al ser evaluadas después de la exposición a amenaza de depredación (latencia de escape: CA-EAD $p<0.031$, CA- RA+EAD $p<0.003$, CA-ELRA $p<0.031$) e incremento significativo en los niveles séricos de CORT del grupo RA+EAD y EAD con respecto al grupo CA y ELRA $p<0.05$. **Conclusión:** La exposición a ruido ambiental resultó en potentes efectos estresantes al ser aplicado a sujetos en desarrollo. Su efecto cognitivo fue especialmente notable en la capacidad para re-aprender una tarea espacial y la exposición a un nuevo evento estresante potenció ese efecto.

ABSTRACT

Background: Chronic or acute stress modulates the cognitive functioning. The physiological and cognitive responses to stressful events in large part depend of the previous early experience. The environmental noise is an important stress generator in modern societies, whose effects on the learning capacity have been little studied.

Approach: Nowadays we know now that different experimental models of stress may have a short or long-term impact in the cognitive skills of exposed subjects. However; these models are very distant from commonly stressful situations for the human communities, as would be the environmental noise, so that we proposed to assess the effects on cognitive abilities of chronic noise stress in weaned rats, and after a second exposure episode to acute stress for predator menace, in the adulthood of male rats.

Objective: Analyze the effects of environmental noise stress on spatial learning ability and exploratory activity of prepubescent male rats, and the performance for these assignments of another group of rats, which were tested after exposure to a second intense acute stress in adulthood.

Materials and Methods: 84 male rats of 21 days age were divided into two groups and evaluated at two experimental stages. In a first stage (21-35 pn), half of those rats were exposed to environmental noise (n=42), and the other half remained in standard vivarium conditions (n=42). At 36 postnatal days, a subgroup of 14 animals transferred from each condition performed the RAWM spatial learning and exploratory activity tasks (open field), and their serum corticosterone levels were quantified. In a second stage, the remaining rats were exposed in adulthood to a second acute stressful event, in order to assess their capability for spatial learning, exploratory behavior and corticosterone response. To this end, at 90 pn days a subgroup of control, or environmental noise stressed animals was exposed to acute stress by predator menace (n=14) and their performance score for the same parameters was compared.

Results: Exposure to environmental noise affected the rat's latency time of escape, $p<0,019$; reference memory $p<0,021$ and working memory $p<0,003$ in the RAWM paradigm performance, at the fourth day of the re-learning spatial task. The CORT levels arousal in response to noise $p<0.05$, and the corporal weight increasing was inhibited at 28 and 32 pn days in the stressed group of rats $p<0.03$. Also resulted a decreased performance in the escape latency time $p<0,031$ of the adult rats, evaluated after exposure to predator menace $p<0,003$, $p<0,031$), together with a significant increase in CORT serum levels of the group exposed to two stress events, compared with the other control and noise stressed rats $p<0.05$.

Conclusions: Early exposure to environmental noise produced a powerful stress in weaned rats, these animals showed a decreased ability to re-learn a spatial task in the RAWM, and this negative effect was potentiated when this animals were again exposed to a new acute stressful event in their adulthood.

INTRODUCCIÓN

ESTRÉS: CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN.

Estrés es un término que describe cualquier situación significativa que demanda un reajuste fisiológico y/o conductual para la adaptación o bienestar del individuo (Chrousos y Gold, 1992).

Para que una situación sea considerada estresante, deben satisfacerse tres condiciones (Kim y Diamond, 2002):

- Generar intensa excitabilidad
- Que el estímulo sea percibido como aversivo y
- Que sea incontrolable

Los estímulos estresantes pueden clasificarse por su naturaleza de la siguiente manera:

- *Sistémicos*: de naturaleza física o química que implican una amenaza fisiológica inmediata (hipovolemia, hipotensión, infección, hemorragia) y que activan vías viscerales conectadas directamente al Núcleo paraventricular (PVN), como los núcleos catecolaminérgicos del tronco encefálico.
- *De procesamiento*: aquellos que se originan de un análisis de información en estructuras superiores del SNC y se canalizan mediante estructuras límbicas (miedo, ansiedad, frustración, incertidumbre).
- *Mixtos*: poseen componentes tanto sistémicos como de procesamiento. Muchos de los modelos experimentales son de este tipo (inmovilización, restricción, ruido, descargas eléctricas) (Herman y Cullinan, 1997).

Los *estresores* además son clasificados de acuerdo a la frecuencia y duración del estímulo, durante el curso temporal de la exposición a la situación estresante. De esa manera, es posible diferenciar al estrés en:

Agudo: Solo se produce una vez y puede durar segundos, minutos u horas.

Crónico: que a su vez puede ser *intermitente* si se repite diariamente durante varios días o *continuo*, si el sujeto está permanentemente expuesto al mismo estímulo.

Finalmente, el estrés también se clasifica de acuerdo a su intensidad en (Marti y Armario, 1998):

Leve

Moderado

Intenso.

Los estímulos estresantes que cumplen con estas características desencadenan una serie de respuestas complejas, que incluyen: movilización de energía para el mantenimiento de la función muscular y cerebral, agudización y focalización de la atención sobre la amenaza percibida, modulación de la función inmunológica, inhibición de la función reproductiva y conducta sexual, y decremento en el apetito e ingesta de comida (Carrasco y Van de Kar, 2003).

Las acciones anteriores involucran a prácticamente todo el organismo; sin embargo, es de especial importancia el Sistema Nervioso Central (SNC) en la coordinación de esos cambios.

Los principales sistemas involucrados en esta actividad son: El eje Hipotálamo-Hipofisiario-Adrenal (HHA) y el Sistema Simpático-Adrenomedular (SSA).

NEUROENDOCRINOLOGIA DE LA RESPUESTA FRENTE A ESTRÉS.

Sistema Simpático-Adrenomedular (SSA).

En este sistema participa el mecanismo autónomo que controla la actividad de los órganos internos responsables de mantener las condiciones vitales óptimas para las distintas células del cuerpo. El SSA, se activa de manera inmediata ante un estímulo estresante, e involucra la activación de dos componentes que desempeñan roles opuestos: el Sistema Nervioso Simpático (SNS) que estimula la secreción de adrenalina en la médula adrenal como respuesta ante una señal de emergencia que pone en riesgo la homeostasis, y el Sistema Nervioso Parasimpático (SNP) que regula funciones vegetativas como crecimiento y digestión, reducción de la tasa cardíaca y respiración. Ambos sistemas inervan los mismos órganos diana pero desde distintos puntos de origen (Goldstein, 2003).

Eje Hipotálamo Hipofisiario Adrenal (HHA)

El sistema HHA involucra varias estructuras anatómicas que responden ante un estímulo estresante: el hipotálamo, la glándula pituitaria anterior y la corteza adrenal.

Durante la respuesta de estrés, las neuronas que se encuentran en el PVN secretan la hormona liberadora de la corticotropina (CRH), específicamente las parvocelulares, mientras que las neuronas magnocelulares liberan Arginina Vasopresina (AVP) y Oxitocina (OX). Los axones de éstas células se proyectan a la eminencia media donde liberan sus productos a la circulación a través del sistema portal hipofisiario. Tanto CRH, como AVP actúan sobre receptores para CRH (tipo 1) en células corticotropas de la glándula hipofisiaria anterior en donde estimulan la síntesis y liberación de Adrenocorticotropina (ACTH) (de Kloet, 2003). Las células corticotropas producen el péptido ACTH teniendo como precursor una molécula de mayor tamaño denominada pro-opiomelanocortina (POMC), la cual se deriva del gen del mismo nombre. Una vez liberada, la ACTH viaja a través del torrente sanguíneo y se une a receptores adrenocorticales para melanocortina tipo 2 (MC2R) (Cone, 2005) regulando de esta forma la síntesis y liberación de glucocorticoides (GCs) en la corteza adrenal. Los GCs, son hormonas pertenecientes al grupo de los esteroides, cortisol en humanos y corticosterona en

ratas y otros roedores; son el producto final de este eje y se secretan a partir del colesterol en la zona fascicular intermedia de la corteza Adrenal (Tsigos y Chrousos, 2002).

Glucocorticoides (GCs) y la regulación de la respuesta frente a estrés.

Los GCs regulan funciones metabólicas, inmunitarias, cardiovasculares, renales, esqueléticas, gastrointestinales, de diferenciación, desarrollo y endocrinas (McEwen et al., 1986).

Son los principales efectores del eje HHA y por su naturaleza lipofílica tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, actuando en el sistema nervioso a través de una amplia distribución de receptores intracelulares: MR y GR. A través de estos dos tipos de receptor, los Glucocorticoides mantienen la actividad basal del eje Hipotálamo Hipofisiario Adrenal, y regulan el umbral de activación del sistema de respuesta al estrés por una parte (proactividad), y por otra; participan en la terminación de la respuesta, facilitan la adaptación y recuperación del sujeto estresado (reactividad), (de Kloet, 2003).

La distribución de los GR en el SNC es muy amplia y se les puede encontrar en prácticamente todo el cerebro, sin embargo, son abundantes en hipotálamo e hipófisis. Los MR por su parte se expresan en mayor proporción fuera del hipotálamo, en áreas límbicas como el hipocampo cuya importancia en los sistemas de memoria ha sido bien documentada (Reul y de Kloet, 1985).

El balance en las acciones mediadas por estos dos receptores es relevante para el control de la excitabilidad neuronal, la respuesta de estrés y la adaptación conductual. En general se acepta que su acción depende del contexto celular y que en interacción con otras señales modulan de manera compleja y diversa la expresión génica en neuronas (Pariante y Miller, 2001).

La acción de los GCs es especialmente relevante cuando debe suprimirse la respuesta frente a estrés, ellos ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre el eje HPA, actuando tanto en hipotálamo e hipófisis; como en estructuras superiores (hipocampo, amígdala, septo y corteza prefrontal medial) (Fig. A).

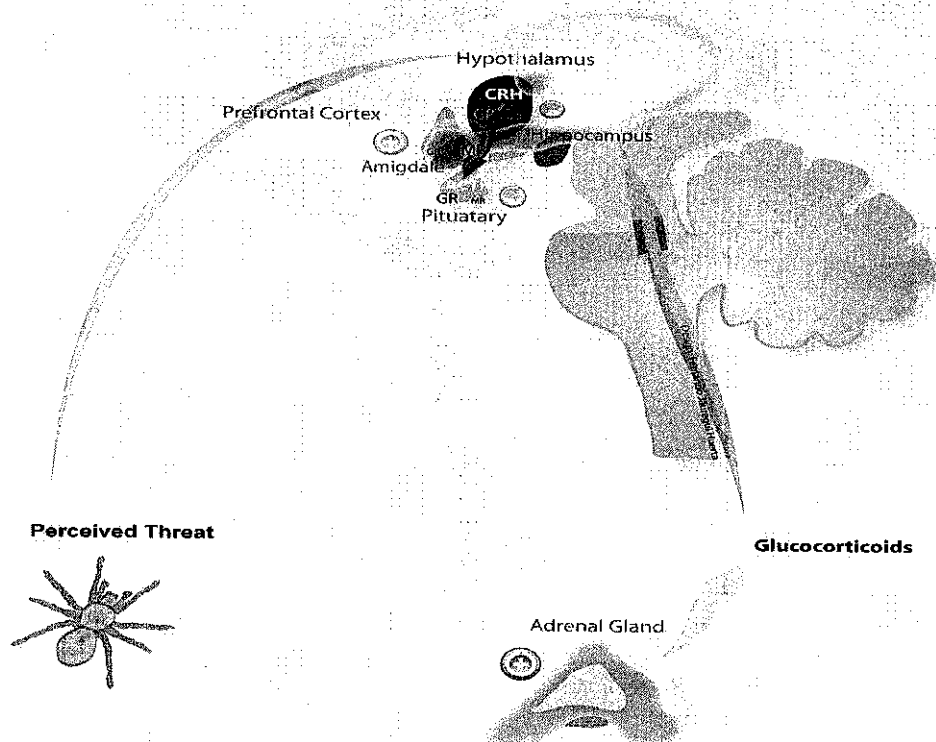


Fig A. Diagrama neuroendocrino que muestra como un estímulo percibido como amenaza, activa el eje Hipotálamo-Hipofisiario-Adrenal (HHA). El hipotálamo libera la hormona liberadora de la corticotropina (CRH), que facilita la liberación de la hormona Adrenocorticotropa (ACTH) por la hipófisis, esta se transporta por la sangre y estimula la liberación de glucocorticoides (GCs) en la glándula suprarrenal. Los GCs regulan el eje HHA por un mecanismo de retroalimentación negativa que involucra estructuras del sistema límbico, incluido el hipocampo. Los receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) median la acción genómica de GCs y son expresados de manera diferencial en estructuras cerebrales (Jáuregui-Huerta F., 2008).

Existen dos mecanismos por los cuales se inhiben GCs; uno de acción rápida (antes de 30 min) dependiente de la tasa de elevación de corticosterona en sangre a través de receptores de membrana, y no implica síntesis de proteínas. El otro depende de los niveles totales de GCs liberados horas después, su mecanismo de acción es genómica y los GCs suprimen la síntesis de CRH y ACTH (de Kloet et al., 1999).

La afinidad de los MR para unir GCs es aproximadamente 10 veces más alta que la afinidad de los GR. Mientras que los MR se encuentran ampliamente ocupados (70-80%) en condiciones fisiológicas en las que los niveles circulantes de corticosteroides son bajos, los GR sólo muestran una baja ocupación (10%). Sin embargo, cuando los niveles de corticosteroides se elevan (situaciones de estrés), la activación de los GR se incrementa considerablemente (de Kloet, 2003). Al unirse a su ligando sufren un cambio conformacional, se translocan hacia el núcleo, se dimerizan y se unen a un elemento de respuesta a glucocorticoides (GREs) para modular la expresión de genes a menudo asociados a co-activadores o co-represores (Webster y Cidlowski, 1999). El balance de las acciones de corticoides mediadas por los MR y GR resulta particularmente crítico para el control de la homeostasis.

Los receptores MR y GR están localizados en diversas zonas del cerebro, principalmente en estructuras del sistema límbico como hipotálamo, hipocampo, amígdala, corteza prefrontal, núcleo de la estría terminal y núcleo del tracto solitario, que participan tanto en la activación como regulación del eje HHA frente la respuesta al estrés, además; han sido relacionados con procesos de aprendizaje, memoria y estados afectivos (Sandi, 2003).

Existen proyecciones tanto inhibitorias como excitatorias provenientes del hipocampo, amígdala y corteza prefrontal que ejercen una regulación compleja y topográficamente organizada por vías de relevo, que inervan neuronas parvicelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo, que modulan la activación del eje HHA. El hipocampo y la corteza prefrontal juegan un papel mayormente inhibitorio en la activación del eje HHA, mientras que la amígdala está implicada en la secreción de glucocorticoides mediante vías excitatorias (Jacobson y Sapolsky, 1991, Feldman et al., 1995).

Las estructuras antes mencionadas, además de poseer una amplia distribución de receptores para glucocorticoides, también participan en la regulación de conductas y procesos cognitivos relevantes para la sobrevivencia del organismo; entre ellos, el aprendizaje espacial, la memoria de trabajo y la actividad exploratoria.

Sistema límbico, estrés y funciones cognitivas.

En relación a la respuesta frente al estrés, el hipocampo ha sido la estructura mejor caracterizada por su participación tanto en la modulación endocrina como en el aprendizaje, la memoria espacial y la actividad exploratoria. El *aprendizaje espacial* se refiere al proceso que permite al sujeto definir concretamente la localización de una meta en base a las relaciones espaciales entre éste y los diferentes hitos geográficos del entorno, ninguno de los cuales es esencial por si mismo (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). El aprendizaje que nos permite orientarnos en el espacio circundante (memoria espacial), es un ejemplo muy estudiado en éste tema. La prueba experimental de navegación en una piscina que contiene una plataforma de escape oculta, y que está basado en la presencia de indicadores espaciales visibles para las ratas (Morris et al., 1982), es un modelo muy utilizado para estudiar el aprendizaje aloentrico, basado en el entorno espacial de los roedores. Algunos roedores con daño en el hipocampo o sus aferencias, muestran deterioro en la ejecución en el laberinto acuático de Morris (Olton et al., 1978, Morris et al., 1982). El hipocampo además se ha relacionado con la *memoria de referencia* evaluada en laberintos, donde se reflejan aspectos procedimentales del aprendizaje de la tarea independiente del ensayo, e involucra localizaciones espaciales (Frick et al., 1995, Shukitt-Hale et al., 2004).

La amígdala se relaciona con estrés y aprendizaje casi tanto como el hipocampo, está asociada con aspectos de respuesta emocional, así como aprendizaje relacionado a eventos emocionales, especialmente *aversivos*. En general; la amígdala permite que los eventos emocionales desagradables sean los mejor recordados. Un tipo de memoria que se relaciona con esta estructura es la *memoria no declarativa*, la cual se refiere a la información que nos permite ejercer hábitos cognitivos o motores (Morgado, 2005). Un ejemplo muy estudiado en el laboratorio es el modelo de miedo condicionado en ratas (altamente dependiente de la amígdala), (Roozendaal et al., 1996).

La corteza prefrontal está involucrada en procesos cognitivos que generalmente se les denomina funciones ejecutivas. Esta estructura se asocia a la *memoria de trabajo*, conceptualmente diferente de la memoria de corto plazo. Se relaciona con la capacidad para usar información mnésica para planear y organizar la acción futura (Morgado, 2005). Anatómicamente involucra la corteza prefrontal, y es modulada principalmente por dopamina. Las tareas de alternancia con demora son útiles en su evaluación. El laberinto en T con adaptaciones es un método común en la evaluación del aspecto espacial de la memoria de trabajo (Mizoguchi et al., 2000). Adicionalmente se ha utilizado un modelo que combina el laberinto acuático (Morris et al., 1982) y el laberinto radial (Olton et al., 1978), para evaluar simultáneamente memoria de referencia y memoria de trabajo (Shukitt-Hale et al., 2004).

Los glucocorticoides han sido identificados como moduladores importantes de los tres tipos principales de memoria, siguiendo un patrón de U invertida ($\cap$). Este efecto está mediado por la acción de MR y GR: concentraciones muy bajas o suprafisiológicas de la hormona [los extremos de la U, ($\cap$)] inhiben la formación de la memoria; en contraparte; niveles intermedios la maximizan (parte curva superior de la U) (Sandi, 2003). De igual forma, la actividad exploratoria se modifica en relación a variaciones en la expresión de MR (Oitzl et al., 1994, Klenerova et al., 2007).

Adicionalmente a las funciones moduladas por los glucocorticoides arriba mencionadas, lo es también su capacidad para influir sobre el desarrollo y maduración de diferentes estructuras cerebrales.

Glucocorticoides y desarrollo del SNC.

Los efectos de los GCs en diferentes etapas del ciclo vital han sido estudiados siguiendo el desarrollo ontogénico cerebral de MRs y GRs. Los MR presentes principalmente en neuronas se expresan completamente hacia el final de la primera semana de vida postnatal, que coincide con la aparición funcionalmente madura de la actividad basal del eje HPA. En contraparte; los GR presentan niveles aproximados de solo un 30% de los valores del adulto durante las primeras semanas de vida postnatal, la mayor parte de ellos se encuentran concentrados en

neuronas. A medida que el cerebro madura y se incrementa la densidad de células gliales, aumentan los niveles de GR, expresándose también en la glia, hasta alcanzar niveles de adultos aproximadamente en el día 28 de edad postnatal (Fig. B). Este evento coincide con la aparición de la capacidad del sistema GR-MR para inhibir su propia activación (Edwards y Burnham, 2001).

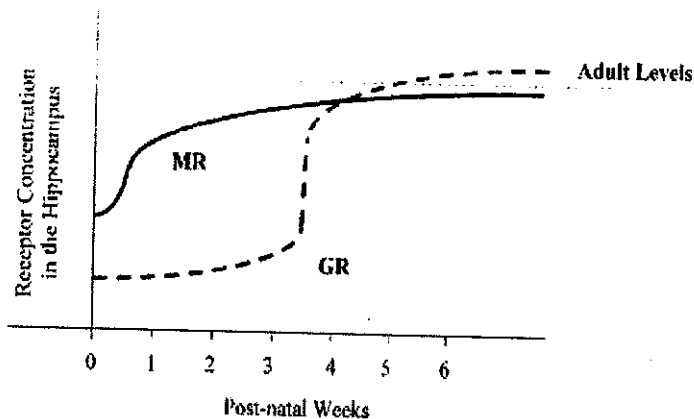


Fig. B: Ilustra el desarrollo ontogénico de MR y GR en el cerebro de rata. La madurez del sistema GR-MR se alcanza durante el curso de la tercera semana postnatal en roedores (Tomado de Edwards y Burnham, 2001).

El periodo durante el cual los GR no han alcanzado sus niveles de expresión adulta, es conocido como periodo de hiporesponsividad al estrés, y coincide con la etapa de crecimiento más rápido del cerebro (proliferación neuronal, sinaptogénesis, arborización dendrítica y ganancia de peso). Cuando los GR aumentan su expresión, disminuyen la proliferación celular, sinaptogénesis, etc. (Meaney et al., 1985).

Integrados al funcionamiento maduro del eje HHA, los GCs establecen una serie de interacciones endocrinas que repercuten sobre el crecimiento, función reproductiva, inmunidad, metabolismo y conducta (O'Connor et al., 2000).

Durante el envejecimiento existe una estrecha correlación entre el decline comúnmente observado de funciones asociadas a la actividad hipocampal, y un cambio en los niveles de hormonas esteroideas, entre ellas, los GCs. En muchas especies, el envejecimiento compromete la capacidad de aprendizaje y la habilidad para recordar entornos espaciales; -ambas funciones estrechamente relacionadas con la actividad hipocampal (Bohbot et al., 1998).

Además, existen numerosas evidencias de cambios neuroquímicos y neurofisiológicos asociados a la edad, que pueden contribuir al decline cognitivo (Miller y O'Callaghan, 2003).

De esta forma, se ha establecido que los glucocorticoides y el estrés, son capaces de incidir en el desarrollo del SNC y cambiar de manera transitoria o permanente funciones como el aprendizaje, memoria espacial y actividad exploratoria.

En la actualidad se realizan un gran número de trabajos de investigación utilizando diversos modelos de estrés de origen sistémico y psicológico como; inmovilización, restricción de movimientos, ruido, nado forzado, etc., mismos que no necesariamente generan daño real al organismo, pero si contienen un componente emocional, y son capaces de estimular la activación de la respuesta frente a estrés.

Vías auditivas y sistema endocrino.

Una importante función del aparato auditivo es servir como sistema de alertamiento contra el peligro para asegurar la sobrevivencia, esta tarea se realiza en el SNC, allí se procesan la intensidad y la frecuencia del sonido comparándola con experiencias previas y así se desencadenan una serie de reacciones, que son determinadas de acuerdo a parámetros de significado, predictibilidad y en menor grado, el nivel del sonido. Estas características determinarán si el sonido sería percibido como un componente aceptable, o como ruido (Waye, 2003).

El sistema auditivo sirve para mantener la activación de proyecciones cerebrales a la corteza temporal y al sistema reticular activador vía el sistema límbico y el hipotálamo, de esta manera los procesos cognitivos y emocionales interactúan con los estímulos auditivos influenciando los estados de conciencia (Westman y Walters, 1981).

En el curso de la evolución, el sonido ha evocado emociones y acciones a través de conexiones directas del oído interno a mecanismos neurales de lucha o huida por vía del sistema nervioso autónomo (SNA). Al parecer, el SNC cuenta con dos vías de entrada

auditivas, una directa que va del oído interno a la corteza auditiva y otra indirecta al sistema reticular activador, que conecta al sistema límbico y otras partes del cerebro, al SNA y al sistema neuro-endocrino (Cohen et al., 1977).

Además; el oído interno cuenta con otras conexiones indirectas a centros cerebrales que controlan respuestas fisiológicas, emocionales y comportamentales. Los impulsos provocan la activación del sistema reticular, desencadenando incluso otras señales que se propagan a centros cerebrales superiores que controlan la alerta, cognición y ejecución motora. Al mismo tiempo, el sistema reticular activador conduce impulsos a centros hipotalámicos del SNA, los cuales están ligados al sistema neuroendocrino simpático-adrenal y de ese modo regula la secreción de catecolaminas; adrenalina y noradrenalina. Los impulsos conducidos por el sistema reticular activador también son transmitidos al sistema HHA el cual secreta corticosteroides (Westman y Walters, 1981).

En este sentido, se ha desarrollado el concepto de *estresor* ambiental para caracterizar condiciones ambientales estresantes tales como ruido comunitario (Campbell, 1983); contrario a simples situaciones estresantes, llamadas problemas de la vida cotidiana (Lazarus y Cohen, 1977). Los *estresores* ambientales se caracterizan por ser crónicos, valuados negativamente, perceptibles físicamente e intratables al sólo esfuerzo de modificarlos (Campbell, 1983).

Está bien demostrado que la capacidad de aprendizaje y memoria se ven alteradas en condiciones especialmente estresantes. Sin embargo; el cerebro no solo codifica información y controla la respuesta conductual al estrés, sino que también es modificado estructuralmente por esas experiencias.

ANTECEDENTES

La etapa de desarrollo es de suma importancia para la conducta del adulto. En la actualidad existen numerosas evidencias que relacionan al estrés presente en la vida temprana con una gran variedad de alteraciones en sistemas cerebrales específicos implicados en la maduración cognitiva (Weller et al., 1988, Lemaire et al., 2000, Weinstock, 2001, Welberg y Seckl, 2001, Maccari et al., 2003, Shors, 2006, Rice et al., 2008, Weinstock, 2008). En este sentido, se sabe que en individuos jóvenes, la experiencia estresante produce alteraciones en habilidades cognitivas que pueden ser permanentes.

Algunos estudios experimentales examinan el impacto a largo plazo de la experiencia temprana usualmente enfocándose en dos estados: estrés gestacional (Hayashi et al., 1998, Lemaire et al., 2000, Lordi et al., 2000, Aleksandrov et al., 2001, Weinstock, 2001, Griffin et al., 2003, Bowman et al., 2004, Bethus et al., 2005, Kim et al., 2006, Son et al., 2006, Bergman et al., 2007, Hosseini-Sharifabad y Hadinedoushan, 2007, McPherson et al., 2007, Wu et al., 2007, Yaka et al., 2007, Weinstock, 2008, Zuena et al., 2008), y estrés postnatal temprano, incluyendo manipulación (handling) de las crías y madre durante el periodo de destete (Heim y Nemeroff, 1999, Frisone et al., 2002, Koo et al., 2003, Brunson et al., 2005, Sloten et al., 2006, Tang et al., 2006, Aisa et al., 2007, Kosten et al., 2007, Leventopoulos et al., 2007, McPherson et al., 2007, Stamatakis et al., 2008).

En ratas en gestación por ejemplo, se ha visto que tanto la exposición a estrés como la manipulación con glucocorticoides sintéticos generan alteraciones conductuales y morfológicas (Owen et al., 2005, Meaney et al., 2007). Incluso, se ha encontrado que estresar hembras gestantes deteriora permanentemente la capacidad de aprendizaje de sus crías pues el déficit se observa incluso si se evalúan cuando son adultas (Weinstock, 2001, Darnaudery et al., 2006).

Otros estudios han evidenciado que durante la etapa de amamantamiento, el estrés deteriora la capacidad de aprendizaje y memoria espacial (Frisone et al., 2002). Adicionalmente a la evaluación de alteraciones como aprendizaje y memoria, la investigación sobre las consecuencias conductuales de la exposición a estrés, ha enfocado algunos trabajos a la evaluación de la actividad exploratoria de ratas estresadas en diferentes etapas de la vida. En algunos de éstos trabajos se ha visto que si se exponen ratas prepúberes a estrés por aislamiento

y se evalúan en la prueba del campo abierto cuando son adultas, los niveles de actividad exploratoria son menores, a diferencia de ratas que son aisladas después de la pubertad (Arakawa, 2007).

En este sentido, algunos investigadores han sugerido que el tiempo comprendido entre el nacimiento y la adolescencia de la rata corresponde a la niñez en el humano debido al incremento en la independencia, conducta social y la inmadurez sexual vistas en estas ratas prepuberes (Spear, 2000, Avital y Richter-Levin, 2005, McCormick y Mathews, 2007).

Es sabido que además del periodo de desarrollo en el cual se presenta el evento estresante y la experiencia previa, el tipo de estímulo es lo que determina los cambios conductuales que produce el estrés. Originalmente se pensaba que todos los estímulos provocaban las mismas reacciones en el organismo (*Teoría de la inespecificidad*) (Selye, 1998), sin embargo; recientemente se han aportado evidencias que apoyan la idea de que cada estímulo tiene efectos diferentes (*Teoría de la especificidad*) (Pacak y Palkovits, 2001). De esta forma, se espera que exista diferencia entre la respuesta fisiológica que un estímulo procesativo produce (aislamiento, derrota social, etc) de la que genera un estímulo puramente sistémico (frío, infección, etc.).

Los resultados de varios estudios sugieren que la exposición a un *estresor* ambiental particularmente crónico puede modificar la habilidad de un individuo para adaptarse física o psicológicamente a otro estímulo estresante. Algunos estudios demuestran que ratas que han sido expuestas repetidamente a restricción muestran una respuesta de glucocorticoides exagerada ante un nuevo estrés de intensidad media, muchas semanas después de que la restricción ha finalizado (Harris et al., 2004). Si adicionalmente la experiencia estresante se produce durante el desarrollo temprano, la posibilidad de producir cambios duraderos en la conducta del sujeto es aun mayor.

En relación a lo anterior; es sabido que el hipocampo, una estructura fuertemente relacionada con la regulación del organismo a la respuesta de estrés y particularmente relevante para el aprendizaje y la memoria, continúa su desarrollo en la rata aun después de las primeras semanas de vida durante la adultez temprana, y que este crecimiento es vulnerable a estrés crónico (Isgor et al., 2004).

Ciertas tareas cognitivas que involucran el uso de aprendizaje espacial, son selectivamente afectadas por estrés crónico (Sandi y Pinelo-Nava, 2007). En este sentido, es sabido que la elevación crónica de hormonas glucocorticoides producida por estrés mediatiza tales efectos (McEwen et al., 1986, Oitzl y de Kloet, 1992, Oitzl et al., 1994, de Kloet et al., 1999, Sandi, 2003). Incluso algunos trabajos han probado que la actividad del eje HHA puede ser reprogramada por exposición crónica a estrés en la vida fetal o en las primeras semanas de vida, cambiando de manera permanente la respuesta neuroendocrina al estrés (Edwards y Burnham, 2001, Aisa et al., 2007, McPherson et al., 2007). Tal disregulación hormonal llevada a cabo por condiciones adversas de la vida durante el desarrollo postnatal temprano puede ser altamente perjudicial para las funciones cognitivas y la respuesta del eje HHA a estrés posterior (Owen et al., 2005, Sloten et al., 2006, Meaney et al., 2007).

El estrés crónico en la sociedad moderna en gran parte se debe a factores ambientales, en los humanos la fuente de estrés más común es el ambiente social (Bartolomucci et al., 2005). Un ejemplo de esto es la contaminación por ruido, de acuerdo a su naturaleza perturbadora ha sido identificado como un factor clave de desarrollo de desórdenes relacionados a estrés (Maschke et al., 2000).

El progresivo aumento de ruido durante la vida diaria ha conducido a un incremento en la atención científica a este respecto. En la actualidad, se han generado diversos modelos de ruido artificial (tonos puros, ruido de banda ancha) por medio de los cuales se han probado efectos deteriorantes del ruido sobre perfiles neuroendocrinos y conductuales (Kim et al., 2006, Manikandan et al., 2006, Samson et al., 2007). A este respecto, Rabat y colaboradores desarrollaron una adaptación de ruido ambiental al audiograma de la rata, demostrando sucesivamente los efectos deteriorantes del ruido agudo y crónico sobre el sueño y la memoria (Rabat et al., 2005, 2006). En el caso de la rata, se ha visto que el umbral de tolerancia a la intensidad del ruido es 90 dB; arriba de este nivel surge una elevación significativa de GCs en plasma, por lo que algunos estudios han utilizado niveles de 105 dB teniendo como resultados cambios comportamentales considerablemente significativos (Campeau y Watson, 2000).

Si el ruido es presentado de manera crónica, produce un deterioro en la capacidad de memoria espacial que se corresponde con elevación en los niveles de GLCs y alteraciones en la

morfología dendrítica del hipocampo y la corteza prefrontal medial (Manikandan et al., 2006, Samson et al., 2007). Más recientemente, se estandarizó un modelo de ruido para ratas que reproduce con precisión los sonidos comúnmente estresantes para el humano tomando como base el tipo de ruido generado por vehículos, máquinas o turbinas de avión (Rabat et al., 2005).

El ruido ambiental representa entonces una fuente segura y relativamente inexplorada de estrés, el cual tiene efectos deteriorantes que podrían ser acentuados por la exposición durante el desarrollo temprano.

Como ya se ha mencionado anteriormente, un número considerable de investigaciones sugieren que el desarrollo temprano es un periodo de especial sensibilidad al estrés, por lo menos en relación a sus efectos sobre habilidades cognitivas. Adicionalmente, el desarrollo implica la continua confrontación con experiencias aversivas que suelen presentarse en periodos diferentes de la vida del sujeto. Sin embargo, pocos estudios son los que han abordado las consecuencias conductuales del estrés en relación a la experiencia previa (estrés repetido) y el desarrollo. La mayoría de las investigaciones hacen referencia a las consecuencias inmediatas de la exposición a un periodo más o menos duradero de estimulación aversiva.

Recientemente comenzó a ponerse atención en el tema de la exposición repetida a estímulos estresantes, y se ha sugerido que factores como la intensidad del estímulo estresante, la hormona involucrada en la medición, el periodo de tiempo transcurrido entre una medición y otra, y de manera especial; la experiencia previa con estímulos del mismo (homotípicos) o diferente tipo (heterotípicos), son determinantes para los resultados de esos experimentos (Armario et al., 2004). Por ejemplo, ahora se sabe que la respuesta de las hormonas efectoras de eje HHA se reduce cuando el animal que ha sido estresado, algunos días después es confrontado con la misma situación estresante (*estresor homotípico*) a la que previamente había sido expuesto, sin embargo; cuando la exposición subsecuente (*reexposición*) implica un agente diferente (*heterotípico*), se incrementa la respuesta registrada en el periodo posterior (Valles et al., 2003).

Dicho de otra forma, mientras para algunos estímulos la experiencia previa parece producir habituación, para otros suele tener un efecto de sensibilización por lo menos al evaluar la actividad de las principales hormonas involucradas en la respuesta de estrés (ej. aumento en la expresión del gen CRH en PVN, del POMC en la hipófisis anterior, hipertrofia adrenal, etc), (Armario et al., 2004).

Por el contrario, en el plano conductual se sabe relativamente poco acerca del efecto de la experiencia previa sobre la respuesta a nuevos eventos estresantes. Sin embargo; se ha probado ampliamente que el estrés crónico o intenso modifica el rendimiento de ratas en tareas de memoria hipocampo dependiente (aprendizaje y memoria espacial) (Sandi, 2003), memoria amigdalina (condicionamiento de miedo) (Kim et al., 2006), memoria relacionada a estructuras frontales (memoria de trabajo) (Mizoguchi et al., 2000) y actividad exploratoria (Arakawa, 2007).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aprendizaje, la memoria y la actividad exploratoria son capacidades cognitivas que se afectan en respuesta a situaciones estresantes, se sabe que esas funciones se modifican dependiendo de diferentes factores como; intensidad, duración y etapa de la vida del sujeto en la que sucede el estímulo estresante.

Desde hace algunos años se han evaluado los efectos a largo plazo que provoca el estrés sobre la conducta y habilidades cognitivas. Actualmente hay algunos trabajos encaminados a evaluar los efectos del estrés en sujetos adultos, que durante su desarrollo temprano fueron sometidos a una situación estresante de la misma naturaleza, o con características diferentes, en donde se ha visto alteración en aprendizaje y memoria espacial y memoria de trabajo. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han utilizado modelos experimentales con ruido blanco, restricción de movimientos, inmovilización, etc., que se asemejan pobremente a situaciones comúnmente estresantes en el humano, o que solamente suceden de forma excepcional. Por otra parte, la mayoría de estos estudios han sido realizados en etapas muy tempranas de la vida de la rata, tanto en etapa gestacional, como de amamantamiento sin tomar en cuenta el periodo prepuberal (a partir del destete y previo al periodo de pubertad) que asemeja la infancia en el humano.

Por lo anterior, en este estudio nos propusimos evaluar si se produjeron efectos acumulativos en el aprendizaje espacial por la exposición a dos modelos estresantes de diferentes características (ruido ambiental y amenaza por depredador/plataforma elevada), presentados en diferentes periodos de la vida del sujeto, además se analizaron la memoria de referencia, memoria de trabajo y la actividad exploratoria. Adicionalmente medimos niveles de corticosterona como indicador de que los estímulos tuvieron un efecto estresante.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos independientes y sumatorios generados por la exposición de ratas machos a estrés crónico por ruido ambiental en la vida temprana y estrés agudo por depredador/plataforma elevada en la vida adulta sobre aprendizaje espacial, memoria de referencia, memoria de trabajo y actividad exploratoria.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar la potencia del estímulo estresante a través de cuantificación de los niveles séricos de corticosterona en diferentes momentos:

- a. Al finalizar la exposición crónica al ruido ambiental (día 21-36 postnatal).
- b. Después de la exposición a estrés agudo por depredador (olor a orina/presencia de gato y permanencia en una plataforma elevada inestable por 30 min, día 91 pn).
- c. Por la suma consecutiva de ambos estímulos en dos momentos de la vida de las ratas; después del ruido ambiental (36 pn) y de la exposición a depredador en la etapa adulta (90 pn).

2.- Analizar la capacidad de aprendizaje espacial, la memoria de referencia y de trabajo (laberinto acuático radial de ocho brazos); y actividad exploratoria en los animales sometidos a los dos tipos de estrés en los siguientes tiempos:

- a. Durante los 5 días siguientes (36-41 pn) de haber concluido la etapa de estrés crónico por ruido en el desarrollo temprano.
- b. Tras la exposición a estrés agudo en la vida adulta (91 pn).

HIPÓTESIS

a) Ruido crónico en ratas inmaduras.

1.- La exposición de ratas machos recién destetadas (21 días de edad) a ruido ambiental durante 15 días, reducirá la actividad exploratoria y afectará su rendimiento en tareas de aprendizaje espacial y memoria de trabajo.

b) Efectos a largo plazo del ruido ambiental.

2.- El grupo de ratas expuestas solo a ruido ambiental en etapa temprana (21-36 pn) y evaluadas en edad adulta (segunda etapa experimental) mostrará mayor actividad exploratoria y menor capacidad para aprendizaje espacial, comparado con las ratas que además fueron sometidas a estrés por amenaza de depredador/plataforma elevada.

c) Estrés agudo en ratas maduras.

2.- Las ratas machos adultas que fueron sometidas a un episodio de estrés agudo intenso por la combinación de plataforma elevada inestable y amenaza por depredador mostrarán deterioro en el desempeño de tareas relacionadas con actividad exploratoria, aprendizaje espacial y memoria de trabajo.

a+c) Doble estrés; crónico temprano y agudo en la vida adulta.

3.- Los efectos sumatorios de una doble experiencia estresante; ruido ambiental durante el desarrollo temprano, seguido de estrés agudo por amenaza de depredador en la vida adulta, incrementarán la actividad exploratoria, y mejorarán la habilidad de aprendizaje y memoria de trabajo de estas ratas, comparadas con aquellas que sólo fueron sometidas a un solo episodio de estrés.

Corticosterona.

4.- El grupo experimental de la primera etapa RA mostrará incremento significativo, comparado con el grupo control en ratas jóvenes. Mientras que en los grupos adultos EAD y RA+EAD, se observará mayor incremento en esta hormona, a diferencia de los grupos no estresados en la segunda etapa CA y ELRA.

MATERIALES Y METODOS.

Animales de experimentación.

Fueron seleccionadas 72 ratas *Swiss-Wistar* machos recién destetados de 21 días de edad, procedentes del bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, CIBO, IMSS. Permanecieron alojadas en jaulas de 45 cm x 29 cm, en grupos de 5, cama de aserrín y mantenidas a 22 ± 2 °C de temperatura, humedad relativa del ambiente entre 55-60 %, ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h; alimentadas con dieta balanceada para roedores (*Ralston-Rations USA*); y agua purificada. Proyecto aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Neurociencias de la Universidad de Guadalajara.

Desde el comienzo de la *primera etapa experimental* (día 21 pn) y hasta el comienzo de la *segunda etapa experimental* (día 90 pn), las ratas de cada uno de los grupos fueron pesadas cada 3 días, para posteriormente hacer un análisis y comparación de la ganancia de peso entre el grupo expuesto a ruido ambiental y el grupo control.

PROCEDIMIENTO

1ª Etapa: Estrés por ruido ambiental en ratas recién destetadas (21-35 días pn).

El día 21 pn las 72 ratas fueron separadas aleatoriamente en 2 grupos con la siguiente distribución:

- 1 **Grupo control (C):** Compuesto por 36 ratas, fueron mantenidas en condiciones habituales de bioterio.
- 2 **Grupo ruido ambiental (RA):** 36 ratas recién destetadas (21 días pn) fueron sometidas a estrés por ruido ambiental durante 15 días, a intensidades entre los 85 y 105 dB (Rabbat et al., 2004), durante el ciclo de actividad nocturna de la rata (20:00-08:00 h), en rangos aleatorizados de 7 a 49 s, con intervalos silenciosos de 22 a 190 s, hasta completar 12 h diarias de ruido. Una vez finalizado este periodo de estrés (día 36); tres ratas controles y tres estresadas por ruido fueron sacrificadas (ver descripción más adelante), para registrar los niveles séricos de CORT (*vide infra*).

El día 36-40 pn, se evaluaron nueve ratas de cada grupo (*control y ruido*) en la prueba de laberinto acuático radial de ocho brazos (días 36-39 pn), y en la prueba de campo abierto "Open Field" (día 40 pn). Las 54 ratas restantes permanecieron en condiciones estándar de bioterio durante los días 36-89 pn. El día 90 fue subdividido cada uno de los grupos descritos arriba; por lo que se formaron de esta manera un total de cuatro grupos, los cuales fueron sometidos a diferentes condiciones experimentales en una segunda etapa experimental, y denominados de la siguiente manera:

2ª Etapa: Exposición a depredador en la edad adulta: (90 días pn).

1 **Grupo control adulto (CA):** De las 24 ratas integrantes del grupo control, a partir de la segunda etapa se hicieron dos grupos de 12, y se mantuvieron intactas en condiciones habituales de bioterio hasta finalizar el estudio.

2 **Estrés agudo por depredador (EAD):** Las 12 ratas restantes del grupo control inicial, fueron sometidas a estrés agudo a los 90 días de edad. Para ello fueron colocadas individualmente en una plataforma elevada durante 30 min, y al mismo tiempo expuestas a olor de orina de gato. *Este grupo nos permitió conocer los efectos del estrés en ratas adultas expuestas por primera vez.*

3 **Efecto a largo plazo de ruido ambiental (ELRA):** Del grupo experimental inicial (sometidas a ruido ambiental en la vida temprana), se separó un grupo de 12 ratas y permanecieron el resto del estudio en condiciones habituales de bioterio, sin volverse a estresar. *Este grupo nos permitió conocer si el estrés temprano por ruido provocó efectos duraderos.*

4 **Re-exposición (RA+EAD):** Las ratas restantes del grupo inicialmente sometido a ruido ambiental a partir del destete fueron expuestas nuevamente a estrés agudo por depredador en las mismas condiciones descritas para el grupo EAD. *Este grupo nos permitió conocer los posibles efectos sumatorios de estrés crónico por ruido, y agudo por amenaza de depredador en las ratas adultas.*

Finalizada esta segunda etapa (día 90 pn), fueron sacrificadas 3 ratas de cada uno de los grupos pertenecientes a cada una de las cuatro condiciones experimentales, para cuantificar niveles séricos de CORT (ver descripción detallada más adelante). El resto de las ratas (9 de cada condición experimental) fueron evaluadas en el laberinto acuático radial de ocho brazos durante los días 91-94 pn y en la prueba de campo abierto durante el día 95 pn (ver descripción de pruebas mas adelante).

Obtención de suero.

Al finalizar cada condición experimental se recolectaron muestras de sangre de todos los grupos. Tres ratas de cada grupo fueron sacrificadas por decapitación, y se recolectó $\approx$ 1ml de sangre en tubos BD Vacutainer SSTTM. Las muestras fueron mantenidas a temperatura 37°C en baño María y posteriormente centrifugadas a 3,000 rpm durante 10 min. Los sueros se mantuvieron almacenados a -80° C y después analizados por medio de la técnica de EIA descrita en el siguiente apartado.

Técnica inmunoenzimática “Enzyme immunoassay ” (EIA).

El ensayo inmunoenzimático se basa en el uso de antígenos o de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática, pudiendo ser revelada mediante la adición de un sustrato específico que en contacto con la enzima, producirá un color observable a simple vista y cuantificable por un lector de densidad óptica. La técnica se realizó como se describe en el *kit* de análisis para corticosterona (*Correlate-EIA*TM Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit Catalog No. 900-097 96 Well Kit). Este *kit* es un inmunoensayo competitivo para determinar cuantitativamente niveles de corticosterona en fluidos biológicos. Este *kit* utiliza un anticuerpo policlonal para ligar corticosterona de manera competitiva, el estándar de corticosterona con una molécula de fosfatasa alcalina adherida covalentemente, o la muestra problema. Después de una incubación simultánea a temperatura ambiente, el exceso de reactivos se elimina por lavado y se añade el sustrato. Después de un corto tiempo de incubación de la enzima se detiene la reacción y el color amarillo resultante se cuantifica en un lector de microplacas a 405 nm. La intensidad del color amarillo es inversamente proporcional a la concentración de corticosterona; tanto en los estándares como en las muestras. Los valores de la densidad óptica se utilizan para calcular la concentración de corticosterona.

ESTUDIO CONDUCTUAL

Laberinto acuático radial de ocho brazos (RAWM).

Esta prueba consistió en una piscina circular galvanizada de 152 cm de diámetro x 59 cm de profundidad que se llenó hasta 32 cm con agua (22 ± 3 °C). Dentro de la piscina se sumergió un laberinto con 8 brazos convergentes hacia un área abierta central, con paredes de 40 cm de alto x 43 cm de largo. La piscina, las paredes y la plataforma circular de escape (10 cm de diámetro por 30 cm de alto) fueron pintados de negro, por lo no podía verse la plataforma, ya que quedó cubierta por el agua. Se colocaron señales visuales externas al final de algunos brazos, y también dispersas a través de la cámara de prueba, -todas estas fueron utilizadas por las ratas como señales visuales para establecer una ruta de navegación en el laberinto.

Se hizo una sesión diaria durante cuatro días, los primeros tres días la plataforma se mantuvo fija a 4 cm del final del brazo 1 y el último día la plataforma se cambió al brazo 4.

Cada sesión diaria consistió de 5 ensayos con intervalos inter-ensayo de 30 min. Al comienzo de cada prueba la rata se colocó aleatoriamente con el hocico apuntando hacia las paredes en una de las siete posiciones del laberinto, (exceptuando la del brazo con la plataforma), y se le permitió nadar durante 120 seg, o hasta encontrar la plataforma de escape, si esto no sucedía durante este lapso tiempo se le colocaba sobre la plataforma y allí se le permitía permanecer durante 15 seg, luego las ratas fueron secadas con una toalla para devolverles a su jaula y permitirles que se recuperaran durante 30 min.

El RAWM permitir evaluar simultáneamente aprendizaje espacial, memoria de referencia y de trabajo.

Aprendizaje Espacial: Habilidad para adquirir una representación cognitiva de una locación en el espacio (Gallagher et al., 1988).

Memoria de referencia: Refleja aspectos del aprendizaje independiente del ensayo (localizaciones espaciales) (Fick et al., 1995).

Memoria de trabajo: Describe la habilidad para controlar la información en la memoria, es dependiente de ensayos (sitios previamente visitados) (Luine et al., 1998).

CRITERIOS DE EVALUACIÓN

- 1 Se mide la latencia en segundos.
- 2 Adicionalmente se evalúan los siguientes errores:
 - **Errores de referencia.** Entradas en brazos que no contienen la plataforma (memoria de referencia).
 - **Errores de trabajo.** Reingresos en brazos ya visitados durante el mismo ensayo (memoria de trabajo), (Shukitt-Hale et al., 2004).

Campo abierto (Open field): Ansiedad y actividad exploratoria.

Este instrumento fue diseñado para evaluar la conducta exploratoria de ratas en un ambiente novedoso y la relación de ésta con ansiedad. Es una caja cuadrada de madera blanca de 75x75cm y paredes de 60 cm de altura, con un piso transparente y sin techo. El campo fue imaginariamente dividido en 25 cuadros iguales de 15x15cm.

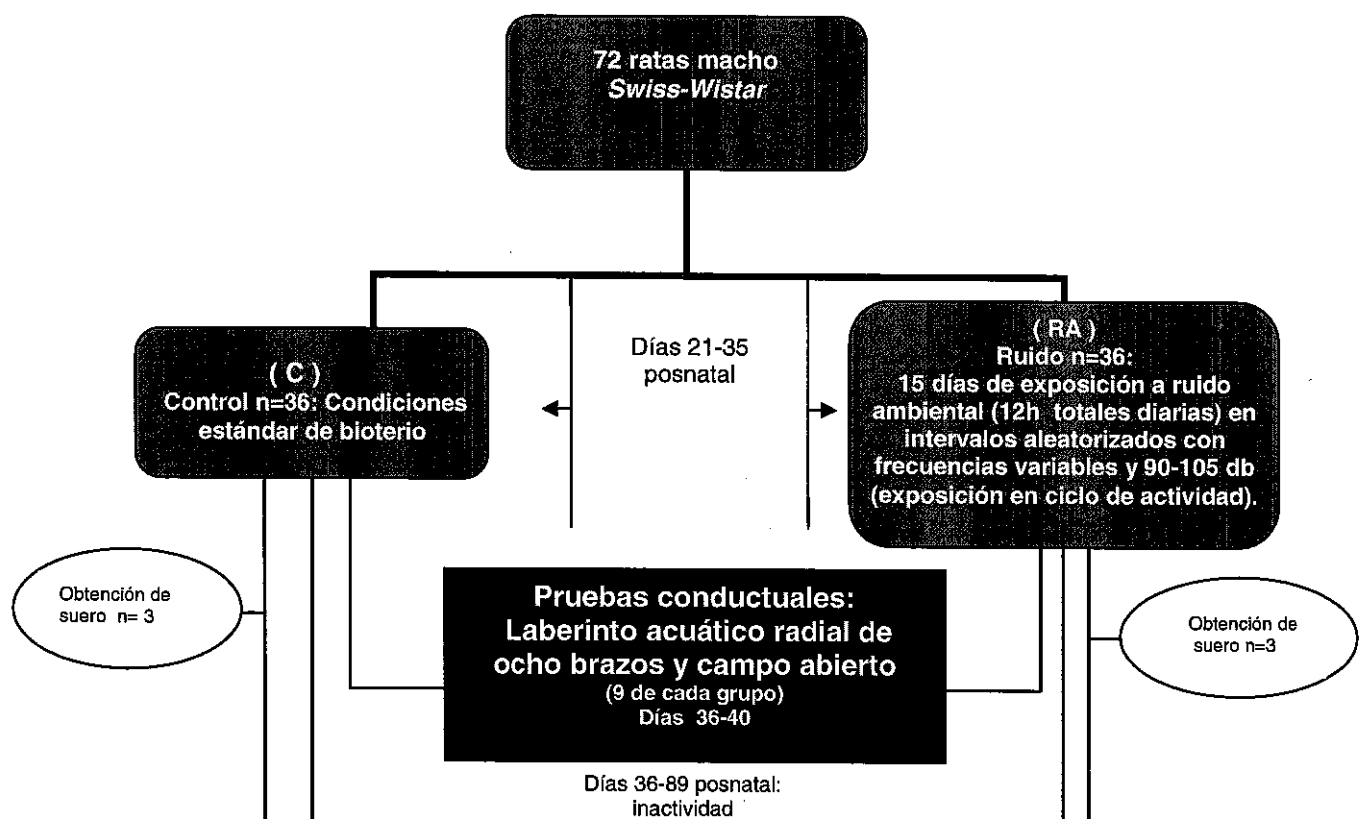
Cada rata se colocó individualmente dentro del campo abierto, y se le permitió explorar durante 6 min, la conducta de cada rata fue video-grabada con una cámara montada perpendicularmente sobre el campo abierto, y se hizo limpieza entre pruebas (Gregus et al., 2004). Este paradigma es utilizado comúnmente para evaluar los efectos ansiolíticos de fármacos y se basa en el estímulo que induce la novedad para exploración de las ratas cuando se encuentran en un ambiente desconocido (Ramos et al., 1998). Los criterios a evaluar fueron los siguientes:

- 1 Tiempo de permanencia en el área central
- 2 Tiempo de permanencia en área periférica
- 3 Tiempo de movilidad durante los seis min totales de duración de la prueba.
- 4 Porcentaje del tiempo que las ratas pasaron en “Acicalamiento y erguimiento” en el campo abierto.
- 5 Numero de bolos fecales.

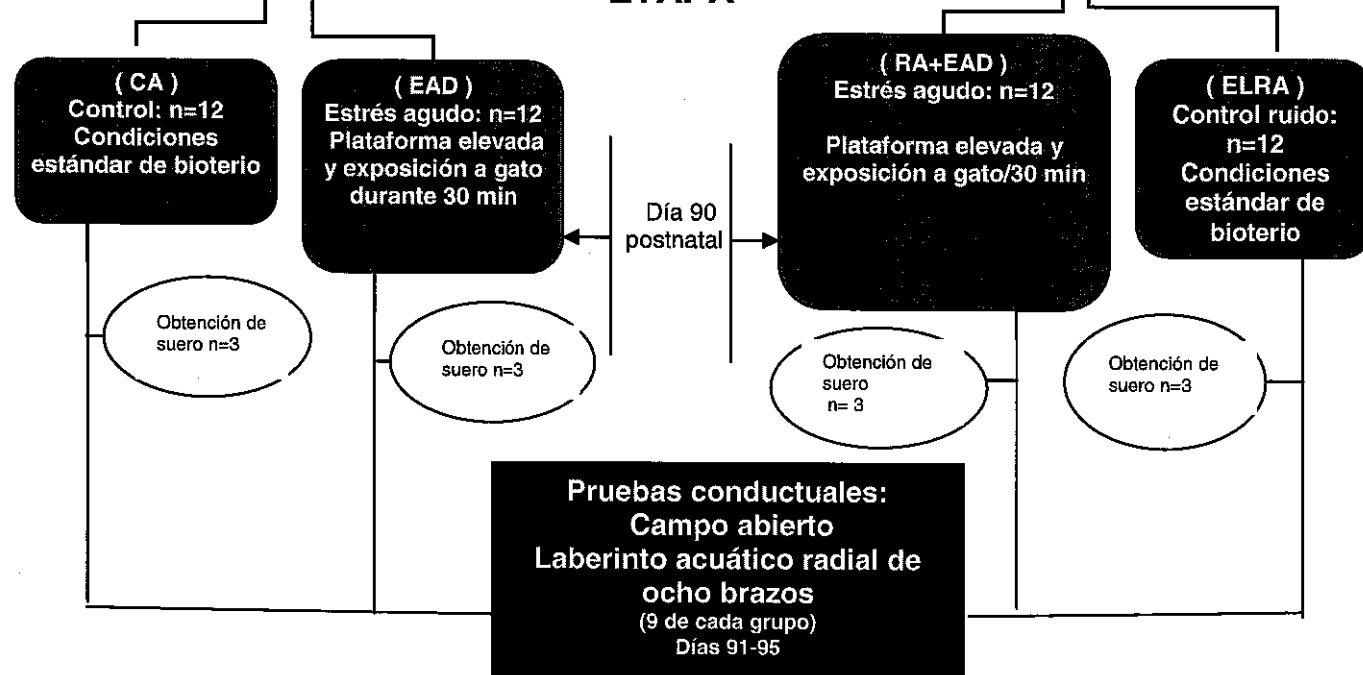
(adaptado Gregus et al., 2004)

DISEÑO EXPERIMENTAL

PRIMERA ETAPA



SEGUNDA ETAPA



RECUADRO DE METODOLOGÍA

1ra ETAPA EXPERIMENTAL: Ratas machos de 21 días expuestas a ruido ambiental durante 15 días (21-36 pn). Al finalizar se evaluaron los siguientes criterios:			
PRUEBA	CRITERIO A EVALUAR	METODO	SUJETOS
Kit Corticosteron enzyme immunoassay	Niveles de corticosterona en suero después de la exposición a ruido ambiental durante 15 días	Cuantificación de corticosterona en suero	3 Sujetos de cada grupo (36 días pn). Grupo ruido ambiental (RA) Grupo control (C)
RAWM	Aprendizaje espacial (latencia de escape) Memoria de referencia (brazos visitados antes de encontrar la plataforma "errores de referencia"). Memoria de trabajo (reingresos en brazos que no contienen la plataforma "errores de trabajo")	Realizaron la prueba durante cuatro días, los tres primeros la plataforma se mantuvo en un brazo (fase de entrenamiento) y el cuarto cambió de lugar (fase de re-aprendizaje)	9 ratas de cada grupo (36 días pn) Grupo ruido ambiental (RA) Grupo control (C)
Campo Abierto	Actividad exploratoria (tiempo de permanencia en área central, periférica y tiempo de movilidad total).	Registro del tiempo de actividad exploratoria de la rata en un ambiente novedoso durante 6 min	9 ratas de cada grupo (36 días pn) Grupo ruido ambiental (RA) Grupo control (C)
2da ETAPA EXPERIMENTAL: Ratas machos adultas de 90 días pn expuestas a estrés por depredador (90 PN). Al finalizar se evaluaron los siguientes criterios:			
PRUEBA	CRITERIO A EVALUAR	METODO	SUJETOS
Kit Corticosteron enzyme immunoassay	Niveles de corticosterona en suero después de la exposición a ruido ambiental durante 15 días	Cuantificación de corticosterona en suero	3 muestras de cada grupo (90 días pn) Grupo control adulto (CA) Grupo estrés agudo por depredador (EAD) Grupo ruido ambiental + Estrés agudo por depredador (RA+EAD) Grupo efecto duradero de ruido ambiental (ELRA).
RAWM	Aprendizaje espacial (latencia de escape) Memoria de referencia (brazos visitados antes de encontrar la plataforma "errores de referencia") Memoria de trabajo (reingresos en brazos que no contienen la plataforma "errores de trabajo")	Realizaron la prueba durante cuatro días, los tres primeros la plataforma estuvo en un brazo (fase de entrenamiento) y el día cuatro se cambió de lugar (fase de re-aprendizaje)	9 ratas de cada grupo (90 días pn) Grupo control adulto (CA) Grupo estrés agudo por depredador (EAD) Grupo ruido ambiental + estrés agudo por depredador (RA+EAD) Grupo efecto duradero de la etapa previa de estrés por ruido ambiental (ELRA).
Campo abierto	Actividad exploratoria (tiempos de permanencia en área central, periférica y movilidad total).	Cuantificación durante 6 min de la actividad exploratoria de la rata en un ambiente novedoso.	9 ratas de cada grupo (90 días pn) Grupo control adulto (CA) Grupo estrés agudo por depredador (EAD) Grupo ruido ambiental + Estrés agudo por depredador (RA+EAD) Grupo efecto a largo plazo de ruido ambiental (ELRA).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Seleccionamos aleatoriamente una muestra de 12 ratas para evaluar la ganancia de peso corporal, se utilizó el modelo lineal general y después se realizaron comparaciones por análisis de contraste ANOVA, para estimar la progresión en la ganancia de peso de los animales del grupo control y experimentales.

Los valores de corticosterona en suero fueron analizados con la Prueba U de Mann-Whitney.

Para los datos obtenidos en las dos etapas experimentales con el laberinto acuático radial de ocho brazos, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparaciones entre grupos y para la segunda etapa se realizó además un análisis con Kruskal-Wallis.

Los datos obtenidos en la prueba de campo abierto se realizaron comparaciones con la U de Mann-Whitney en cada parámetro, para establecer diferencias en la eficiencia del desempeño de los animales pertenecientes a cada situación experimental a través del estudio (Runyon y Haber, 1992).

RESULTADOS.

Efectos del ruido ambiental crónico post-destete sobre la ganancia de peso.

Se registró el peso corporal a lo largo del periodo experimental, se retrasó la ganancia de peso de ratas estresadas durante 15 días por ruido ambiental. Tal cambio fue estadísticamente significativo los días ocho (28 pn) $F(1,17) = 6.992$, $p < 0.05$ y doce (32pn) $F(1,17) = 5.687$, $p < 0.05$ de iniciado el periodo de estrés. Sin embargo; éstos animales recuperaron su peso normal al día 36 pn y se igualaron con los animales controles, permaneciendo así hasta el comienzo de la segunda etapa experimental. Fig 1.

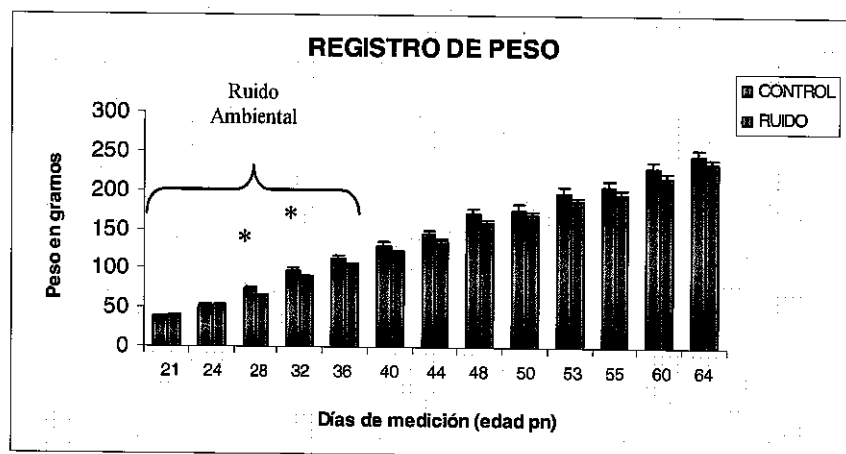


Fig. 1. Ganancia de peso corporal de ratas machos a partir del día 21 pn (comienzo de la exposición a ruido ambiental), y hasta los 60 días de edad. N=12. Se observaron diferencias significativas a los 28 $p \leq 0.018$ y 32 días $p < 0.03$.

CORTICOSTERONA.

Efectos del estrés sobre niveles séricos de corticosterona.

Se realizaron dos mediciones de corticosterona (CORT) en la primera y segunda etapa experimental con el fin de determinar que tan potente resultó ser cada estímulo estresante al que fueron expuestos nuestros grupos. En la primera etapa, se analizaron los grupos control (C) y estrés por ruido ambiental (RA), se cuantificaron los niveles de CORT al finalizar los quince días de exposición a ruido ambiental, con inicio el día 21 de edad en que se destetaron las ratas, y hasta antes de la pubertad (36 pn). El análisis estadístico U de Mann Whitney reveló diferencias significativas para CORT entre los grupos comparados $RA > C$; $U = .000$, $gl = 1$, $p < 0.05$, $N = 9$. Fig. 2a.

En la segunda etapa, se evaluaron los efectos a largo plazo (90 pn) de la exposición temprana a ruido ambiental crónico, y la posterior exposición a estrés por amenaza de depredador/plataforma elevada (RA+EAD), en comparación con animales que solo fueron expuestos a un tipo de estrés. El análisis U de Mann Whitney mostró un incremento significativo de los niveles de CORT en las ratas adultas expuestas a estrés agudo por depredador (EAD), comparadas con el grupo que permaneció como control durante todo el experimento (CA), $EAD > CA$, $U = .000$, $gl = 3$, $p < 0.05$, $N = 9$ y el grupo que solo recibió ruido ambiental en la primera etapa (ELRA); $EAD > ELRA$, $U = .000$, $gl = 3$, $p < 0.05$, $N = 9$. De la misma forma, las ratas sometidas a ruido ambiental crónico de jóvenes y estrés agudo por depredador en la adultez (RA+EAD) mostraron un incremento significativo en niveles de CORT en suero en comparación con el grupo CA; $RA + EAD > CA$, $U = .000$, $gl = 3$, $p < 0.05$, $N = 9$; y con las ratas que solamente fueron expuestas a ruido ambiental después del destete (ELRA); $RA + EAD > ELRA$, $U = .000$, $gl = 3$, $p < 0.05$, $N = 9$. Fig. 2b.

No se encontraron diferencias en niveles de corticosterona entre los animales CA y los experimentales sometidos solo a ruido ambiental en la primera etapa ELRA. De igual forma, no observamos diferencias entre el grupo expuesto a estrés en la vida temprana y la adultez, RA+EAD y aquellos que solo fueron sometidos a estrés por amenaza de depredador EAD en la vida adulta, Fig. 2b.

NIVELES DE CORTICOSTERONA EN SUERO RATAS JOVENES (36 pn)

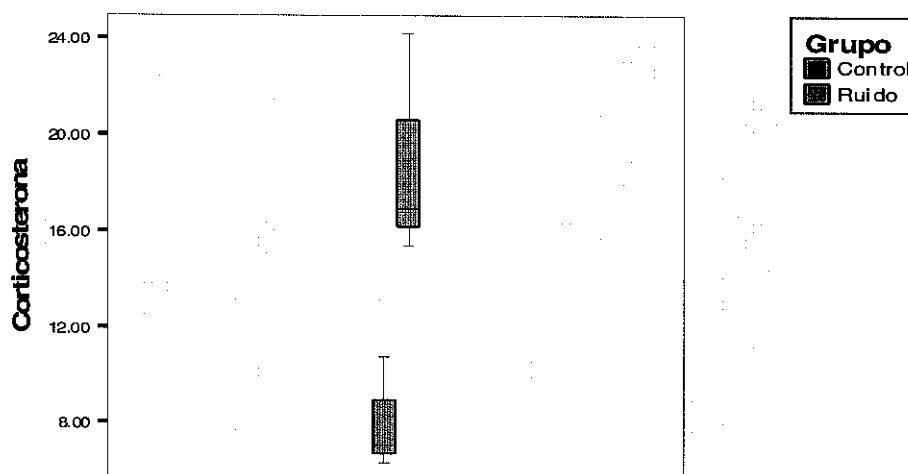


Fig 2a. El estrés por ruido ambiental elevó los niveles de corticosterona en suero. Grafica presentada en Boxplots, las marcas centrales de las barras muestran el valor de la mediana, el área hacia cada lado de la mediana representa el cuartil 2 y 3, mientras que las líneas (bigotes) señalan el cuartil 1 y 4. El muestreo de sangre para obtener los sueros se realizó a los 36 días pn, después de que las ratas fueron expuestas a ruido ambiental durante 15 días, en comparación con otras ratas controles de la misma edad ($n=9/\text{grupo}$). Estos valores se obtuvieron mediante EIA para corticosterona (*Correlate-EIA*TM Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit), y se expresaron en ng/ml). Entre estos dos grupos las diferencias fueron significativas ($p \leq 0.05$).

NIVELES DE CORTICOSTERONA EN SUERO RATAS ADULTAS (90 pn)

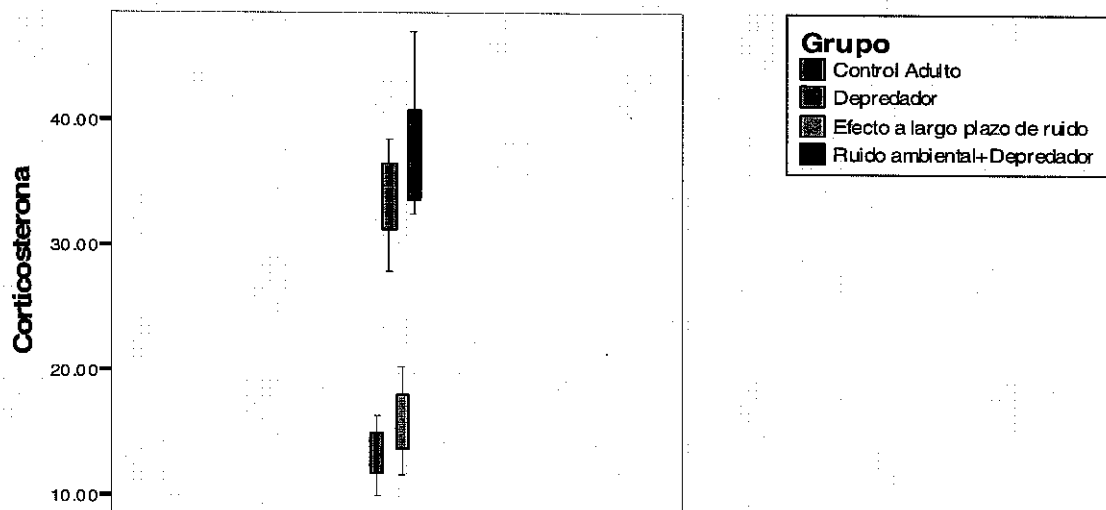


Fig 2b. Niveles séricos de corticosterona a los 90 días pn, de ratas sacrificadas después de haberse expuesto a un episodio de estrés agudo por amenaza de depredador. Grafica presentada en Boxplots. Fueron comparados los siguientes grupos; CA; EAD; RA+EAD; y ELRA ($n=9/\text{grupo}$). Estos niveles fueron determinados por EIA para corticosterona (*Correlate-EIA*TM Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit) (ng/ml). Resultó diferencia significativa entre los grupos CA<EAD $p \leq 0.05$; CA<RA+EAD $p \leq 0.005$; ELRA<EAD $p \leq 0.005$ y ELRA<RA+EAD $p \leq 0.05$.

EVALUACIÓN DE APRENDIZAJE ESPACIAL EN RATAS JÓVENES Y ADULTAS, EN EL LABERINTO ACUATICO RADIAL DE OCHO BRAZOS.

Efectos del ruido ambiental sobre aprendizaje y memoria de ratas jóvenes.

Las habilidades cognitivas se evaluaron a través del aprendizaje de una tarea durante cinco ensayos en tres días (1-3), adicionalmente se evaluó el desempeño en un cuarto día la capacidad para re-aprender la tarea con una nueva configuración espacial. Durante los cuatro días de la prueba RAWM, se analizaron los siguientes criterios Latencia de escape “aprendizaje espacial” (Fig. 3), errores de referencia “memoria de referencia” (Fig. 4) y errores de trabajo “Memoria de trabajo” (Fig. 5).

Comparaciones realizadas con la prueba U de Mann Whitney revelaron que el grupo RA mostro una tendencia a aprender con mayor rapidez la tarea espacial comparada con el grupo C (día 1-3), sin embargo, no fue estadísticamente significativo (Fig.3). No obstante, encontramos un efecto similar para la memoria de referencia, en donde el grupo RA visito menos brazos antes de encontrar la plataforma, cometiendo menos errores de referencia, esta diferencia solo fue significativa para el día 1 y 3, $RA < CA$ $U=23.500$, $gl=1$, $p < 0.043$ y $U=18.000$, $gl=1$, $p < 0.015$, $N=9$ respectivamente (Fig.4). Adicionalmente fue evaluada la memoria de trabajo, en donde pudimos observar el mismo comportamiento mencionado anteriormente, las ratas pertenecientes al grupo RA reingresaron un menor número de veces a brazos que ya habían visitado durante el mismo ensayo, mostrando así menos errores de trabajo en los ensayos de los días 1-3, aunque sólo fue evidente en el día 1 $RA < CA$ $U=22.500$, $gl=1$, $p < 0.035$; y 2 $RA < CA$ $U=22.500$, $gl=1$, $p < 0.035$, $N=9$ (Fig. 5).

En la evaluación de la capacidad para re-aprender la tarea (día 4) cuando la plataforma fue cambiada del brazo 1 al 4, el análisis U de Mann-Whitney reveló que el grupo RA, a diferencia de la etapa de aprendizaje, incrementaron el número de errores de trabajo con respecto al grupo control $RA > CA$ $U=10.500$, $gl=1$, $p < 0.002$, $N=9$ (Fig. 5).

APRENDIZAJE ESPACIAL RAWM RATAS JOVENES (36-39 pn)

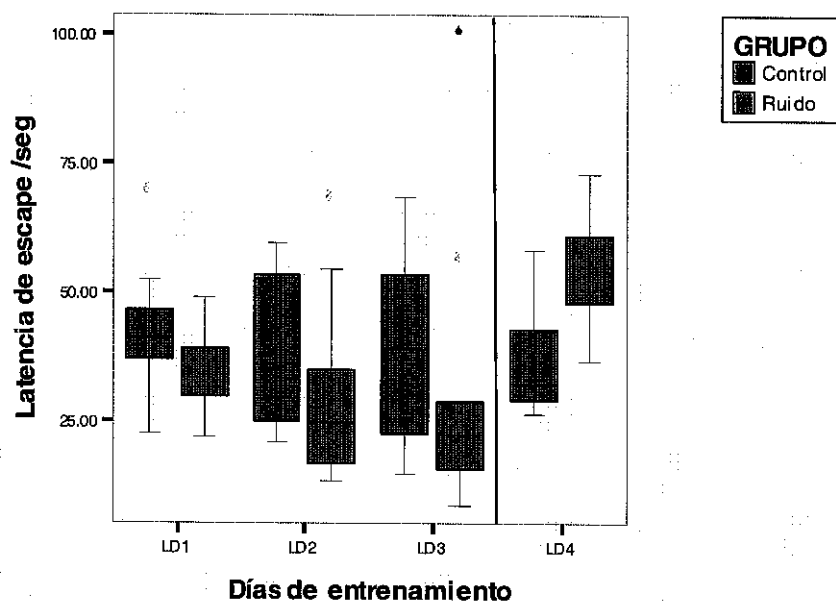


Fig 3. Latencia de Escape RAWM. Día 1-3 Se muestra el aprendizaje de cinco ensayos por día de entrenamiento. El día cuatro se cambió la posición de la plataforma para valorar la capacidad de las ratas para re-aprender una nueva tarea. Ratas de 36-39 días pn. Comparación entre Grupo RA - C (n = 9 por grupo).

MEMORIA DE REFERENCIA RAWM RATAS JOVENES (36-39 pn)

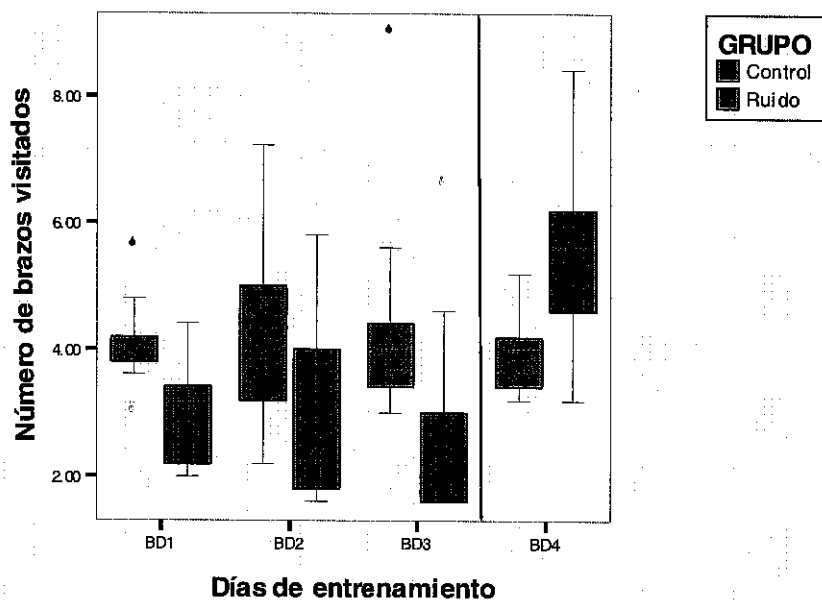


Fig 4. Total de brazos visitados antes de encontrar la plataforma en el RAWM. Sig. Día 1 $p \leq 0.043$. Día 4 muestra el re-aprendizaje de la nueva posición de la plataforma oculta $p \leq 0.015$. Ratas 36-39 días pn. Comparación del grupo RA - C (n = 9/grupo).

MEMORIA DE TRABAJO RAWM RATAS JOVENES (36-39 pn)

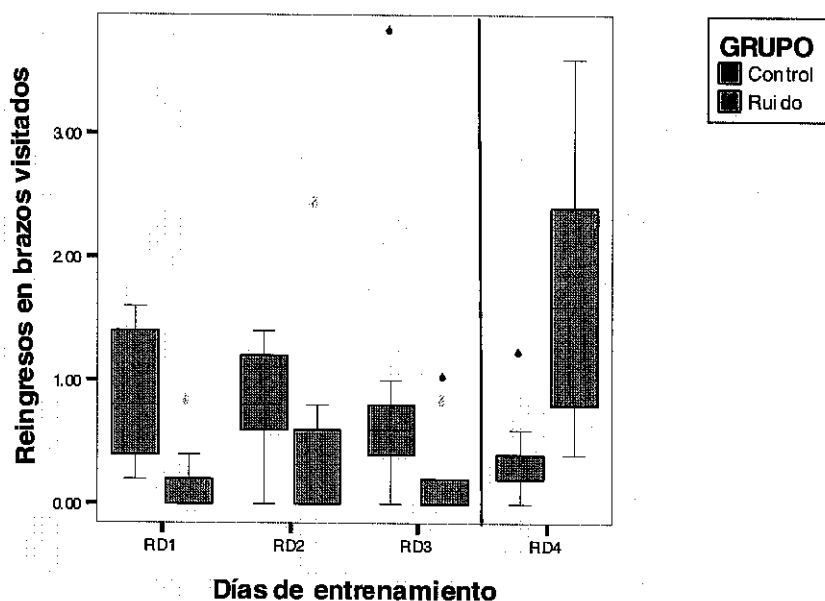


Fig 5. Numero de reingresos en brazos ya visitados antes de encontrar la plataforma en el RAWM. Sig. Día 1 $p \leq 0.035$ y día 2 $p \leq 0.035$. Día 4 registro de re-aprendizaje en 5 ensayos de la tarea $p \leq 0.002$. Ratas 36-39 días pn. Comparación del grupo RA - C ($n = 9/\text{grupo}$).

Efectos del estrés sobre el aprendizaje y la memoria de ratas adultas.

Para la evaluación de aprendizaje espacial en ratas adultas, fueron incluidos cuatro grupos con las características descritas en la sección del procedimiento general. A los 91 días de edad, los animales fueron sometidos al mismo paradigma del RAWM que se utilizó para evaluar el desempeño de las ratas jóvenes. La prueba Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas para las ratas adultas en el día de re-aprendizaje, tanto para latencia de escape $H=9.394$, $gl=3$, $p < 0.024$; como para errores de trabajo $H=13.108$, $gl=3$, $p < 0.004$.

El aprendizaje de los grupos adultos fue analizado por comparaciones mediante U de Mann-Whitney. Estas comparaciones nos permitieron observar que en el primer día de entrenamiento los animales EAD y ELRA requirieron de menor tiempo para aprender la tarea espacial, mostraron diferencias estadísticas en el tiempo de latencia de escape, comparados con el grupo CA (Fig. 6). El grupo EAD redujo la latencia de escape el día 1, comparado con el grupo CA $U=14.000$, $gl=3$, $p < 0.019$, $N=9$ (Fig. 6). El mismo efecto observamos en los

animales que fueron estresados por ruido crónico al tiempo del destete (**ELRA**) $U=16.000$, $gl=3$, $p < 0.02$, $N=9$. El dato anterior nos permitió evaluar las posibles consecuencias duraderas de este periodo de estrés ya que éste grupo solo se había estresado durante la juventud (21-36 pn) con ruido ambiental y después se mantuvo en condiciones estándar de bioterio. Adicionalmente pudimos evaluar el desempeño de este grupo **ELRA** en la edad adulta, comparando sus habilidades de aprendizaje con respecto al grupo **EAD**, en el día 1 mostró mayor tiempo para encontrar la plataforma de escape con respecto a **EAD**, $U=17.000$, $gl=3$, $p < 0.031$. Tal diferencia persistió entre estos grupos **ELRA-EAD** los días 2 $U=16.000$, $gl=3$, $p < 0.024$, $N=9$ y 3 $U=40.000$, $gl=3$, $p < 0.05$, $N=9$. Sin embargo, el grupo **ELRA** decrementó su latencia comparado con el grupo **EAD** (Fig. 6). Con respecto a la memoria de referencia, el día 3 encontramos diferencias significativas para el grupo **EAD**, presentó menor número de errores de referencia que el grupo **CA** $U= p < 0.04$, $N=9$ (Fig. 7).

Como ya se describió anteriormente, en el cuarto día de la prueba la plataforma de escape fue cambiada del brazo 1 al brazo 4, con lo anterior pudimos evaluar la capacidad de los animales para re-aprender la tarea con una nueva configuración espacial. Los grupos realizaron cinco ensayos consecutivos para encontrar la plataforma en su nueva localización (re-aprendizaje). Como se muestra más adelante, fue en el cuarto día de re-aprendizaje que el grupo estresado dos veces **RA+EDRA** presentó los mayores efectos. El análisis U de Mann-Whitney mostró que; tanto la exposición juvenil a ruido ambiental seguida por estrés agudo por depredador en la adultez (**RA+EAD**), como las otras dos condiciones experimentales (**EAD** y **ELRA**) produjeron un deterioro significativo en la habilidad de las ratas para aprender la nueva localización de la plataforma.

El día 4 pudimos observar una alteración en el desempeño del grupo **RA+EAD**, ya que aumentó notablemente su tiempo de latencia de escape $U=8.500$, $gl=3$, $p > 0.003$, $N=9$ comparado con las ratas Controles (Fig. 6). Además, en este grupo también se vio afectada la memoria de referencia, incrementando considerablemente el número de errores de referencia cometidos durante la ejecución del re-aprendizaje $U=14.000$, $gl=3$, $p < 0.019$, $N=9$ (Fig. 7) y lo mismo sucedió con la memoria de trabajo, en donde se observaron un gran número de errores de memoria de trabajo $U=5.000$, $gl=3$, $p < 0.001$, $N=9$ (Fig. 8). Por otra parte; las ratas que solamente habían sido sometidas a un único evento estresante, mostraron menor deterioro en la

habilidad para reaprender la tarea. Las ratas expuestas a estrés agudo por depredador **EAD**, solamente presentaron deterioro en su latencia de escape $EAD < CA$ $U=16.500$, $gl=3$, $p < 0.031$, $N=9$ (Fig. 6), sin que se afectaran su memoria de referencia o de trabajo (Fig. 8). De la misma forma, las ratas solamente expuestas a ruido ambiental, que posteriormente fueron evaluadas a los 90 días pn (**ELRA**) sólo mostraron deterioro significativo en el tiempo de latencia de escape $ELRA < CA$ $U=16.000$, $gl=3$, $p < 0.031$, $N=9$ (Fig. 6). Entre los grupos estresados durante la segunda etapa experimental, la diferencia más importante correspondió a la memoria de trabajo, incrementando el número de errores de trabajo observados en las ratas pertenecientes al grupo **RA+EAD**, comparadas con **EAD** $U=16.000$, $gl=3$, $p < 0.031$, $U=9$ (Fig. 8).

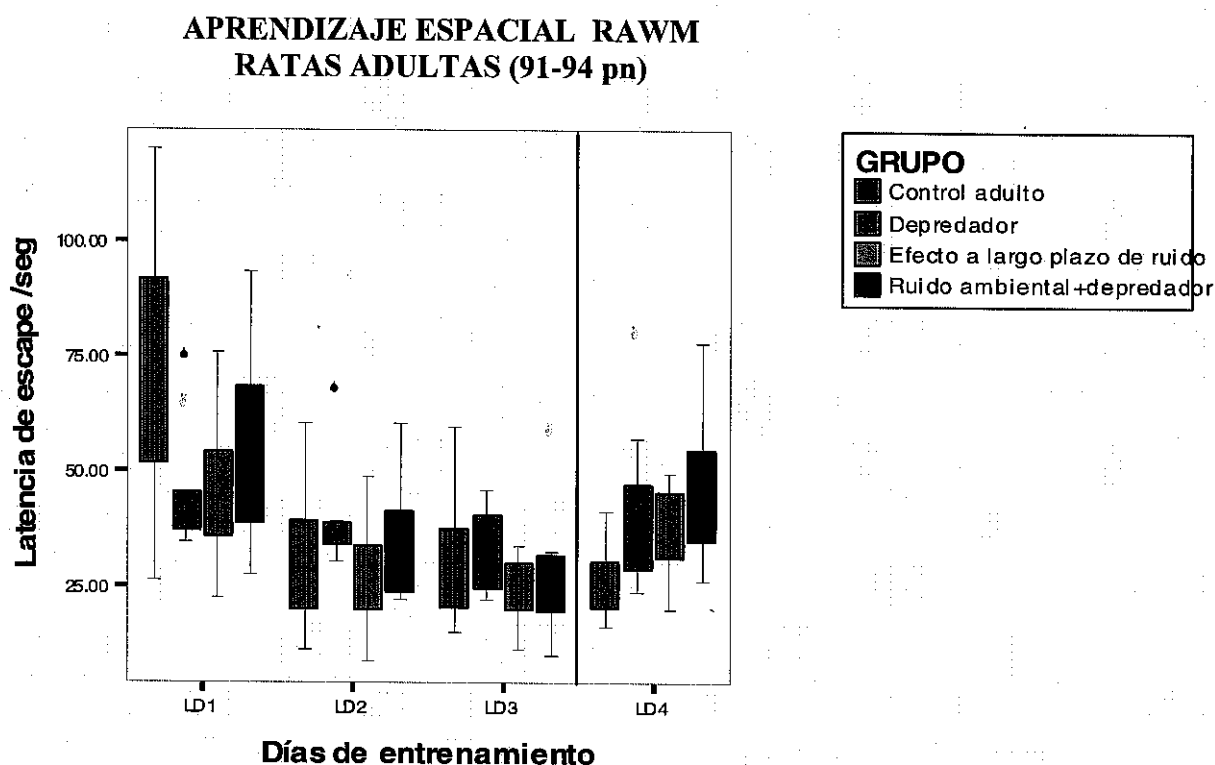


Fig 6. Latencia de escape para encontrar la plataforma en el RAWM. Día 1-3 se muestra el aprendizaje de 5 ensayos por día de entrenamiento. Día 4 registro de re-aprendizaje de la nueva posición de la plataforma durante 5 ensayos. Ratas de 90-94 días pn. Comparación entre los grupos: CA, EAD, RA+EAD y ELRA ($n=9$ /grupo). Sig. Día 1 CA-EAD $p \leq 0.019$, CA-ELRA $p \leq 0.024$, EAD-ELRA $p \leq 0.031$; Día 2 y 3 EAD-ELRA $p \leq 0.24$ y $p \leq 0.05$. Día 4 CA-EAD $p < 0.031$; CA-RA+EAD $p \leq 0.003$ y CA-ELRA $p \leq 0.031$

MEMORIA DE REFERENCIA RAWM RATAS ADULTAS (91-94 pn)

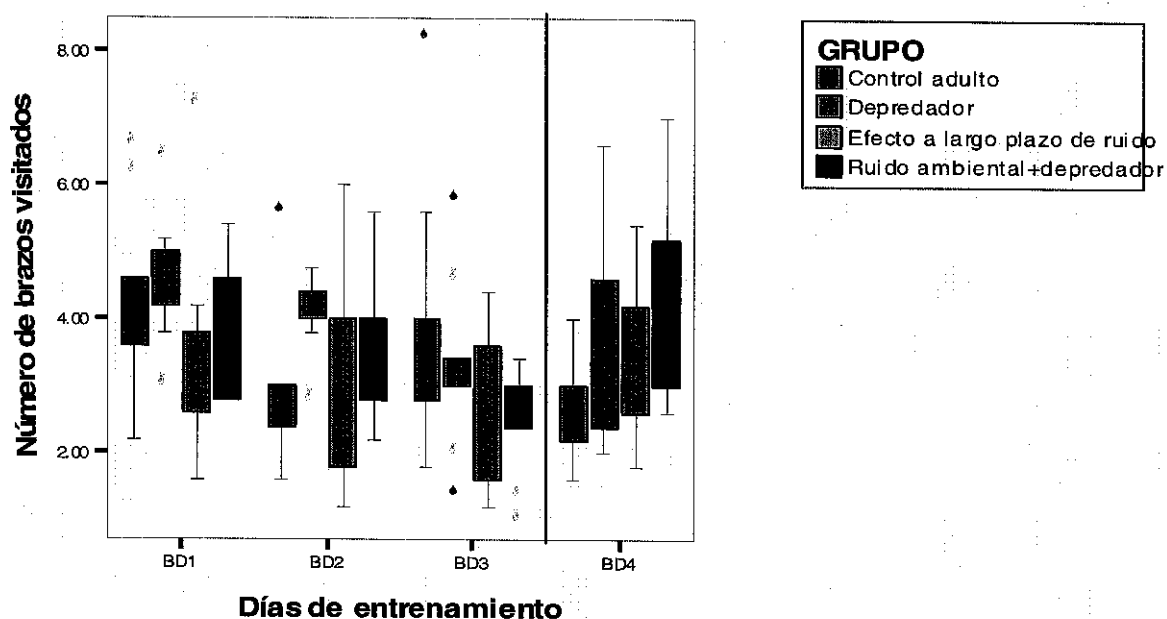


Fig 7. Total de brazos visitados antes de encontrar la plataforma de escape en el RAWM. Día 1-3 aprendizaje de cinco ensayos por día de entrenamiento. Día 4 re-aprendizaje de la tarea. Ratras de 90-94 días pn. Comparación de grupos: CA, EAD, RA+EAD y ELRA ($n = 9/\text{grupo}$) Sig. Día 1 CA-EAD $p \leq 0.04$. Día 4 CA-RA+EAD $p \leq 0.019$

MEMORIA DE TRABAJO RAWM RATAS ADULTAS (91-94 pn)

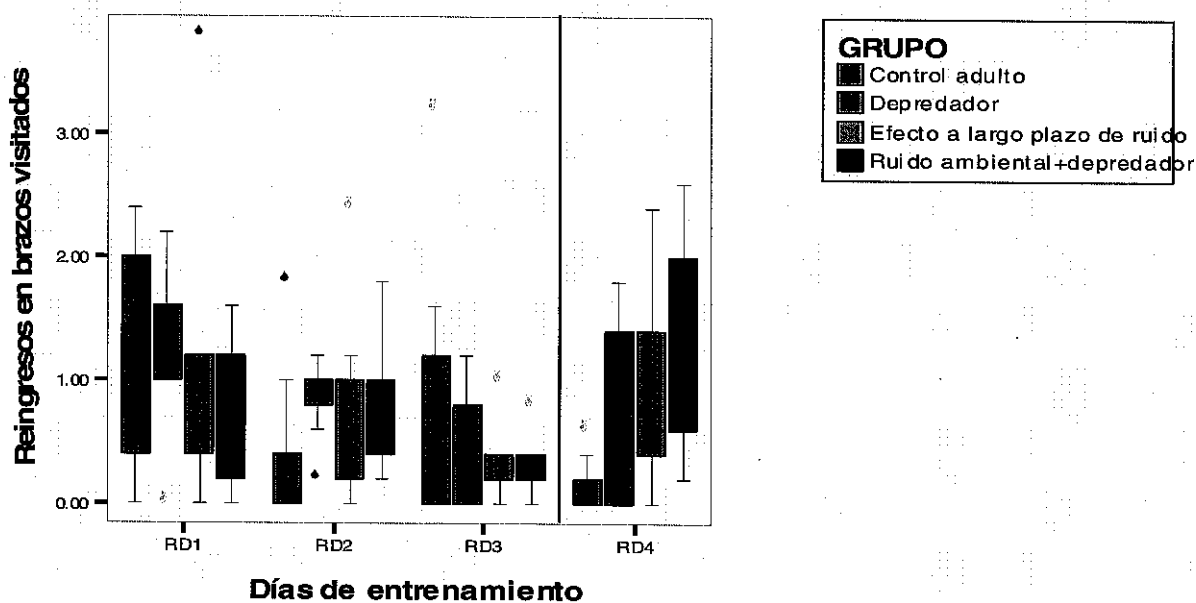


Fig 8. Número de reingresos en brazos ya visitados antes de encontrar la plataforma oculta en el RAWM. Día 1-3 aprendizaje de la tarea. Día 4 registro de re-aprendizaje de la tarea durante. Ratras 90-94 días pn. Comparación de los grupos: CA, EAD, RA+EAD y ELRA ($n = 9/\text{grupo}$). Sig. Día 4 CA-RA+EAD $p \leq 0.001$; y EAD-RA+EAD $p \leq 0.031$

EVALUACIÓN DE CONDUCTA EXPLORATORIA EN CAMPO ABIERTO (OPEN FIELD) DE RATAS JÓVENES (estrés crónico) Y ADULTAS (estrés agudo).

Efectos del estrés sobre la conducta de ratas jóvenes (Campo abierto).

Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para realizar comparaciones entre los grupos. Los valores fueron tomados del registro de actividad exploratoria en la prueba de campo abierto el día 40 pn. No encontramos diferencias significativas entre los grupos C y RA para los criterios de tiempo de permanencia en área central y periférica. Sin embargo; el grupo RA disminuyó significativamente su tiempo de movilidad durante los 6 min que duro la prueba, $U=17.000$, $gl=1$, $p < 0.035$ (Fig. 9). En la evaluación de los otros parámetros conductuales, el grupo RA mostro menor actividad tanto en “erguimiento” $U=20.000$, $gl=1$, $p < 0.031$; como en “acicalamiento” $U=13.000$, $gl=1$, $p < 0.012$ (Fig.10). Además, los sujetos expuestos a ruido ambiental mostraron un mayor número de bolos fecales durante la prueba, $U=14.000$, $gl=1$, $p < 0.018$ (Fig. 11).

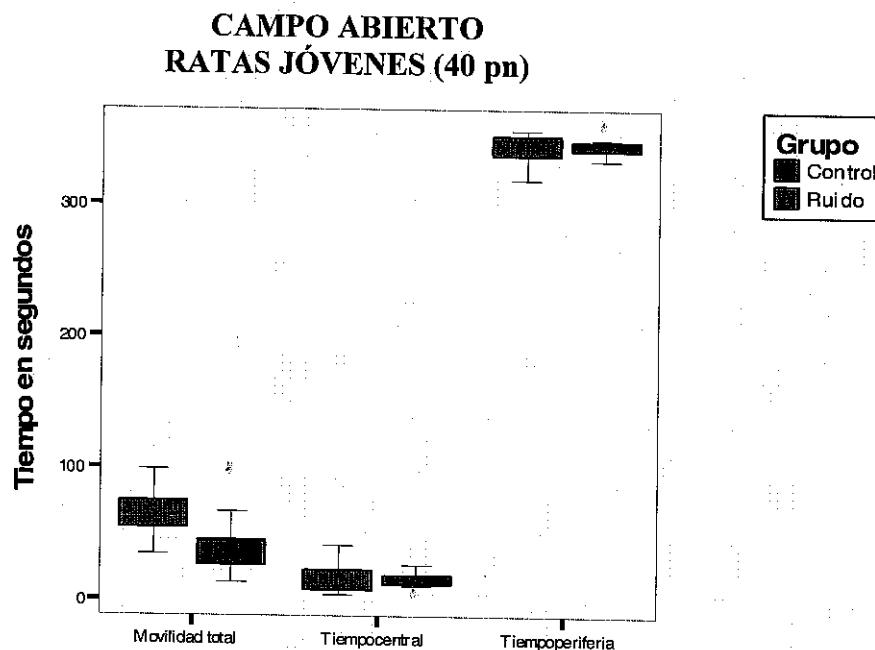


Fig. 9. Resultados de campo abierto durante 6 min. Comparación de los grupos ruido ambiental (RA) y Control (C) ($n=9$ /grupo) a los 40 días pn. Grafica presentada en Boxplots. Se registró el tiempo de permanencia en área central, periférica y tiempo total de movilidad durante 6 min. Diferencia sig $p \leq 0.038$ en movilidad total.

CAMPO ABIERTO RATAS JÓVENES (40 pn)

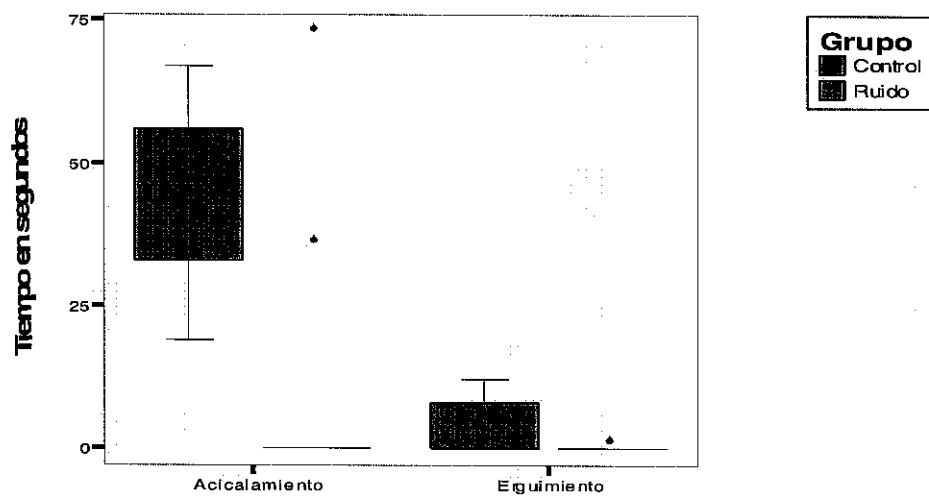


Fig 10. Registro de conducta durante 6 min. Comparación entre grupo ruido ambiental (RA) y control (C) ($n=9/\text{grupo}$) a los 40 días pn. Sig. en Erguimiento $p \leq 0.031$ y Acicalamiento $p \leq 0.012$.

CAMPO ABIERTO RATAS JOVENES (40 pn)

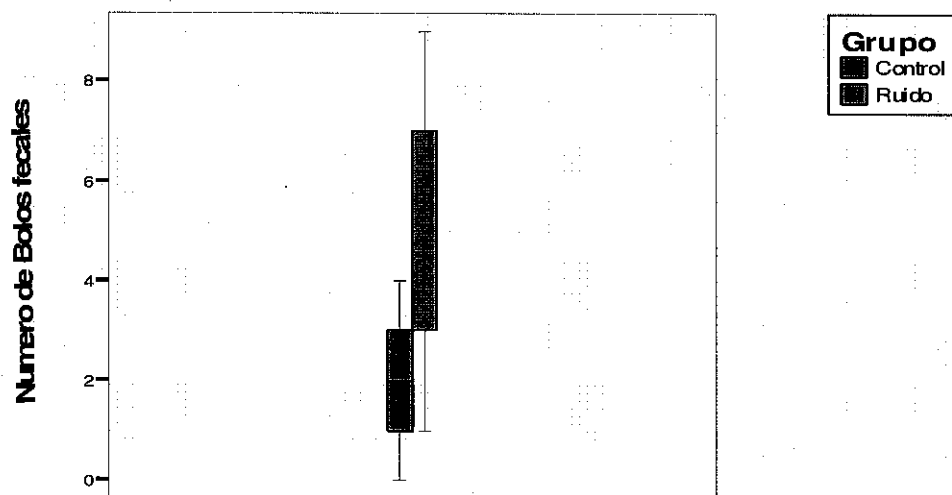


Fig 11. Registro de conducta durante 6 min. Comparación entre ruido ambiental (RA) y grupo control (C), ($n=9/\text{grupo}$). Evaluado a los 40 días pn. Se observó RA $\square$ C. sig $p \leq 0.018$.

Efectos del estrés sobre la conducta exploratoria de ratas adultas (Campo abierto).

En la evaluación de la actividad exploratoria tras exposición a estrés agudo por depredador (día 95 pn), la comparación de los grupos experimentales mediante la prueba estadística U de Mann-Whitney reveló disminución considerable de la movilidad respecto al grupo CA en el transcurso de los 6 min que dura la prueba, arrojando los siguientes datos: el grupo **EAD** $U=12.000$, $gl=3$, $p < 0.01$, $N=9$; el grupo sometido a las dos condiciones de estrés **RA+EAD** $U=6.000$, $gl=3$, $p < 0.001$, $N=9$; y el grupo en el que se evaluó la consecuencia remanente por la exposición temprana al ruido **ELRA** $U=12.500$, $gl=3$, $p < 0.001$, $N=9$ (Fig. 12). En los grupos de ratas adultas también encontramos datos relevantes en los otros criterios conductuales como “acicalamiento”, que en el grupo **RA+EAD** sucedió durante más tiempo, comparado con el grupo **EAD** $U=7.000$, $gl=3$, $p < 0.002$, $N=9$. Este grupo también presentó menor tiempo de acicalamiento que el **ELRA** $U=10.000$, $gl=3$, $p < 0.006$, y **CA** $U=12.000$, $gl=3$, $p < 0.011$; $N=9$ (Fig. 13).

CAMPO ABIERTO RATAS ADULTAS (95 pn)

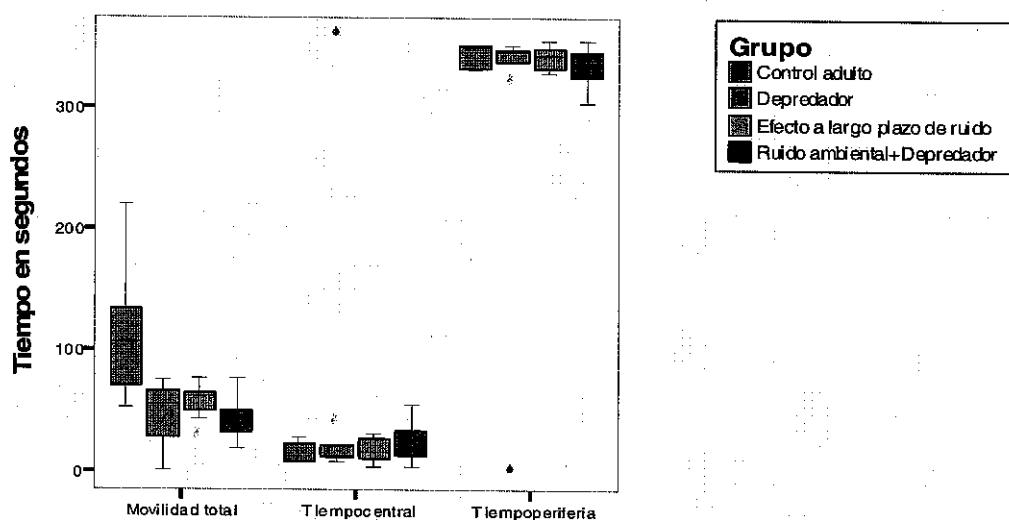


Fig. 12. Resultados de actividad exploratoria en campo abierto durante 6 min. Comparación de grupos: CA, EAD; RA+EAD y ELRA. ($n=9$ /grupo) evaluados el día 95 pn. Se registró el tiempo de permanencia en área central, periférica y tiempo total de movilidad total durante 6 min. Se encontraron diferencias significativas entre: CA>EAD $p \leq 0.01$; CA>RA+EAD $p \leq 0.001$ y CA>ELRA $p \leq 0.001$.

CAMPO ABIERTO RATAS ADULTAS (95 pn)

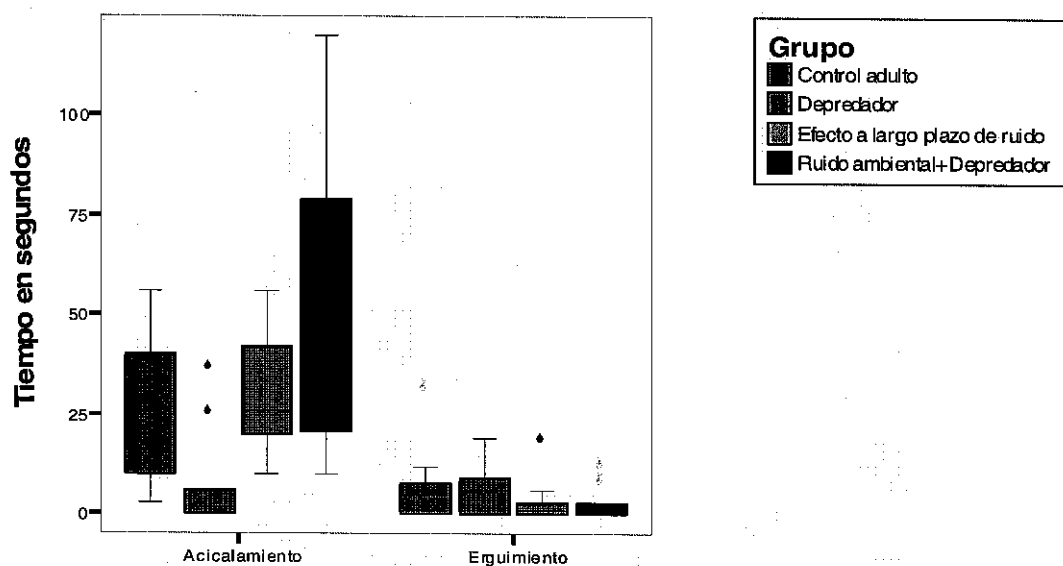


Fig 13. Registro de conducta durante 6 min. Comparación entre los grupos: CA; EAD; RA+EAD y ELRA. (n= 9/grupo). Evaluados el día 95 pn. Sig. en Acicalamiento CA>EAD $p \leq 0.011$; EAD<ELRA $p \leq 0.006$ y RA+EAD>EAD $p \leq 0.002$.

Adicionalmente, y como una medida de reactividad emocional fue registrado el número de bolos fecales durante los 6 min de duración de la prueba de campo abierto; se obtuvo el promedio por grupo, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales adultos pertenecientes a los diferentes grupos (Fig. 14).

CAMPO ABIERTO
RATAS ADULTAS (95 pn)

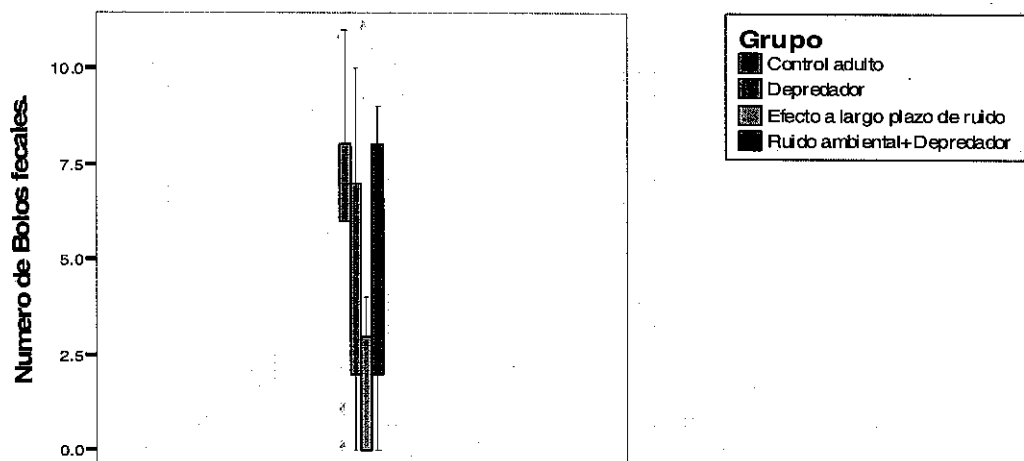


Fig 14. Registro de conducta "defecación" durante 6 min. Comparación entre grupos CA; EAD; RA+EAD y ELRA. Evaluados el día 95 pn (n= 9/grupo). No se encontraron diferencias significativas.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio experimental demuestran que la exposición crónica a ruido ambiental durante el desarrollo temprano produjo efectos semejantes a los clásicamente reportados para otra clase de estímulos estresantes. De acuerdo a los datos obtenidos, el peso corporal, los niveles circulantes de corticosterona en sangre y la habilidad de las ratas para asimilar una tarea de aprendizaje espacial se alteraron como consecuencia de la exposición a estímulos ruidosos. Más aún; hemos demostrado que la capacidad de la rata para afrontar un nuevo evento estresante en la vida adulta, resulta alterada en función de si el sujeto fue o no expuesto a ruido ambiental en la vida temprana. Como ejemplo observamos que la capacidad de los sujetos evaluados para aprender una nueva ruta de escape en la prueba del laberinto radial, resultó significativamente susceptible a los efectos nocivos del ruido ambiental, tanto en el corto como en el largo plazo.

Ruido ambiental: Efectos sobre el peso corporal, niveles de corticosterona y conducta de ratas macho prepúberes.

En este estudio, utilizamos una adaptación de ruido ambiental al audiograma de la rata con la finalidad de determinar los efectos fisiológicos y conductuales que este estímulo ejerce sobre ratas jóvenes que se encuentran en una etapa de desarrollo. Además realizamos una evaluación en el laberinto acuático radial de ocho brazos, en donde pudimos observar alteraciones en funciones cognitivas como aprendizaje y memoria. Además, aplicamos la prueba de campo abierto, como una medida de la actividad exploratoria de la rata después de ser confrontada con un estímulo de esta naturaleza.

De acuerdo a lo observado en la sección de resultados, podemos afirmar que esta adaptación de ambientes ruidosos al audiograma de la rata, provocó efectos semejantes a los de otros estímulos francamente estresantes. Tal afirmación se sustenta en dos parámetros ampliamente reconocidos como indicadores de estrés en animales: decremento en la ganancia de peso corporal, e incremento en los niveles séricos de corticosterona.

Por su creciente impacto demográfico, el ruido ha atraído la atención de muchos investigadores en el área de salud pública. Además del obvio efecto auditivo de esta clase estímulos, los efectos extra-auditivos ocupan en la actualidad un lugar importante en la investigación científica. Entre los efectos no auditivos, sobresalen los relacionados con el sistema neuroendocrino y las capacidades cognitivas. En ese sentido, ha sido demostrado que el estrés producido por el ruido influye de manera negativa en el funcionamiento del sistema cardiovascular, inmunológico y neuroendocrino (Maschke et al., 2000, Michaud et al., 2003). Mas aún; ha quedado demostrado que la conducta y el funcionamiento del SNC se alteran como consecuencia de la exposición experimental a ruido (Manikandan et al., 2006, Samson et al., 2007).

A pesar de las obvias ventajas que estos resultados presentan para el conocimiento del efecto del ruido sobre la fisiología, es importante tener en cuenta que la mayoría de estos estudios están basados en la reproducción artificial de estímulos sonoros (por ejemplo ruido blanco), que no son representativos del ruido que comúnmente afecta a las comunidades humanas. Considerando esto, el modelo que nosotros usamos representa una ventaja adicional que adapta de forma previamente validada eventos ambientales de ruido al audiograma de la rata. De acuerdo a datos obtenidos por los autores del modelo, este tipo de estimulación es capaz de inducir efectos mas intensos y duraderos que los sonidos artificiales, -al menos en lo referente a interrupción en patrones de sueño (Rabat et al., 2005).

La utilización de esta novedosa adaptación permitió demostrar por primera vez y de forma contundente, que la exposición repetida de sujetos en desarrollo a ambientes ruidosos indujo un potente efecto estresante, afectando la ganancia de peso e incrementando los niveles de corticosterona en suero, incluso después de haber suprimido el estímulo. Estos efectos concuerdan con reportes previos, en donde se establece que la exposición a ruido resulta ser un importante estímulo estresante en ratas adultas, no obstante; el modelo utilizado en esos experimentos fue un ruido blanco artificial (Michaud et al., 2003, Atkinson et al., 2006).

La exposición intermitente y aleatorizada del estímulo sonoro en nuestro modelo, impidió que se generara en la rata un efecto de habituación a la estimulación repetida durante los quince días experimentales. De acuerdo a resultados de otros investigadores, la exposición repetida a un estímulo molesto, tiende a generar una disminución o desaparición total de la

respuesta orgánica hacia ese estímulo en un proceso denominado habituación (Groves y Thompson, 1970). Sin embargo, nuestro modelo demostró un efecto durante todo el periodo experimental. Dicho efecto parece haber sido causado por la presentación aleatoria del estímulo, puesto que un experimento reciente demostró que las hormonas corticosterona y ACTH mantienen niveles elevados si se exponen ratas a ruido blanco de 95dBs y se insertan periodos de silencio intermedio (Masini et al., 2008). Esta molestia sostenida inducida por la exposición al ruido ambiental se hizo evidente en la ganancia de peso corporal y niveles séricos de CORT.

Como se muestra en la gráfica 1, observamos una reducción significativa de la ganancia de peso corporal en los días 28 y 32 posnatales. Tomando en cuenta que estas medidas fueron obtenidas cada cuatro días, podría estimarse que tales efectos estuvieron presentes al menos durante la segunda mitad del periodo de estimulación con ruido ambiental. Adicionalmente, en éstos animales se observó un retraso persistente del incremento normal de peso corporal, incluso durante las mediciones realizadas una vez finalizado el estímulo estresante. Por otra parte, los niveles de CORT en suero apoyan la afirmación anterior.

Como se muestra en la gráfica 2, los niveles de CORT resultaron elevados el día 36 postnatal, un día después de la última sesión de ruido experimental, a pesar que las mediciones no fueron realizadas durante la etapa de exposición al ruido, podemos hipotetizar que la actividad del eje HHA permaneció elevada durante la mayor parte de los días de estrés por ruido. Esta hipótesis es sostenida por reportes previos, los cuales muestran que la actividad del eje HHA permanece alterada cuando se presenta ruido en forma intermitente al protocolo de ruido (Atkinson et al., 2006, Masini et al., 2008).

Además; usando el mismo tipo de ruido, sus creadores encontraron que no se producía el fenómeno de habituación después de nueve días de exposición de las ratas al ruido ambiental, al evaluar alteraciones en el ciclo de sueño (Rabat et al., 2005). Si consideramos que nuestra medición de CORT fue conducida después de que concluyó la exposición a ruido, podríamos esperar una elevación similar o incluso más pronunciada en los días previos de exposición.

Tanto la elevación de glucocorticoides como la reducción en la ganancia de peso corporal son aceptados ampliamente como indicadores de estrés (Chrousos y Gold, 1992, Herman y Cullinan, 1997, Maschke et al., 2000, Tsigos y Chrousos, 2002, Carrasco y Van de Kar, 2003, de Kloet, 2003, Armario et al., 2004).

Es importante destacar el hecho de que estos parámetros de estrés fueron encontrados en sujetos relativamente inmaduros. En este sentido, se ha observado que la respuesta del eje HHA a condiciones estresantes suele estar disminuida durante las primeras semanas de vida, un fenómeno que se conoce como periodo hiperrespondiente al estrés (Schapiro, 1962). Aparentemente, pese a que la respuesta a estímulos estresantes suele estar disminuida durante las primeras semanas de la vida de la rata, la exposición a esa clase de estímulos suele afectar la manera en que se programa la actividad del sistema HHA, puesto que durante este periodo se observa una intensa actividad madurativa en las estructuras cerebrales y sistemas de receptores que lo regulan (Meaney et al., 1985, Liu et al., 1997, Edwards y Burnham, 2001, Owen et al., 2005, McCormick y Mathews, 2007, Meaney et al., 2007). Así, podría suponerse que la presencia de estímulos estresantes en periodos de desarrollo temprano, produce cambios duraderos en la actividad de los sistemas que regulan la respuesta orgánica al estrés.

En referencia a los efectos conductuales, fue evidente que en la ejecución en RAWM se manifestaron alteraciones como consecuencia a la exposición al ruido ambiental estresante. Este paradigma ha sido propuesto como una prueba fiable para evaluar déficits en aprendizaje y memoria espacial, combinando las ventajas del Laberinto Acuático de Morris y el Laberinto radial. Por lo tanto, esta prueba nos permitió investigar déficits en aprendizaje espacial, con un alto grado de sensibilidad, manifestados por errores que cometieron los sujetos mientras recordaban, y trataban de localizar la posición de una plataforma oculta (Shukitt-Hale et al., 2004). Como se muestra en la gráfica 3, las ratas expuestas a ruido demostraron deterioro cognitivo evidenciado por incremento en la latencia para encontrar la plataforma sumergida en el cuarto día de reaprendizaje, cuando las ratas tuvieron que aprender una nueva configuración espacial, -ya que la posición de la plataforma se cambió. Además; en este día las ratas estresadas cometieron significativamente más errores que las ratas controles, tanto en lo relacionado a memoria de referencia, como a memoria de trabajo.

Parece claro que el efecto perjudicial de la exposición a ruido estuvo restringido a la plasticidad de la rata para aprender bajo una nueva configuración espacial. Este perfil cognitivo corresponde de cierta forma, a lo observado en las ratas con deterioro en memoria hipocampo-dependiente, comúnmente reportado en la literatura de estrés. De acuerdo a esto, el aprendizaje dependiente de hipocampo es susceptible tanto a experiencias estresantes, como a infusiones directas de glucocorticoides. (McEwen et al., 1986, de Kloet et al., 1999, Lopez et al., 1999, Tsigos y Chrousos, 2002, Sandi, 2003, Kim et al., 2006).

Entonces es necesario un hipocampo intacto para realizar tareas de aprendizaje espacial, y la utilización de estrategias espaciales parece deteriorarse después de la exposición a estrés. Así, podemos explicar por lo menos en parte el efecto encontrado en nuestro experimento, si argumentamos que el ruido ambiental produjo un fuerte efecto estresante, que incrementó de manera sostenida la actividad del sistema HHA, y modificó la actividad hipocampal, impidiendo consecuentemente el aprendizaje espacial.

Al respecto, encontramos una coincidencia relevante si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Shukitt-Hale y colaboradores, quienes evaluaron los efectos de la edad utilizando el mismo protocolo del laberinto acuático radial de ocho brazos (Shukitt-Hale et al., 2004). De acuerdo a este experimento, las ratas adultas mostraron un desempeño muy similar a las que fueron expuestas a ruido en este estudio, con un deterioro específico en su habilidad para reaprender una tarea espacial hipocampo-dependiente. Coincidentemente, ha sido sugerido que tanto el estrés como el envejecimiento producen un deterioro en el funcionamiento del hipocampo, y de las funciones cognitivas vinculadas a él (Miller y O'Callaghan, 2003).

En apoyo a la hipótesis que vincula estrés con hipocampo y aprendizaje, existe una nueva línea de investigación que involucra a otras regiones del cerebro y otros procesos cognitivos en la neuropatología del estrés. Fracasos similares relacionados con la carencia de flexibilidad para utilizar nuevas estrategias han sido descritos en sujetos con daño en la corteza prefrontal. De acuerdo con esto, el proceso cognitivo que permite la percepción y adaptación a nuevas señales de información podría ser dañado bajo circunstancias patológicas, conduciendo a los animales a un uso persistente de estrategias conductuales basadas en antiguas reglas, que ya no son aplicables para la nueva demanda del entorno (Salazar et al., 2004).

En estrecha relación con esto, nuestros resultados mostraron un número incrementado de errores cometidos por las ratas estresadas mientras reaprendían una tarea espacial que ya habían asimilado; un número importante de errores, indicativos de una conducta persistente consistieron en re-ingresos dentro del brazo inicialmente ocupado por la plataforma oculta, y que ya habían aprendido a identificar. En apoyo a esta idea, recientemente fue descrita una conducta perseverativa similar en ratas adrenalectomizadas y tratadas con glucocorticoides, las cuales mostraron una notable disminución en su capacidad para modificar estrategias de navegación previamente aprendidas en el laberinto acuático de Morris (Cerqueira et al., 2005).

Una consideración adicional que explica el deterioro cognitivo identificado aquí, está basado en el supuesto que ocurren algunos tipos de interferencia en los procesos de maduración cerebral normal. Como señalamos anteriormente, la edad que va del destete a la pubertad se caracteriza por un rápido crecimiento cerebral y sobreproducción de axones y sinapsis en áreas cerebrales clave, involucradas en procesos emocionales y de aprendizaje, tales como el hipocampo, corteza prefrontal y amígdala (Spear, 2000). Desde este punto de vista, no es difícil imaginar que la exposición a ruido ambiental durante los quince días postdestete indujo una especie de interferencia en el proceso de maduración normal que terminó por afectar los procesos estructurales y cognitivos más vulnerables durante este periodo de desarrollo.

Adicionalmente a la evaluación de procesos cognitivos en el RAWM, realizamos la prueba de campo abierto (Open field) en la que principalmente es evaluada la actividad exploratoria; una tendencia natural que presentan la mayoría de los individuos cuando se enfrentan a un ambiente extraño, y cuyo principal objetivo es adquirir información útil del medio ambiente (Pascual, 2002). Con respecto al desarrollo de conductas de defensa, la actividad exploratoria ha sido asociada con búsqueda de novedad y conductas de tomas de riesgo, las cuales se sugiere emergen de manera considerable en las ratas prepúberes cerca de los 35 días de edad, y subsecuentemente decrecientan en la edad adulta (Douglas et al., 2003).

La prueba de campo abierto analiza la conducta espontánea más que la complejidad de un animal para realizar una tarea específica (Barclay y Gibson., 1982). En este sentido, encontramos que las ratas expuestas a estrés por ruido ambiental, presentaron cambios

únicamente en el tiempo de movilidad total. Las ratas expuestas a ruido, presentaron un menor tiempo de movilidad, en comparación con las controles. Esta disminución de la actividad exploratoria ha sido interpretada como un indicador de ansiedad del animal cuando se enfrenta a un medio ambiente desconocido (Pascual, 2002).

En referencia a lo antes mencionado, se han realizado algunos trabajos en donde, utilizando tanto el modelo de aislamiento social en ratas jóvenes (Pascual, 2002, Morinan y Parker, 1986), como el de estrés por inmovilización (Klenerová et al., 2007) se encontró disminución de la actividad exploratoria, semejante a la observada en nuestro estudio mediante la prueba de campo abierto. Lo anterior sustenta la hipótesis de que, la exposición temprana de las ratas en etapa de desarrollo a un evento adverso produce un déficit ontogénico en la modulación del sistema de conducta exploratoria en un ambiente novedoso (Arakawa, 2003). Sin embargo, no es posible afirmar si el decremento observado en la conducta exploratoria de las ratas recién destetadas y estresadas fue debida a una respuesta ansiogénica al encontrarse en un ambiente novedoso, o a la incapacidad para desencadenar los mecanismos fundamentales de la motivación exploratoria, dependientes de la intensidad de la amenaza, como se ha sugerido (Arakawa, 2007).

Para aumentar los elementos de análisis evaluamos conductas tipo *grooming* (acicalamiento) y *rearing* (erguimiento) y de defecación, como posibles indicadores de un estado ansiogénico o ansiolítico. Las ratas estresadas por ruido ambiental mostraron un decremento significativo en estas dos conductas durante el tiempo que permanecieron en el campo abierto (6 min). La conducta *grooming* ha sido relacionada con una variedad de actividades, entre ellas conducta exploratoria (Höglund, 1982). Además; la novedad y otros *estresores* pueden generar esta conducta en ratas (Bindra, 1958; Colbern, 1978). Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre acicalamiento y otros indicadores de ansiedad como micción, defecación y *freezing* (File, 1988). Como un dato adicional, encontramos una diferencia significativamente marcada en el número de bolos fecales de las ratas que fueron estresadas por ruido ambiental, y este incremento también ha sido observado en ratas estresadas por restricción de movimiento y frío (Barone, 1990).

De esta manera, consideramos que los resultados obtenidos en el presente estudio solo sustentan parcialmente la idea de que el ruido ambiental produjo un efecto ansiogénico que las ratas presentaron una vez que el estímulo fue suspendido.

Estrés agudo en la vida adulta: Efectos remanentes de la exposición temprana a ruido ambiental.

De acuerdo a lo planteado en las secciones precedentes, nuestro estudio evaluó el posible efecto residual ocasionado por el periodo de estrés crónico por ruido ambiental, al que fueron sometidas las ratas recién destetadas y su influencia en la respuesta frente a un nuevo evento estresante de naturaleza diferente. Llegada la edad adulta de las ratas (3 meses de edad), nuestro diseño experimental incluyó la exposición a un estímulo intenso de corta duración (confrontación con un depredador en una plataforma elevada inestable) y el análisis de parámetros conductuales y fisiológicos, en función de si la rata había sido o no expuesta previamente a ruido ambiental.

Los cambios en los niveles séricos de corticosterona demostraron claramente que, la exposición al modelo de estrés agudo por amenaza de depredador utilizado en este estudio fue altamente estresante para las ratas adultas. En congruencia con este resultado, datos reportados por otros investigadores han demostrado que, tanto la exposición breve a un depredador (Mesches, 1999; Roberts, 2000; Sandy, 2005) como la experiencia en la plataforma elevada (Rocher, 2004), fueron capaces de provocar incrementos en los niveles circulantes de glucocorticoides, aunque fueran presentados independientemente.

De acuerdo a nuestros resultados, la exposición a un estrés agudo parece ser el elemento predominante en lo que se refiere a intensidad o potencia del estímulo, puesto que no se observó un incremento considerable entre el grupo que solo fue expuesto a este estímulo y el que previamente había sido expuesto a ruido ambiental. Este último dato, y el hecho de que no se observaron cambios importantes entre el grupo que solo fue expuesto a ruido ambiental temprano y su respectivo control, sugieren que los cambios en los niveles de corticosterona generados por el ruido fueron relativamente transitorios. Sin embargo, dado que el objetivo de nuestro estudio no contemplaba esto como prioridad, dista por obvias razones de ser

conclusivo. Lo que es claro, es que la actividad de la principal hormona asociada al estrés, se incrementó significativamente en las ratas que fueron confrontadas con el evento agudo, ya sea que anteriormente hubieran sido estresados o no por ruido ambiental.

En nuestra opinión, los resultados de mayor relevancia fueron los que se obtuvieron de la evaluación cognitiva en la prueba del laberinto acuático radial de ocho brazos (RAWM). De manera contundente, se observó que el grupo más afectado en la(s) habilidad (es) para resolver la prueba fue el que experimentó las dos condiciones estresantes. Particularmente, la ejecución en la fase de re-aprendizaje resultó dramáticamente afectada por efecto de la re-exposición. En este grupo, tanto la latencia de escape como la memoria de referencia y la de trabajo evidenciaron un deterioro en la etapa de reaprendizaje.

En contraparte, las ratas que solamente fueron expuestas a un solo evento estresante mostraron un deterioro menos severo. La exposición aguda a un estímulo incontrolable (estrés por depredador) sólo produjo una alteración notable en la latencia de escape durante el día de reaprendizaje, en que se cambió de lugar la posición de la plataforma oculta. El efecto a largo plazo de la exposición a ruido en la juventud también sólo fue evidente solamente en los errores de memoria de trabajo cometidos en este mismo día.

Los datos anteriores sugieren entonces un efecto aditivo de ambas condiciones, más aún, esos resultados permiten suponer que se afectan diferencialmente los procesos que fueron evaluados por la prueba utilizada. Así, la memoria de trabajo supondría una mayor susceptibilidad en el largo plazo y la latencia de escape en el corto plazo.

El análisis global de nuestros resultados permite entonces afirmar que, la habilidad para aprender una tarea clásicamente considerada espacial, particularmente, -la flexibilidad para modificar patrones de navegación y re-aprender la tarea en condiciones diferentes- fue altamente sensible a la experiencia estresante temprana. Considerando que, esa incapacidad específica para el proceso de reaprendizaje ya ha sido discutida en la sección precedente, centraremos nuestra discusión en el análisis del efecto pre-condicionante de la experiencia estresante temprana sobre la respuesta a otros eventos futuros.

La revisión de estudios semejantes realizados en otros laboratorios ha permitido corroborar que los procesos de aprendizaje y memoria de ratas adultas expuestas a estrés dependen en gran medida de la experiencia previa, particularmente de la experiencia temprana. Sin embargo, es claro que la influencia de la experiencia, además de las características propias del estímulo, depende de variables como sexo, proceso que se evalúe y etapa concreta del desarrollo de la rata en la que se presenta el estímulo. Sabemos entonces que, la gestación, el amamantamiento y la infancia temprana, representan periodos ontogénicamente bien diferenciados, que implican mayor o menor susceptibilidad a estímulos estresantes.

A nivel experimental, el periodo menos investigado en este tópico corresponde al periodo juvenil. Convencionalmente comprende desde el destete hasta la pubertad en roedores, y es considerado análogo a la infancia del humano (Avital y Richter-Levin, 2005, Avital et al., 2006). Dado que nuestro estudio incluyó la exposición a ruido ambiental durante este periodo, resultan relevantes los datos obtenidos en otros experimentos comparables. Así, al ubicar nuestros resultados en este contexto, es claro que la experiencia estresante temprana fue un factor determinante en la severidad del impacto cognitivo de eventos estresantes posteriores. Sin embargo, las características propias del efecto cognitivo no son del todo claras y presentan contradicciones importantes, por lo menos en los resultados publicados hasta ahora.

La exposición a eventos estresantes durante este periodo de desarrollo puede facilitar, inhibir, o no modificar la capacidad de aprendizaje del adulto. Por ejemplo, el desempeño en el laberinto acuático de Morris mejora en ratas que fueron estresadas siendo jóvenes, y evaluadas después de un nuevo evento estresante 4 semanas después, sin embargo, empeora si se les evalúa antes de haberse sometido a un nuevo evento estresante (Isgor et al., 2004, Avital et al., 2006). Mas aún, ha sido reportado que el aprendizaje dependiente del hipocampo no sufre ningún cambio si se estresan ratas jóvenes de manera crónica, y se les evalúa cuando son adultas (Toth et al., 2008).

Esto último parece ser el caso de nuestro estudio, si tomamos en consideración la etapa de aprendizaje correspondiente a los 3 primeros días de entrenamiento, cuando la plataforma permaneció fija. Coincidentemente; el estudio mencionado incluyó un modelo de estrés crónico durante un periodo de tiempo semejante al nuestro. Incluso, podría suponerse, en coincidencia

con el estudio de Avital y Levin (Avital and Richter-Levin, 2005) que las ratas mejoran su rendimiento en respuesta al nuevo evento, a juzgar por la mejoría observada en el primer día de entrenamiento.

Así, los resultados mencionados apoyan nuestro hallazgo de que el aprendizaje espacial es, por lo menos parcialmente, resistente a los efectos del ruido ambiental en el largo plazo. Sin embargo, un importante aporte de nuestro trabajo radica en que ofrece evidencias de que, aún cuando la ejecución de la tarea bajo condiciones espacialmente permanentes no mostró deterioros importantes (sin cambiar de posición la plataforma de escape oculta), la ejecución de la misma sí resultó dramáticamente afectada cuando se modificó la configuración espacial bajo la cual se había realizado la tarea de aprendizaje espacial. De esta forma, el deterioro en la flexibilidad de la rata para aprender bajo nuevos esquemas referenciales, resultó el factor más relevante en nuestro estudio. Sin embargo es difícil discriminar entre un deterioro específico de esta capacidad, o una manifestación de una mejor consolidación del aprendizaje, que resultó en una dificultad para descartar la información ya adquirida. En este sentido, Carmen Sandi y su equipo han demostrado que la extinción del aprendizaje de tipo condicionamiento se retrasa en ratas que fueron estresadas antes de la pubertad, y evaluadas en la vida adulta (Toledo-Rodriguez y Sandi, 2007).

Por otra parte, un deterioro semejante en la capacidad para adaptarse a una nueva configuración espacial, ha sido descrito en algunas patologías relacionadas a estrés, tales como estrés postraumático y depresión. Partiendo de eso, nuestros resultados parecen concordar con la hipótesis de que, las experiencias aversivas de la vida temprana determinan la respuesta del individuo a nuevas condiciones estresantes; un planteamiento recientemente propuesto como mecanismo base en la predisposición incrementada a padecer depresión y ansiedad en sujetos con infancia traumática (Heim y Nemeroff, 1999, Teicher et al., 2003, Teicher et al., 2006).

De acuerdo a esto, algunos estudios en ratas han demostrado que la exposición a eventos estresantes durante la etapa contemplada en este estudio afectó el desarrollo del sistema límbico, y que esos trastornos aparentemente permanentes, podrían explicar los cambios observados en la respuesta frente a nuevos eventos estresantes. La exposición a estrés juvenil afecta permanentemente el funcionamiento de la molécula de adhesión celular neural (NCAM),

una proteína esencial en el desarrollo neural, regeneración, plasticidad sináptica y procesos de formación de memoria (Tsoory et al., 2008). Además; ha sido probado que el estrés puede retrasar el desarrollo cerebral, e inducir déficits en morfología hipocampal, cognición, funcionamiento del eje HHA (Isgor et al., 2004), y niveles de neuroesteroides cerebrales (Avital et al., 2006).

En este orden de ideas podríamos argumentar que, no obstante los efectos a largo plazo por la exposición a ruido ambiental de las ratas recién destetadas, éstos fueron sólo evidentes en memoria espacial de trabajo, al parecer ocurrieron cambios perdurables a nivel morfológico, que favorecieron que las ratas respondieran con cambios más dramáticos cuando fueron confrontadas con una nueva condición estresante.

Finalmente; es importante señalar que los cambios observados en la ejecución de la tarea de aprendizaje, no guardaron relación con efectos sobre conductas ansiogénicas, o actividad exploratoria. De acuerdo a los datos arriba mostrados, las ratas estresadas solo presentaron cambios en el tiempo de movilidad total, y no mostraron diferencias en el tiempo de permanencia en las áreas central y periférica del campo abierto, lo que sugiere una ausencia de efecto sobre esta conducta.

En resumen, podemos afirmar que la exposición crónica a ruido ambiental de ratas jóvenes afectó las capacidades de aprendizaje, reduciendo la flexibilidad de las ratas para reaprender una nueva configuración espacial, esta afectación posiblemente fue permanente ya que se evidenció cuando estas ratas fueron confrontadas con una nueva condición estresante aguda siendo adultas.

CONCLUSIONES.

- 1 Nuestros resultados mostraron que el ruido ambiental presentado de manera crónica, a ratas macho recién destetadas resultó ser un potente factor estresante, que se manifestó por un incremento en los niveles de la hormona corticosterona, retraso en la ganancia del peso corporal y en la alteración de las habilidades para re-aprender una tarea espacial.
- 2 Los efectos negativos de la exposición a ruido ambiental en etapa temprana persistieron en la adultez, y se manifestaron con un retraso en el tiempo de adquisición del aprendizaje de una tarea.
- 3 La exposición al modelo depredador/plataforma elevada, incrementó la elevación de niveles de corticosterona, en comparación con el grupo estresado solo en la juventud y con el grupo control. Además, estos animales mostraron deterioro en el aprendizaje espacial y la memoria de referencia. Sin embargo, este deterioro no fue tan evidente para el re-aprendizaje, contrario a lo que sucedió con el grupo doblemente estresado.
- 4 La alteración en la capacidad para re-aprender una tarea se hizo más evidente cuando el sujeto fue sometido a un nuevo evento estresante de diferentes características, y en otra etapa de la vida, sobre todo en relación a las habilidades cognitivas de memoria de referencia y de trabajo.
- 5 Este estudio refleja que el deterioro cognitivo presente en sujetos expuestos a estrés de diferentes características en la etapa temprana y la vida adulta, puede limitarse a una flexibilidad restringida para re-aprender una nueva configuración espacial.

REFERENCIAS

- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M. J., 2007. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 256-266.
- Aleksandrov, A. A., Polyakova, O. N., Batuev, A. S., 2001. The effects of prenatal stress on learning in rats in a Morris maze. *Neurosci Behav Physiol*. 31, 71-74.
- Arakawa, H., 2003. The effect of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. *Dev Psychobiol*. 43, 11-19.
- Arakawa, H., 2005. Relationship between isolation rearing and social development in male rats: Effect on exploratory behavior. *Behav Processes*. 70, 223-234.
- Arakawa, H., 2007. Age-dependent change in exploratory behavior of male rats following exposure to threat stimulus: effect of juvenile experience. *Dev Psychobiol*. 49, 522-530.
- Armario, A., Gil, M., Marti, J., Pol, O., Balasch, J., 1991. Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav*. 39, 373-377.
- Armario, A., Marti, O., Valles, A., Dal-Zotto, S., Ons, S., 2004. Long-term effects of a single exposure to immobilization on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: neurobiologic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 1018, 162-172.
- Atkinson, H. C., Wood, S. A., Kershaw, Y. M., Bate, E., Lightman, S. L., 2006. Diurnal variation in the responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the male rat to noise stress. *J Neuroendocrinol*. 18, 526-533.
- Avital, A., Richter-Levin, G., 2005. Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat. *Int J Neuropsychopharmacol*. 8, 163-173.
- Avital, A., Ram, E., Maayan, R., Weizman, A., Richter-Levin, G., 2006. Effects of early-life stress on behavior and neurosteroid levels in the rat hypothalamus and entorhinal cortex. *Brain Res Bull*. 68, 419-424.
- Barclay, L., Gibson, G., 1982. Spontaneous Open Field Behavior in Thiamin-Deficient Rats. *J Nutr*. 112, 1899-1905.
- Barone, F. C., Deegan, J.F., Price, W.J., Fowler, P.J., Fondacaro, J.D., Ormsbee, H.S., 1990. Cold-restraint stress increases rat fecal pellet output and colonic transit. *Am J Physiol*. 259, 329-337.
- Bartolomucci, A., Palanza, P., Sacerdote, P., Panerai, A. E., Sgoifo, A., Dantzer, R., Parmigiani, S., 2005. Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. *Neurosci Biobehav Rev*. 29, 67-81.
- Bergman, K., Sarkar, P., O'Connor, T. G., Modi, N., Glover, V., 2007. Maternal stress during pregnancy predicts cognitive ability and fearfulness in infancy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiat*. 46, 1454-1463.

- Bethus, I., Lemaire, V., Lhomme, M., Goodall, G., 2005. Does prenatal stress affect latent inhibition? It depends on the gender. *Behav Brain Res.* 158, 331-338.
- Bindra, D., Spinner, N., 1958. Response to different degrees of novelty: the incidence of various activities. *J Exp Anal Behav.* 1, 341-350.
- Blanchard, R. J., Hebert, M., Sakai, R. R., McKittrick, C., Henrie, A., Yudko, E., McEwen, B. S., Blanchard, D. C., 1998. Chronic social stress: changes in behavioral and physiological indices of emotion. *Aggressive Behav.* 24, 307-321.
- Bohbot, V. D., Kalina, M., Stepankova, K., Spackova, N., Petrides, M., Nadel, L., 1998. Spatial memory deficits in patients with lesions to the right hippocampus and to the right parahippocampal cortex. *Neuropsychologia*, 36, 1217-1238.
- Bowman, R. E., MacLusky, N. J., Sarmiento, Y., Frankfurt, M., Gordon, M., Luine, V. N., 2004. Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology.* 145, 3778-3787.
- Brunson, K. L., Kramar, E., Lin, B., Chen, Y., Colgin, L. L., Yanagihara, T. K., Lynch, G., Baram, T. Z., 2005. Mechanisms of late-onset cognitive decline after early-life stress. *J Neurosci.* 25, 9328-9338.
- Campbell, J., 1983. Ambient stressors. *Environ Behav.* 15, 355-380.
- Campeau, S. and Watson, S. J., Jr., 2000. Connections of some auditory-responsive posterior thalamic nuclei putatively involved in activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in response to audiogenic stress in rats: an anterograde and retrograde tract tracing study combined with Fos expression. *J Comp Neurol.* 423, 474-491.
- Carrasco, G. A., Van de Kar, L. D., 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 463, 235-272.
- Cerqueira, J. J., Pego, J. M., Taipa, R., Bessa, J. M., Almeida, O. F., Sousa, N., 2005. Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors. *J Neurosci.* 25, 7792-7800.
- Chrousos, G. P., Gold, P. W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama.* 267, 1244-1252.
- Cohen A, 1977. Extraauditory effects of acoustic stimulation. In: *Handbook of Physiology-Reactions to Environmental Agents.* Am Physiol Soc, Bethesda, Md.
- Colbern, D. L., Isaacson, R. L., Green, E. J., Gispen, W.H., 1978. Repeated intraventricular injections of ACTH (1-24): the effects of home or novel environments on excessive grooming. *Behav Biol.* 23, 381-387.
- Cone, R. D., 2005. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci.* 8, 571-578.

- Darnaudery, M., Perez-Martin, M., Belizaire, G., Maccari, S., Garcia-Segura, L. M., 2006. Insulin-like growth factor 1 reduces age-related disorders induced by prenatal stress in female rats. *Neurobiol Aging*. 27, 119-127.
- de Kloet, E. R., 2003. Hormones, brain and stress. *Endocr Regul*. 37, 51-68.
- de Kloet, E. R., Oitzl, M. S., Joels, M., 1999. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci*. 22, 422-426.
- Douglas, L.A., Varlinskaya, E. I., Spear, L.P., 2003. Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: Effects of social isolation. *Physiol Behav*. 80, 317-325.
- Edwards, H. E., Burnham, W. M., 2001. The impact of corticosteroids on the developing animal. *Pediatr Res*. 50, 433-440.
- Feldman, S., Conforti, N., Weidenfeld, J., 1995. Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neurosci Biobehav Rev*. 19, 235-240.
- File, S. E., Mabbut, P. S., Walker, J. H., 1988. Comparison of adaptative responses in familiar and novel environments: modulatory factors. *Ann. NY Acad. Sci*. 525, 69-79.
- Frisone, D. F., Frye, C. A., Zimmerberg, B., 2002. Social isolation stress during the third week of life has age-dependent effects on spatial learning in rats. *Behav Brain Res*. 128, 153-160.
- Frick, K.L., Baxter, M.G., Markowska, A.L., Olton, D.S., Price, D.L., 1995. Age -related spatial reference and working memory deficits assessed in the wather maze. *Neurobiol Aging*. 16, 149-60.
- Gallagher, M., Pelleymounter, M.A. 1988. Spatial learning deficits in old rats: a model for memory decline in the aged. *Neurobiol Aging*. 9, 549-56
- Goldstein, D. S., 2003. Catecholamines and stress. *Endocr Regul*. 37, 69-80.
- Gregus, A., Wintink, A.J., Davis, A.C., Kalynchuk, L.E. 2005. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav Brain Res*. 156, 105-14
- Griffin, W. C., 3rd, Skinner, H. D., Salm, A. K., Birkle, D. L., 2003. Mild prenatal stress in rats is associated with enhanced conditioned fear. *Physiol Behav*. 79, 209-215.
- Harris, R. B., Gu, H., Mitchell, T. D., Endale, L., Russo, M., Ryan, D.H., 2003. Incresed glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. *Physiol Bahav*. 81, 557-568.
- Hayashi, A., Nagaoka, M., Yamada, K., Ichitani, Y., Miake, Y., Okado, N., 1998. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int J Dev Neurosci*. 16, 209-216.
- Heim, C., Nemeroff, C. B., 1999. The impact of early adverse experiences on brain

- systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol Psychiatry*. 46, 1509-1522.
- Herman, J. P., Cullinan, W. E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*. 20, 78-84.
- Höglund, A. U., Meyerson, B. J., 1982. Effect of lysine-vasopressin in an exploratory behavior test situation. *Physiol Behav*. 29, 189-193.
- Hosseini-Sharifabad, M., Hadinedoushan, H., 2007. Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus. *Anat Sci Int*. 82, 211-217.
- Jacobson, L., Sapolsky, R., 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev*. 12, 118-134.
- Isgor, C., Kabbaj, M., Akil, H., Watson, S. J., 2004. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus*, 14, 636-648.
- Kim, J. J., Diamond, D. M., 2002. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci*. 3, 453-462.
- Kim, H., Lee, M. H., Chang, H. K., Lee, T. H., Lee, H. H., Shin, M. C., Shin, M. S., Won, R., Shin, H. S., Kim, C. J., 2006. Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain Dev*. 28, 109-114.
- Kim, J. J., Song, E. Y., Kosten, T. A., 2006. Stress effects in the hippocampus: synaptic plasticity and memory. *Stress*, 9, 1-11.
- Klenerova, V., Sida, P., Krejci, I., Hlinak, Z., Hynie, S., 2007. Effects of two types of restraint stress on spontaneous behavior of Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Physiol Pharmacol*. 58, 83-94.
- Koo, J. W., Park, C. H., Choi, S. H., Kim, N. J., Kim, H. S., Choe, J. C., Suh, Y. H., 2003. The postnatal environment can counteract prenatal effects on cognitive ability, cell proliferation, and synaptic protein expression. *Faseb J*. 17, 1556-1558.
- Kosten, T. A., Lee, H. J., Kim, J. J., 2007. Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. *Brain Res*. 1154, 144-153.
- Lazarus R., Cohen J, 1977. Environmental stress. In I. Altman, y J. Wohlwill (Eds), *Human behavior and environment: Advances in theory and research*, New York: Plenum. Vol.2, 89-125.
- Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., Abrous, D. N., 2000. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 11032-11037.
- Leventopoulos, M., Ruedi-Bettschen, D., Knuesel, I., Feldon, J., Pryce, C. R., Opacka-Juffry, J., 2007. Long-term effects of early life deprivation on brain glia in Fischer

- rats. *Brain Res.* 1142, 119-126.
- Levine, S., Madden, J. I. V., Conner, R. L., Moskal, J. R., Anderson, C., 1973. Physiological and behavioral effects of prior aversive stimulation (preshock) in the rat. *Physiol Behav.* 10, 467-471.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., Meaney, M. J., 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277, 1659-1662.
- Lopez, J. F., Akil, H., Watson, S. J., 1999. Neural circuits mediating stress. *Biol Psychiat.* 46, 1461-1471.
- Lordi, B., Patin, V., Protais, P., Mellier, D., Caston, J., 2000. Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate, anxiety and memory capabilities of the offspring. *Int J Psychophysiol.* 37, 195-205.
- Luine, V. N., Richards, S.T., Wu, V.Y., Beck K.D. 1998. Estradiol enhances learning and memory in spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav.* 34, 149-62
- Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuenas, A. R., Cinque, C., Van Reeth, O. 2003. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev.* 27, 119-127.
- Manikandan, S., Padma, M. K., Srikumar, R., Jeya Parthasarathy, N., Muthuvel, A., Sheela Devi, R., 2006. Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett.* 399, 17-22.
- Marti, O., Armario, A., 1998. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci.* 16, 241-260.
- Maschke, C., Rupp, T., Hecht, K., 2000. The influence of stressors on biochemical reactions--a review of present scientific findings with noise. *Int J Hyg Environ Health.* 203, 45-53.
- Masini, C. V., Day, H. E., Campeau, S., 2008. Long-term habituation to repeated loud noise is impaired by relatively short interstressor intervals in rats. *Behav Neurosci.* 122, 210-223.
- McCormick, C. M., Mathews, I. Z., 2007. HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacol Biochem Behav.* 86, 220-233.
- McEwen, B. S., De Kloet, E. R., Rostene, W., 1986. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev.* 66, 1121-1188.
- McPherson, R. J., Gleason, C., Mascher-Denen, M., Chan, M., Kellert, B., Juul, S. E., 2007. A new model of neonatal stress which produces lasting neurobehavioral effects in adult rats. *Neonatology.* 92, 33-41.

- Meaney, M. J., Szyf, M., Seckl, J. R., 2007. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends Mol Med.* 13, 269-277.
- Meaney, M. J., Sapolsky, R. M., McEwen, B. S., 1985. The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. II. An autoradiographic study. *Brain Res.* 350, 165-168.
- Mercier, S., Canini, F., Buguet, A., Cespuglio, R., Martín, S., Bourdon, L., 2003. Behavioral changes after an acute stress: Stressor and test types influences. *Behav Brain Res.* 139, 167-175.
- Mesches, M. H., Fleshner, M., Heman, K.L., Rose, G. M., Diamond, D. M., 1999. Exposing Rats to a Predator Blocks Primed Burst Potentiation in the Hippocampus *In Vitro.* *J Neurosci.* 19, 1-5.
- Michaud, D. S., McLean, J., Keith, S. E., Ferrarotto, C., Hayley, S., Khan, S. A., Anisman, H., Merali, Z., 2003. Differential impact of audiogenic stressors on Lewis and Fischer rats: behavioral, neurochemical, and endocrine variations. *Neuropsychopharmacol.* 28, 1068-1081.
- Miller, D. B., O'Callaghan, J. P., 2003. Effects of aging and stress on hippocampal structure and function. *Metabolism.* 52, 17-21.
- Mizoguchi, K., Yuzurihara, M., Ishige, A., Sasaki, H., Chui, D. H., Tabira, T., 2000. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J Neurosci.* 20, 1568-1574.
- Morgado, I., 2005. [The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances]. *Rev Neurol.* 40, 289-297.
- Morinan, A., Parker, V., 1986. The socially isolated rat as a model for anxiety. *Neuropharmacol.* 25, 663-664.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, 681-683.
- O'Connor, T. M., O'Halloran, D. J., Shanahan, F., 2000. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *Qjm.* 93, 323-333.
- Oitzl, M. S., de Kloet, E. R., 1992. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav Neurosci.* 106, 62-71.
- Oitzl, M. S., Flutterm, M., de Kloet, E. R., 1994. The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. *Eur J Neurosci.* 6, 1072-1079.
- O'Keefe, J., Dostrovsky, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171-175.
- Olton, D. S., Walker, J. A., Gage, F. H., 1978. Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Res.* 139, 295-308.

- Owen, D., Andrews, M. H., Matthews, S. G., 2005. Maternal adversity, glucocorticoids and programming of neuroendocrine function and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 209-226.
- Pacak, K., Palkovits, M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev.* 22, 502-548.
- Pariante, C. M., Miller, A. H., 2001. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry.* 49, 391-404.
- Pascual, R., 2002. Early Disruption of Social Attachment Alters the Cytoarchitectonic Organization and Neuropeptide Expression in the Prefrontal Cortex. *Rev Chil Neuro-Psiquiat.* 40, 9-20.
- Pijlman, F. T. A., Wolterink, G., Van Ree, J. M., 2002. Cueing unavoidable physical but not emotional stress increases long-term behavioral effects in rats. *Behav Brain Res.* 134, 393-401.
- Rabat, A., Bouyer, J. J., Aran, J. M., Le Moal, M., Mayo, W., 2005. Chronic exposure to an environmental noise permanently disturbs sleep in rats: inter-individual vulnerability. *Brain Res.* 1059, 72-82.
- Rabat, A., Bouyer, J. J., George, O., Le Moal, M., Mayo, W., 2006. Chronic exposure of rats to noise: relationship between long-term memory deficits and slow wave sleep disturbances. *Behav Brain Res.* 171, 303-312.
- Reul, J. M., de Kloet, E. R., 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 117, 2505-2511.
- Rice, C. J., Sandman, C. A., Lenjavi, M. R., Baram, T. Z., 2008. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology*, 149, 4892-900.
- Roberts, S.C., Gosling, L. M., Thornton, E. A., Mcclaung, J., 2000. Scent-marking by male mice under the risk of predation. *Behav Ecol.* 12, 698-705.
- Rocher, C., Spedding, M., Munoz, C., Jay, T. M., 2004. Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. *Cereb Cortex.* 14, 224-229.
- Roozendaal, B., Portillo-Marquez, G., McGaugh, J. L., 1996. Basolateral amygdala lesions block glucocorticoid-induced modulation of memory for spatial learning. *Behav Neurosci.* 110, 1074-1083.
- Runyon, R.P., Haber, A., 1992. *Estadística para las Ciencias Sociales.* Addison-Wesley Iberoamericana, S. A.
- Salazar, R. F., White, W., Lacroix, L., Feldon, J., White, I. M., 2004. NMDA lesions in the medial prefrontal cortex impair the ability to inhibit responses during reversal of a simple spatial discrimination. *Behav Brain Res.* 152, 413-424.
- Samson, J., Sheeladevi, R., Ravindran, R., Senthilvelan, M., 2007. Stress response in rat brain after different durations of noise exposure. *Neurosci Res.* 57, 143-147.

- Sandi, C., 2003. [Glucocorticoid involvement in memory consolidation]. *Rev Neurol.* 37, 843-848.
- Sandi, C., Woodson, J. C., Haynes, V. F., Park, C. R., Touyarot, K., Lopez-Fernandez, M. A., Venero, C., Diamond, D. M., 2005. Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex. *Biol Psychiat.* 57, 856-864.
- Sandi, C., Pinelo-Nava, M. T., 2007. Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast.* 2007, 78970.
- Selye, H., 1998. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiat Clin Neurosci.* 10, 230-231.
- Schapiro, S., 1962. Pituitary ACTH and compensatory adrenal hypertrophy in stress-non-responsive infant rats. *Endocrinology.* 71, 986-989.
- Shors, T. J., 2006. Stressful experience and learning across the lifespan. *Annu Rev Psychol.* 57, 55-85.
- Shukitt-Hale, B., McEwen, J. J., Szprengiel, A., Joseph, J.A., 2004. Effect of age on the radial arm water maze-a test of spatial learning and memory. *Neurobiol Aging*, 25, 223-229.
- Slotten, H. A., Kalinichev, M., Hagan, J. J., Marsden, C. A., Fone, K. C., 2006. Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. *Brain Res.* 1097, 123-132.
- Son, G. H., Geum, D., Chung, S., Kim, E. J., Jo, J. H., Kim, C. M., Lee, K. H., Kim, H., Choi, S., Kim, H. T., Lee, C. J., Kim, K., 2006. Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *J Neurosci.* 26, 3309-3318.
- Spear, L. P., 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.* 24, 417-463.
- Spruijt, B. M., Van Hooff, J. A. R., Gispen, W. H., 1992. Ethiology and Neurobiology of Grooming behavior. *Physiol Rev.* 72, 825-852.
- Stamatakis, A., Pondiki, S., Kitraki, E., Diamantopoulou, A., Panagiotaropoulos, T., Raftogianni, A., Stylianopoulou, F., 2008. Effect of neonatal handling on adult rat spatial learning and memory following acute stress. *Stress*, 11, 148-159.
- Tang, A. C., Akers, K. G., Reeb, B. C., Romeo, R. D., McEwen, B. S., 2006. Programming social, cognitive, and neuroendocrine development by early exposure to novelty. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 15716-15721.
- Toth, E., Avital, A., Leshem, M., Richter-Levin, G., Braun, K., 2008. Neonatal and juvenile stress induces changes in adult social behavior without affecting cognitive function. *Behav Brain Res.* 190, 135-139.
- Toledo-Rodriguez, M., Sandi, C., 2007. Stress before puberty exerts a sex- and age-related impact on auditory and contextual fear conditioning in the rat. *Neural Plast.*

2007, 71203.

- Tsigos, C., Chrousos, G. P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 53, 865-871.
- Tsoory, M., Richter-Levin, G., 2006. Learning under stress in the adult rat is differentially affected by 'juvenile' or 'adolescent' stress. *Int J Neuropsychopharmacol.* 9, 713-728.
- Tsoory, M., Cohen, H., Richter-Levin, G., 2007. Juvenile stress induces a predisposition to either anxiety or depressive-like symptoms following stress in adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol.* 17, 245-256.
- Tsoory, M., Guterman, A., Richter-Levin, G., 2008. Exposure to stressors during juvenility disrupts development-related alterations in the PSA-NCAM to NCAM expression ratio: potential relevance for mood and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacol.* 33, 378-393.
- Valles, A., Marti, O., Armario, A., 2003. Long-term effects of a single exposure to immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: transcriptional evidence for a progressive desensitization process. *Eur J Neurosci.* 18, 1353-1361.
- Waye, K. P., Clow, A., Edwards, S., Hucklebridge, F., Rylander, R., 2003. Effects of nighttime low frequency noise on the cortisol response to awakening and subjective sleep quality. *Life Science,* 72, 863-75.
- Webster, J. C., Cidlowski, J. A., 1999. Mechanisms of Glucocorticoid-receptor-mediated Repression of Gene Expression. *Trends Endocrinol Metab.* 10, 396-402.
- Weinstock, M., 2001. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol.* 65, 427-451.
- Weinstock, M., 2008. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev.* 32, 1073-1086.
- Welberg, L. A., Seckl, J. R., 2001. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol.* 13, 113-128.
- Weller, A., Glaubman, H., Yehuda, S., Caspy, T. and Ben-Uria, Y., 1988. Acute and repeated gestational stress affect offspring learning and activity in rats. *Physiol Behav.* 43, 139-143.
- Westman Jack C., Walters James R. 1981. Noise and Stress: A comprehensive approach. *Environmental Healt Perspectives.* 41, 291-309.
- Wu, J., Song, T. B., Li, Y. J., He, K. S., Ge, L., Wang, L. R., 2007. Prenatal restraint stress impairs learning and memory and hippocampal PKCbeta1 expression and translocation in offspring rats. *Brain Res.* 1141, 205-213.
- Yaka, R., Salomon, S., Matzner, H., Weinstock, M., 2007. Effect of varied gestational stress on acquisition of spatial memory, hippocampal LTP and synaptic proteins in juvenile male rats. *Behav Brain Res.* 179, 126-132.

Zuena, A. R., Mairesse, J., Casolini, P., Cinque, C., Alema, G. S., Morley-Fletcher, S., Chiodi, V., Spagnoli, L. G., Gradini, R., Catalani, A., Nicoletti, F., Maccari, S., 2008. Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. PLoS ONE. 3, e2170.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

COMITÉ DE ÉTICA

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA AL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Evaluación de memoria espacial, memoria de trabajo y actividad exploratoria en un modelo de re-exposición a estrés: ruido ambiental en el desarrollo temprano y amenaza por depredador en la vida adulta.

CON NÚMERO DE REGISTRO ET022007-36

RESPONSABLE Dra. Sonia Luquín de Anda

NOMBRE DEL ALUMNO Rosa Yaveth Ruvalcaba Delgadillo

APROBADO SIN MODIFICACIONES ☒

RECHAZADO ☐

SUGERENCIAS:

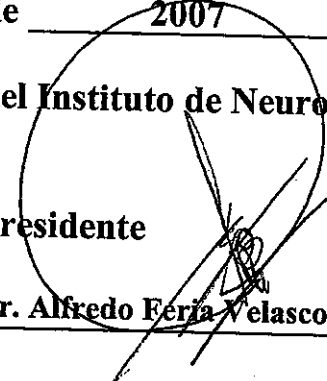
Recibí el 12-05-08

RECHAZADO DEBIDO A: _____

En caso de haber sido evaluado con sugerencias, se requiere someter a re-evaluación el proyecto de investigación, en primera instancia, al comité tutelar y posteriormente al Comité de Ética en un lapso máximo de 2 semanas a partir de esta fecha.

Se emite el presente DICTAMEN el día 29 de noviembre
de 2007, firmando los integrantes del Comité de Ética
del Instituto de Neurociencias.

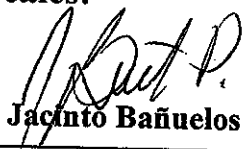
Presidente

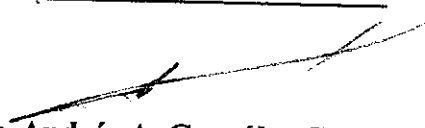

Dr. Alfredo Feria Velasco

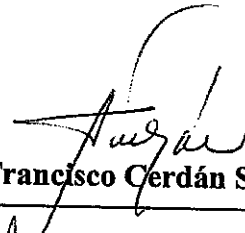
Secretaria


Dra. Marisela Hernández González

Vocales:


Dr. Jacinto Bañuelos Pineda


Dr. Andrés A. González Garrido


Dr. Luis Francisco Cerdán Sánchez


Dr. Jorge Juárez González

Ccp. Comité Tutelar correspondiente.