



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

"Efecto del estrés crónico y tratamiento con estreptozotocina sobre colina acetiltransferasa, plasticidad neuronal hipocampal y capacidad cognoscitiva en ratas jóvenes"

TESIS

QUE PRESENTA:

QFB. KARINA HERNÁNDEZ MERCADO

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN LA

ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. CLAUDIA PÉREZ CRUZ

MÉXICO,DF.

ENERO, 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría.

A mi tutora la Dra. Claudia Pérez Cruz, por su orientación, apoyo y visión crítica durante la realización de este trabajo. Gracias por brindarme la confianza y oportunidad de crecer e imaginar.

Al Dr. Luis Antonio Reyes Castro, por su inestimable ayuda y las importantes aportaciones al proyecto, por su paciencia, rigor y soporte.

A mis sinodales, la Dra. Erika Orta Salazar y El Dr. José Antonio Terrón por seguir de cerca este trabajo, sus observaciones y aportaciones a este trabajo.

Agradezco de manera especial a la maestra Martita, por todo su apoyo y conocimiento compartido. Gracias por tu humanidad y lucidez moral, eres grande.

A los biólogos Eduardo García y Mario Gil Moreno por brindarme siempre los recursos necesarios en el laboratorio, por los consejos y pláticas compartidas. A la Dra. Jacqueline Acosta por su apoyo en las técnicas experimentales.

A todas las personas que estuvieron conmigo en el hospital de Nutrición, a la Dra. Mariela Contreras por su paciencia al ayudarme a inocular y enseñarme sobre el manejo de animales. A los técnicos del bioterio, especialmente al señor Arturo y Miguel, por cuidar y atender a las ratas y facilitarme todos los materiales necesarios en cada experimentos. A mi equipo siempre fiel, Laura y Jimena, gracias por su amistad y soporte, cada día fue ameno y divertido gracias a ustedes. A la Dra. Vargas por sus consejos y pláticas.

A mis compañeros en el laboratorio 32, Taqueer, Juanito, Brenda Pérez, Brenda Mendoza, Mariel, Liz, Erick, gracias por su apoyo, por los momentos y risas compartidas, sin duda un gran equipo.

A mis compañeros de maestría, todos muy talentosos. Agradezco en especial a Yanahi Posadas y Víctor Color, gracias por todos los debates científicos y sociales, por seguir de cerca este proyecto, por su motivación y amistad.

A todos los doctores del departamento, por enseñarme tanto.

CONTENIDO

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	6
1.1 Mecanismos y efectos del estrés en el cerebro	6
1.1.2 Estrés y el cerebro adolescente	9
1.1.3 Modelos de estrés crónico utilizados en roedores	11
1.2 Diabetes y cognición	13
1.3 Sistema colinérgico y glucocorticoides.....	16
1.3.1 Estrés y el sistema colinérgico	18
1.4 JUSTIFICACIÓN.....	20
1.5 HIPÓTESIS	21
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	22
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	35
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	59
CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS	61
CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA	62

RESUMEN

El estrés crónico altera procesos de aprendizaje y memoria. Durante la adolescencia algunas partes del cerebro aún se encuentran en desarrollo y la exposición a eventos estresantes durante esta etapa, puede causar cambios plásticos a nivel del sistema nervioso central que resultan en alteraciones en el comportamiento. Por otro lado, enfermedades metabólicas como la diabetes, ocasionan degeneración de los procesos cognitivos e incrementan las probabilidades de desarrollar trastornos de ansiedad y depresión. Actualmente el impacto del estrés en el inicio y progresión de la diabetes es controversial. En experimentos con modelos animales se ha demostrado que el estrés crónico mitiga el desarrollo de la diabetes. Sin embargo, otros estudios reportan que la exposición a glucocorticoides inhibe la secreción y promueven la resistencia a insulina. A pesar de la importancia de estos dos factores en funciones cognitivas y la conducta emocional, hasta el momento no se ha reportado el efecto del estrés crónico en el desarrollo de diabetes en ratas adolescentes y su impacto en dichas funciones.

En este estudio, nosotros hipotetizamos que la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento en ratas adolescentes, exacerba los cambios neurobiológicos y conductuales inducidos por el subsecuente tratamiento con estreptozotocina (STZ), en el área CA3 del hipocampo, corteza prefrontal medial (CPFm) y el núcleo basal magnocelular (NBM), regiones cerebrales relacionadas con el aprendizaje, la memoria, el comportamiento de ansiedad y depresión. Para estudiar los mecanismos moleculares, nos enfocamos en el estudio de la proteína de densidad post-sináptica 95 (PSD-95) en CPFm y el área CA3 del hipocampo, y en la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) en NBM. Asimismo, examinamos los cambios neuromorfológicos de las espinas dendríticas en CPFm, y evaluamos las conductas relacionadas con ansiedad, depresión y memoria de trabajo a través del laberinto en cruz elevado, prueba de nado forzado y laberinto en T, respectivamente. Finalmente, medimos el efecto del estrés y la diabetes en el metabolismo energético periférico a través de la determinación en sangre de insulina, glucosa, colesterol y triglicéridos.

Nuestros resultados indican que, el estrés crónico aplicado en ratas adolescentes seguido de la inducción a diabetes experimental, alteran el metabolismo de los triglicéridos y aumentan el peso de las glándulas adrenales en comparación con ratas diabéticas que no se expusieron a estrés. El estrés crónico y la diabetes aumentan la inmunoreactividad de ChAT y PSD-95 en CPFm. Estos cambios se relacionan con el incremento en la conducta de ansiedad y depresión en las ratas diabéticas. Además, el estrés alteró la morfología de las espinas dendríticas, donde el número de espinas delgadas aumentaron y las espinas tipo hongo disminuyeron, en ratas diabéticas con exposición a estrés durante la adolescencia. Sin embargo, en el área CA3 del hipocampo la inmunoreactividad para PSD-95 incrementó en ratas diabéticas sin estrés y se mantuvo sin cambios en ratas diabéticas con estrés. En el laberinto en T, no se observaron alteraciones entre los grupos experimentales, lo que indica que los cambios neuro-anatómicos observados en CPFm, NBM y CA3 podrían estar compensando el daño inducido por ambas condiciones en la memoria de trabajo. Estos resultados aportan información para el manejo de los desórdenes afectivos relacionados con el estrés y la diabetes y abren una oportunidad para el estudio de los mecanismos de resiliencia y plasticidad que genera el estrés crónico para conservar las funciones de la memoria de trabajo, tras la exposición a diabetes.

ABSTRACT

Chronic stress triggers maladaptive changes altering learning and memory functions. During adolescence some parts of the brain are still under development and exposure to stress events may cause plastic changes in the central nervous system leading to behavioral alterations. Furthermore, metabolic diseases such as diabetes, also triggers cognitive decline and increase the risk to develop anxiety and depression. Actually, the effect of stress on development of diabetes is unclear. Animal models have shown that chronic stress dampers the development of streptozotocin (STZ) induced-diabetes. However a number of studies suggest that glucocorticoids inhibit insulin secretion and promote insulin resistance. Despite the importance of those two factors involved in cognitive functions, there are no reports regarding the effect of chronic stress in development of diabetes in adolescent rats, and its impact in cognitive functions and neuroanatomical alterations.

In this study, we hypothesized that chronic restraint stress in adolescent rats will augment the neuroplastic and behavioral changes caused by the further effect of STZ injection in CA3 of hippocampus, medial prefrontal cortex (mPFC) and magnocellular nucleus basalis (NBM), structures involved in learning and memory functions and anxiety and depression related behaviors. To explore the underlying molecular mechanisms we focused in the study of post-synaptic protein 95 (PSD-95) in mPFC and CA3 of hippocampus and choline acetyltransferase (ChAT) in NBM immunoreactivity. Also, we examined the number and morphology of dendritic spines in mPFC neurons and evaluated the behavioral alteration related to anxiety, depression and working memory through elevated plus maze, forced swing test and T-maze test respectively. Moreover, we measured the effects of stress and diabetes on peripheral energetic metabolism through insulin, glucose, cholesterol and triglycerides levels in bloom.

Our results showed that stress during adolescence followed by STZ-induced diabetes, causes maladaptive changes altering triglycerides metabolism and increasing adrenal weight. Chronic stress plus diabetes increased ChAT and PSD-95 immunoreactivity in mPFC. These effect can be related with an increased in anxiety and depression like-behavior in diabetic rats. Furthermore the number and morphology of dendritic spines in mPFC neurons of stress-diabetic rats showed a decreased number of mushroom spines while thin spines were increased. Moreover, in CA3 of hippocampus, the immunoreactivity of PSD-95 increased in no stress-diabetic rats and remained unchanged in stress-diabetic rats. In the T-maze, no impairments were observed between stress- and no stress-diabetic rats. The changes observed in mPFC, NBM and CA3 could compensate the damage induced by stress and diabetes in working memory. These data may offer important information to develop strategies to manage the incidence of negative stress and diabetes related neurobehavioral outcomes, like anxiety and depression and open an opportunity to study the mechanisms mediating stress resilience and plasticity during the adolescence, that may help to keep working memory function after an aggressive exposure to diabetes.

I. ANTECEDENTES

1.1 Mecanismos y efectos del estrés en el cerebro

En conjunto, el hipocampo, la corteza prefrontal (CPF) y la amígdala son las zonas cerebrales con mayor densidad a receptores a glucocorticoides (GC), encargadas de regular la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) y modular la consolidación de la memoria y el comportamiento. En el sistema nervioso central (SNC), los GC realizan sus funciones a través de dos vías principalmente: 1) la vía no genómica y 2) la vía genómica (McEwen et al., 2015).

Los efectos no genómicos de los GC se observan tras episodios cortos de estrés y tienen como finalidad la activación neuronal. Esto sucede a través de los receptores a mineralocorticoides (MR) presentes en la membrana presináptica, los cuales promueven la liberación de glutamato y con ello activación neuronal (Ver figura 1.1). Transcurrido un tiempo, los GC ejercen comunicación cruzada con el sistema endocanabinoide, quien se encarga de inhibir la liberación de glutamato, para frenar así la activación. Esta inactivación es un mecanismo para recuperar la homeóstasis y proteger de manera importante al hipocampo, CPF y amígdala de una sobreactivación (Hill & McEwen, 2010).

Los efectos genómicos se activan cuando la exposición al estresor se prolonga y la presencia de GC es continua. Bajo dichas condiciones, se observan modificaciones a nivel epigenético mediante la metilación y acetilación de histonas que le permiten al organismo responder o adaptarse a esta nueva condición. El mecanismo de acción genómico, involucra tanto la interacción directa con los elementos de respuesta a los GC (GRE) o a través de la activación de segundos mensajeros. La importancia del efecto a nivel epigenético es su impacto a largo plazo, ya que la presencia constante de un estresor, puede alterar el patrón de expresión genética y generar una respuesta diferente en el control y adaptación a nuevos estresores (Ver figura 1.1.2).

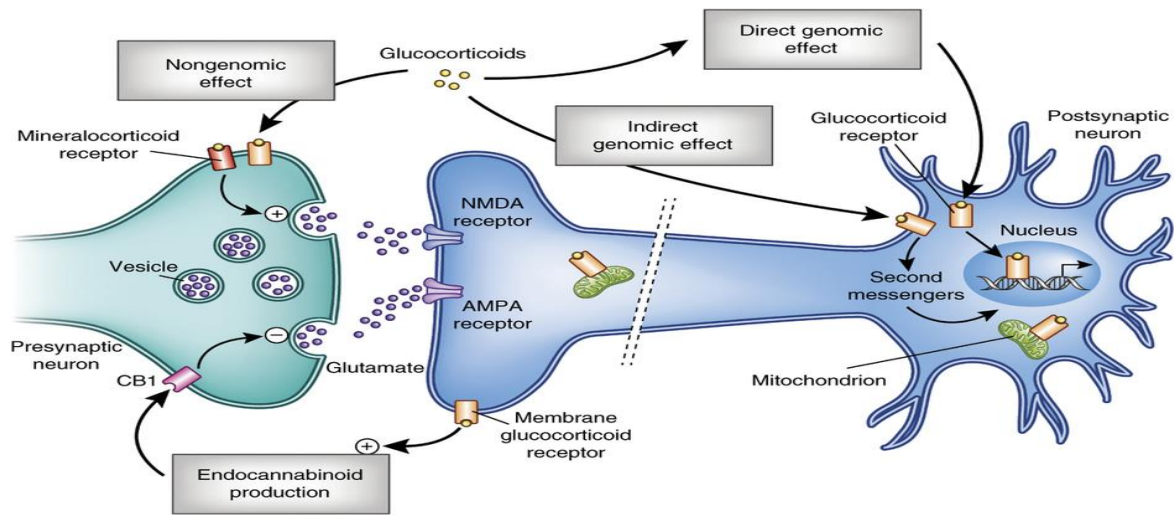


Figura 1.1. Los GC liberados de las glándulas adrenales pueden unirse con diferente afinidad a los receptores a MR y GR, los cuales se encuentran en la membrana neuronal o en el núcleo. Los efectos de los GC pueden ser mediante la vía no genómica (a través de receptores de membrana), la vía genómica indirecta (a través de segundos mensajeros) y vía genómica (a través de receptores citoplasmáticos, que se translocan al núcleo y actúan como factores de transcripción). Los receptores a GC activos, pueden translocar a la mitocondria y regula la oxidación mitocondrial. Los GC inducen la liberación de glutamato mediante la activación de receptores a MR. Otra forma en que los GC influyen en la neurotransmisión, es a través de la comunicación cruzada con los endocannabinoides, los cuales se unen al receptor de endocannabinoides CB1 e inhibe la liberación de glutamato. Este mecanismo es dependiente de GC. Tomado de McEwen et al.,2015.

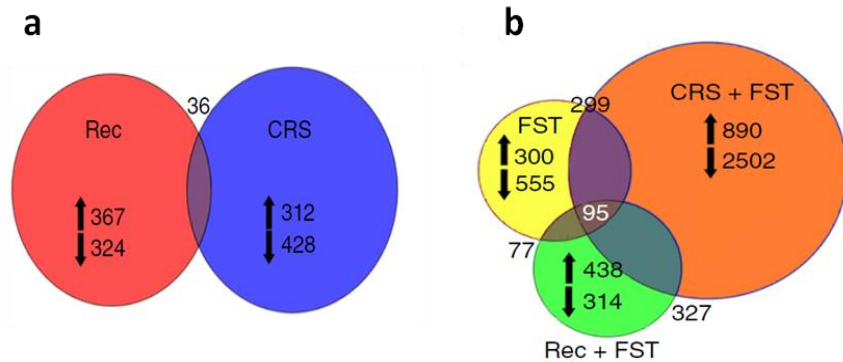


Figura 1.1.2. Cambios en la expresión genética en el hipocampo en respuesta al estrés y GC que dependen de los episodios de estrés en el pasado. Las flecha indican incremento o disminución de la expresión genética. a) Diagrama de Venn donde se observa la expresión de genes que fueron diferentes al control sin estrés tras un periodo de recuperación del CRS (Rojo), los cuales son diferentes de los genes expresados por CRS (Azul); se observan 36 genes comunes entre CRS y Rec. b) Diagrama de Venn donde se aprecia que FST modificó la expresión de 95 genes. En naranja observamos el número de genes que aumentan cuando al animal se le estresa con un nuevo estresor inmediatamente, el CRS se realizó previamente a FST. En verde observamos el efecto de un periodo de recuperación previo al FST. Abreviatura: FST, prueba de nado forzado; Cort, corticosterona; CRS, estrés crónico por restricción de movimiento; Rec, recuperación. Tomado de McEwen et al.,2015.

La exposición a GC de manera crónica, trae consigo cambios en la arquitectura neuronal del hipocampo, CPF y amígdala. Tras 21 días (6 h por día) de estrés crónico por restricción de movimiento (ECRM), se observa en el área CA3 del hipocampo una remodelación de las neuronas piramidales, caracterizada por un acortamiento del árbol dendrítico y disminución en la densidad de espinas de la dendrita apical (Margariños et al.,1995). Un fenómeno similar se observa en la corteza prefrontal medial (CPFm), específicamente en la región infra límbica (capa II/III), donde el mismo paradigma de estrés ocasiona atrofia y disminución en la densidad de espinas de la dendrita apical(Cook et al.,2004; Perez-Cruz et al., 2007). Sin embargo, la amígdala basolateral presenta un patrón de plasticidad diferente, donde las neuronas principales exhiben aumento en la arborización y un mayor número de espinas dendrítica tras la exposición a estrés crónico (Vyas et al., 2004).

Esta diferencia se relaciona con la función de cada región cerebral en la regulación del eje HPA. Es decir, la exposición continua y prolongada de GC en el hipocampo y CPF, inactiva al eje HPA, mientras que en la amígdala lo activa. A nivel conductual esta exposición crónica se relaciona con disminución en la memoria de trabajo, dependiente de hipocampo y CPF, y facilita el aprendizaje aversivo, que depende de la amígdala (Chattarji et al.,2015).

Por otro lado, modificaciones neuronales durante etapas de desarrollo cerebral, puede traer consecuencias neurológicas adversas. Se postula que el estrés genera una cicatriz de daños a lo largo de la vida, que pueden cambiar la trayectoria del envejecimiento cerebral. En este trabajo, nos enfocamos en los efectos del estrés durante la adolescencia, un periodo vulnerable donde el hipocampo, la amígdala y especialmente la CPF, se encuentran en constante maduración.

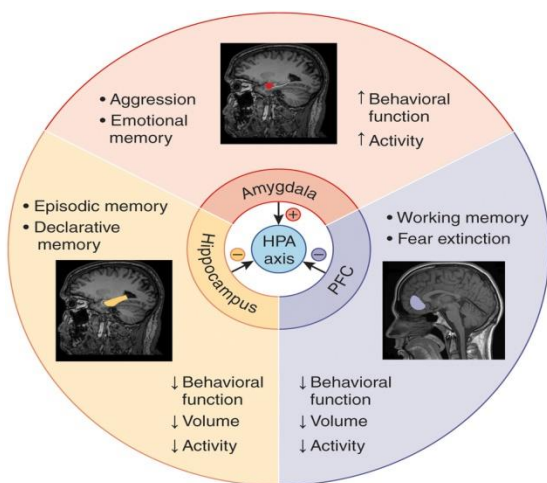


Figura 1.1.3 Áreas del cerebro implicadas en la regulación del y desordenes psiquiátricos relacionados al estrés. En naranja, la amígdala regula positivamente al eje HPA ; el estrés incrementa la memoria agresiva y emocional. En morado, la corteza prefrontal regula negativamente al eje HPA; el estrés disminuye la memoria de trabajo y la extinción del miedo. En amarillo, el hipocampo regula negativamente al eje HPA; el estrés disminuye la memoria episódica y declarativa. Tomado de Sumatra et al., 2015.

1.1.2 Estrés y el cerebro adolescente

La adolescencia es un periodo de la vida que transcurre entre la infancia y la edad adulta, siendo una etapa marcada por múltiples cambios neuroendocrinos, psicológicos y sociales. En esta edad se llevan a cabo la maduración de las habilidades cognitivas y se es más susceptible a desarrollar diversos desordenes, como: ansiedad, depresión, esquizofrenia y abuso en el consumo de drogas y alcohol. Se ha relacionado la exposición al estrés durante la pubertad y adolescencia, con una mayor vulnerabilidad a desarrollar trastornos de tipo psicológicos y conductuales (Chattarji et al., 2015; Klein et al., 2013).

En roedores, la etapa prepuberal inicia a los 21 días de edad. Aproximadamente a los 30 días edad, entran a la pubertad y adolescencia. Es durante este periodo donde se presentan las transformaciones físicas, neurobiológicas y de comportamiento típico observado en humanos y otras especies. Investigaciones recientes han demostrado que durante este periodo existe una maduración estructura y funcional del cerebro, particularmente en regiones límbicas y corticales (Eiland et al., 2013). Por ejemplo, el volumen del hipocampo y amígdala aumenta, mientras que en la CPF inicia un proceso de poda sináptica (pérdida de espinas dendríticas seguido de surgimiento de nuevas conexiones sinápticas) y muerte celular programada. Dado que estas zonas del cerebro están relacionadas con funciones cognitivas y emocionales, dichos proceso de maduración se vinculan con los cambios fisiológicos y psicológicos característicos de esta etapa (Eiland et al., 2013).

Durante la adolescencia, la respuesta del eje HPA es mayor y más prolongada en comparación con las etapas neonatal y adulto. En roedores adolescentes, tras la finalización del ECRM, la concentración de corticosterona se mantiene elevada el doble de tiempo en comparación con los adultos (70 días de edad), debido a que el mecanismo de retroalimentación negativa del eje HPA se encuentra inmaduro (ver figura 1.1.4).

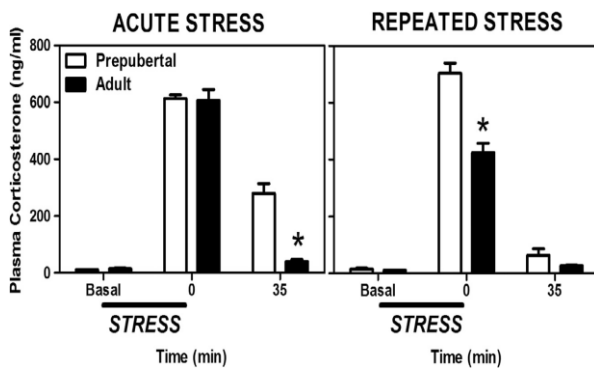


Figura 1.1.4. Concentraciones de corticosterona en plasma en ratos macho en etapa prepuberal (30 días) y adultos (70 días) antes y después de estrés agudo (una sesión) por restricción de movimiento durante 30 minutos (acute stress) o sesiones repetidas de estrés de 30 minutos durante 8 días (repeated stress). En el estrés agudo, las ratas en etapa prepuberal mantiene niveles altos de corticosterona 35 minutos después de finalizado el estrés en comparación con los adultos, quienes logran recuperar a niveles basales. En el estrés crónico (repeated stress) las ratas adultas mitigan la respuesta al estrés en comparación con las ratas en etapa prepuberal,

las cuales continúan con una respuesta pronunciada, lo cual indica que no se adaptaron al estresor, como lo hacen los adultos. Tomado de Eliand et al.,2013.

Otro efecto diferente del estrés en ratas adultas y adolescentes se observa en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), donde el ECRM disminuye los niveles de BDNF y reduce la neurogénesis en giro dentado de ratas adultas, mientras que en adolescentes aumenta (Toth et al.,2008). En cuanto a la reactividad a estímulos placenteros, el ECRM genera anhedonia (inhabilidad para tener experiencias placenteras) en ratas adultas, pero no en los animales adolescentes (Isgor et al.,2004). Estos datos sugieren que el mismo estresor puede producir efectos contrarios, dependiendo si éste se presenta a diferentes etapas del desarrollo. Además, el cerebro adolescente es más sensible a los GC en comparación con los adultos, dado que la misma concentración de corticosterona genera mayor expresión de receptores a glutamato en hipocampo (Romeo et al,2015).

En el 2004 Isgor y colaboradores publicaron la primera investigación sobre el efecto del estrés crónico en la adolescencia a nivel neuro-anatómico, ellos observaron alteraciones en el volumen hipocampal, donde el volumen de las áreas CA1 y giro dentado disminuyó, mientras que CA3 dejó de crecer en comparación con los controles. Los cambios en el hipocampo de los animales con estrés, se acompañaron de un menor desempeño en la prueba del laberinto acuático de Morris (Isgor et al.,2004). Estos resultados demostraron que, la etapa adolescente es un periodo susceptible a la exposición a estrés crónico, el cual modifica la perturba la morfología del hipocampo y las capacidades cognitivas.

En la figura 1.1.5, se puede apreciar los tres factores propuestos por Romeo y colaboradores que hacen a este periodo especialmente sensible a los efectos del estrés, el cual describen como la "tormenta perfecta" : 1) Mayor respuesta hormonal al estrés, 2) Cambios

neuroanatómicos en regiones cerebrales en maduración (amígdala, hipocampo y CPF), 3) Incremento en la sensibilidad a los GC en el hipocampo.

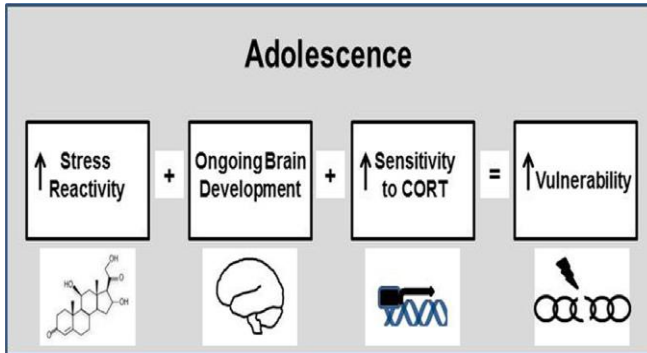


Figura 1.1.5. Representación esquemática de los factores que contribuyen con la susceptibilidad al estrés durante la adolescencia. Específicamente, se observan cambios en la reactividad del eje HPA, maduración cerebral y aumento en la sensibilidad a las hormonas del estrés. En conjunto, estos factores aumentan las probabilidades de desarrollar alteraciones relacionadas con el estrés como obesidad, desordenes psicológicos y adicciones. Tomada de Romeo et al.,2015.

1.1.3 Modelos de estrés crónico utilizados en roedores

Existen varios modelos de estrés en animales de experimentación, capaces de mimetizar las alteraciones psicológicas y fisiológicas que desarrollan los humanos con estrés. La elección del modelo de estrés crónico depende de las características de la investigación (Subiabre et al.,2012).

En roedores, el paradigma de estrés crónico más utilizado es el ECRM. En este modelo, el animal es introducido en un restrictor de acrílico o malla muy bien ventilada, durante 6 horas diarias por 21 días. Este protocolo se recomienda para evaluar deterioro en la memoria, ya que ocasiona retracción dendrítica en la región CA3 de hipocampo, disminuye la memoria de trabajo y aumenta el estrés oxidativo (Buynitsky & Mostofsky, 2009). Sin embargo, la duración y la frecuencia de exposición al estresor puede ser modificado dependiendo de los objetivos a estudiar. Por otro lado, existen otros paradigmas de estrés, donde se utilizan estresores psicosociales como la separación materno fetal, derrota social o naturalistas como la plataforma elevada o por olor del depredador entre otros.

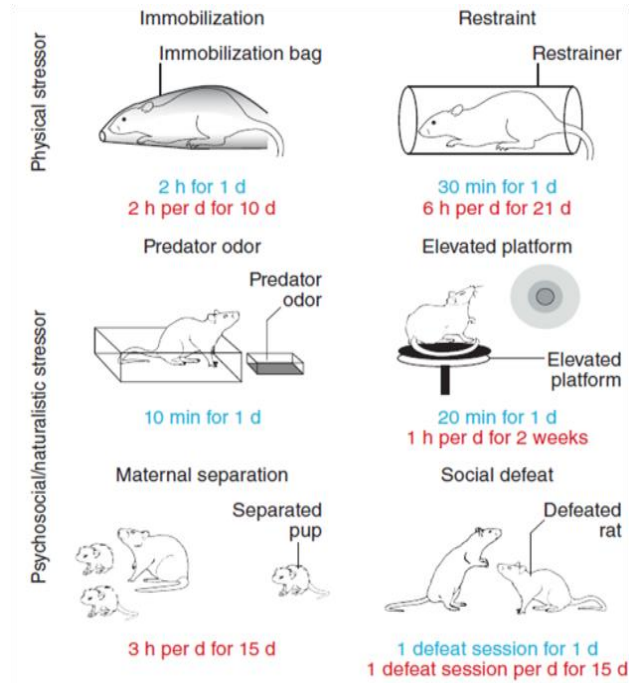


Figura 1.1.6. Modelos de estrés comúnmente utilizados en roedores. Diversos procedimientos se ha utilizado para estudiar los efectos del estrés en el SNC, lo cual incluye estresores físicos como, inmovilización y restricción de movimiento. Por otro lado, estresores psicosociales o naturalistas. En azul se indica la duración y frecuencia de un protocolo de estrés agudo y en rojo un protocolo crónico. Tomado de Sumantra et al.,2015.

1.2 Diabetes y cognición

La diabetes mellitus es un desorden endocrino donde el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas se encuentra alterado, se caracteriza por estados de hiperglucemia crónica como resultado de un deterioro en la secreción (diabetes tipo 1) o en la sensibilidad (diabetes tipo 2) a la insulina. A corto plazo, los estados de hiperglucemia causan sed, aumento de la frecuencia urinaria, hambre y disminución de peso corporal. A la larga, produce lesiones oculares, renales y aumenta el riesgo de sufrir cardiopatías, accidentes cerebro vasculares e insuficiencia circulatoria en los miembros inferiores (Alberti & Zimmet, 1998).

Diversos estudios han mostrado la existencia de una asociación epidemiológica entre la diabetes mellitus y la demencia. La hiperglucemia aguda, la microangiopatía, la hipoglucemia y la resistencia a la insulina son mecanismos implicados en la relación entre diabetes y deterioro cognitivo. Recientemente, se han reportado cambios electrofisiológicos y estructurales en el sistema nervioso central (SNC) que se relacionan con el deterioro cognitivo en diabetes tipo 1 y tipo2 (Formiga et al., 2014).

El hipocampo es un estructura importante para la integración del aprendizaje y la memoria, y es particularmente sensible a cambios en la homeostasis de glucosa (Starr et al., 2007). Por ejemplo, la regulación inadecuada de los niveles de glucosa altera las propiedades electrofisiológicas de las neuronas en esta región. En particular, los roedores en modelos de diabetes con estreptozotocina (STZ), presentan disminución en la potenciación a largo plazo (LTP) e incremento en la depresión a largo plazo (LTD) en comparación con los controles no diabéticos (Kamal et al.,1999; Kamal et al.,2006). Se cree que, estos cambios electrofisiológicos podrían relacionarse con el deterioro cognitivo presente en estos animales. Así mismo, en estudios histológicos se observa atrofia dendrítica en las neuronas piramidales de CA3 y redistribución de la proteína de densidad post-sináptica 95 (PSD-95), lo cual podría ser indicativo de un proceso sinaptogénico presente en el hipocampo de las ratas tras la administración STZ (Magariños et al., 2000).

Por otro lado, durante el envejecimiento normal en humanos, las habilidades cognitivas disminuyen, incrementa el riesgo de desarrollar y el hipocampo sufre cambios estructurales y morfológicos. En ratas viejas, las propiedades electrofisiológicas se ven alteradas, comprometiendo la plasticidad neuronal hipocampal (Wilson et al.,2006).

Los cambios observados durante el envejecimiento son similares a los reportados en la diabetes, por lo cual, se cree que el mecanismo de daño de la diabetes a nivel de SNC consiste en acelerar el envejecimiento cerebral (Ryan & Geckle, 2000). Esta aseveración se basa en tres características de esta patología que contribuyen con el envejecimiento cerebral, las cuales se describirán brevemente a continuación.

1. Insulina: la expresión de receptores a insulina en el hipocampo son importantes para la regulación de los procesos cognitivos. La administración de insulina en pacientes con Alzheimer mejora la memoria declarativa e incrementa la expresión de los receptores NMDA y AMPA (Skeberdis et al., 2001). Procesos similares se observan tras la administración de rosiglitazona, medicamento que aumenta la sensibilidad a insulina (Pedersen et al., 2006). En ratas diabéticas, la administración de insulina restaura la plasticidad neuronal en el hipocampo (Biessels et al., 1998). Por lo tanto, la disminución del receptor de insulina en la diabetes y la resistencia a insulina en la vejez, podrían iniciar el proceso neurodegenerativo.

2. Productos de glicación avanzada (AGEs): el mal control de la glucosa durante la diabetes incrementa los AGEs, productos formados por una reacción no enzimática entre azúcares y grupos amino y el estrés oxidativo. Los AGEs están implicados en procesos de envejecimiento celular y en el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes como, el daño vascular y renal. Además, los AGEs aumentan durante el envejecimiento natural, debido a la disminución en las enzimas antioxidantes y acumulación de radicales libres, lo cual favorece su generación. Este desbalance entre oxidantes / antioxidantes se observa en modelos animales de diabetes; de este modo los AGEs se convierten un factor etiológico en el desarrollo de alteraciones cognitivas en la diabetes y el envejecimiento (Goh et al., 2008; Takeuchi et al., 2007).

3. Alteración en el eje HPA: la diabetes ocasiona hiperactivación del eje HPA, con incremento de GC circulantes (Reagan et al., 2008). En ratas, la administración de corticosterona genera resistencia a la insulina y disminuye la sensibilidad de la insulina en el hipocampo. En ratas diabéticas con STZ y adrenalectomía (sin glándulas suprarrenales), la administración de bajas dosis de corticosterona mejoran la memoria espacial, mientras que altas dosis la empeoran (Stranahan et al., 2008). En humanos, los niveles de cortisol en líquido cefalorraquídeo son mayores en personas de edad avanzada en comparación con personas jóvenes (Swaab et al., 1994). En el hipocampo, se observa una disminución del receptor a GC tipo 1 (MR) y aumento en el receptor tipo 2 (GR); al incremento de este último se le atribuyen los daños ocasionados en el hipocampo.

Similar como en la adolescencia, en la vejez el eje HPA vuelve a tener una respuesta mayor y prolongada en comparación con los adultos (Gust et al., 2000). Por lo tanto, las alteraciones del

eje HPA presente en edades avanzadas, genera estados de hipercortisolemia que comprometen la función neuronal.

Por otro lado, la diabetes experimental con STZ representa un estresor crónico endógeno que produce alteraciones en el hipocampo de manera similar a las observadas por ECRM. En ratas con 21 días de ECRM, se produce retracción de la dendrita apical en el área CA3 del hipocampo, mientras que en ratas diabéticas (inducción con STZ) este cambio se genera más rápido tras 9 días de la inducción. El daño ocasionado en CA3 por el ECRM se potencializa cuando se aplica en ratas diabéticas. Una semana de ECRM en ratas diabéticas es suficiente para ocasionar atrofia dendrítica en CA3, lo cual toma 21 días en ratas control (sin diabetes). Las modificaciones que trae consigo el ECRM en ratas diabéticas provocan atrofia adrenal con niveles elevados de GC, por lo cual el daño en el hipocampo es mayor en comparación con ratas con estrés y sin diabetes, (Magariños et al.,2000).

Ésta combinación de factores actúan en conjunto para acelerar el envejecimiento cerebral en los pacientes diabéticos, lo que incrementa su vulnerabilidad para desarrollar desordenes relacionados con el envejecimiento, como la demencia (Wrighten et al.,2014).

1.3 Sistema colinérgico y glucocorticoides

Los principales grupos neuronales del sistema colinérgico se localizan en el cerebro basal anterior, el cual se encuentra dividido en seis núcleos (Ch1-Ch6). Las neuronas localizadas en el *septum medial* (MS) corresponden a los núcleos Ch1 y proyectan principalmente al hipocampo. El sector Ch2 se encuentra en el núcleo vertical de la banda diagonal Bronca (vDB), estas neuronas se encuentran a un lado del MS y proyectan de igual manera hacia el hipocampo. La sección horizontal de este la banda diagonal Bronca conforma la sección Ch3, el cual proyecta al bulbo olfatorio principalmente. El núcleo Ch4 está localizado en la sustancia *inominata*, globo pálido y principalmente en el núcleo basal magnocelular (NBM), las neuronas en este núcleo proyectan a corteza y la amígdala. Finalmente, las células colinérgicas de los sectores Ch5 y Ch6 se encuentran en el tallo cerebral e inervan al talamos e hipotálamo. El núcleo Ch5 se localiza en el pedúnculo pontino y el Ch6 se encuentra en el núcleo tegmental laterodorsal (Mesulam, et al., 1984; Purón et al., 2014).

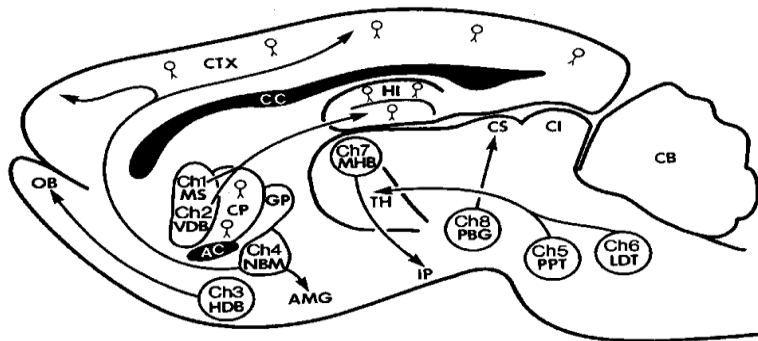


Figura 1.3.1 Núcleos colinérgicos del cerebro de ratona y sus proyecciones en plano sagital. Las neuronas colinérgicas se clasifican en seis grupos. Primer grupo está compuesto por el *septum medial* (MS); Segundo grupo integrado por vertical de la banda diagonal Bronca (VDB); Tercer grupo constituye la sección horizontal de esta banda diagonal Bronca (HDB); El cuarto grupo incluye al núcleo basal magnocelular (NBM) con proyecciones a corteza y amígdala; El grupo cinco y seis corresponden al pedúnculo pontino (PPT) y al núcleo tegmental laterodorsal (LTD). Corteza (CTX), hipocampo (HI), Caudado putamen (CP), Globo Pálido (GP), Bulbo olfatorio (OB), Cóliculos superiores (CS), Núcleo Acumbens (NAcc-AC), Cuerpo Caloso (CC), cerebelo (CB). Tomado de Mesulam, et al., 1984; Purón et al., 2014.

Los principales componentes de este sistema son: el neurotransmisor acetilcolina (ACh), la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que se encarga de la ruptura de ACh, la enzima colina aetiltransferasa (ChAT) la cual, participa en la síntesis de ACh y los receptores nicotínicos y muscarínicos pre y posinápticos (Paul et al., 2015).

Desde ya hace varios años se ha relacionado a este sistema con la regulación de varios procesos cognitivos. Cuando se bloquea la actividad central de este sistema con la administración de escopolamina (un antagonista competitivo no selectivo de los receptores muscarínicos) se observan alteraciones en la memoria de individuos jóvenes, similares a las deficiencias presentes en ancianos. Dicho daño se revierte al administrar fisostigmina, un estimulante colinérgico anticolinesterásico (Bartus et al.,1978; Drachman et al., 1977). De hecho, actualmente se utilizan inhibidores de AChE, como: el donepezil, rivastigmina y galantamina en el tratamiento para la enfermedad de Alzheimer (EA). Si bien esta terapia origina una ligera mejoría en la memoria de los pacientes, solo es efectiva en los inicios de la enfermedad y no ofrece efecto en estadios posteriores, donde el sistema colinérgico se encuentra deteriorado (Doody et al., 2001; Group et al.,2004).

En pacientes con demencia moderada e inicios de EA, se observa una reducción del factor de crecimiento neuronal (FCN) en neuronas colinérgicas. Estas modificaciones moleculares tempranas dan pie a la demencia de inicio temprano en EA que conducen, con el tiempo, a la degeneración progresiva de este sistema (Elliott et al., 2007).

Por otro lado, alteraciones en el sistema colinérgico, disminuye la habilidad del hipocampo para enfrentar insultos posteriores como el estrés, perturbaciones circadianas, la vejez, entre otros; De esta manera, aumentan las probabilidades de desarrollar problemas cognitivos (ver figura 1.3.2) (Craig et al.,2011). Con lo anterior, es importante estudiar los factores que a lo largo de la vida puedan debilitar al sistema colinérgico y le impidan responder de manera efectiva en situaciones posteriores. Como mencionaremos a continuación, los GC y el estrés, interactúan de manera importante con el sistema colinérgico, en conjunto, modulan procesos de plasticidad en regiones cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria, como lo son el hipocampo, la CPF y la amígdala (Paul et al.,2015). Situaciones de estrés crónico con elevación de GC, podrían modificar a este sistema.

1.3.1 Estrés y el sistema colinérgico

El estrés crónico y niveles elevados de GC ejercen un efecto negativo en la memoria y aprendizaje. La innervación colinérgica modula procesos cognitivos y sufre deterioro durante el envejecimiento. Se relaciona a este sistema con la actividad de los GC, ya que diversos estudios han indicado su interacción y vulnerabilidad en respuesta al estrés.

En 1994, el trabajo de Cintra y colaboradores arrojaron los primeros indicios de esta relación, demostrando la presencia de receptores a GC en las neuronas de los núcleos basales. (Cintra et al., 1994); Más tarde, Abrahám y colaboradores en el 2000, observan una respuesta U-invertida en el NBM tras la administración de corticosterona en ratas con adrenalectomía. Dosis ligeramente altas generan un efecto protector en las neuronas colinérgicas del NBM ante una lesión citotóxica, mientras que dosis más altas potencializan la lesión (Abrahám et al.,2000).

En ratas expuestas a GC en etapas posnatales e inmunizadas con Saporina-IgG-192 (inmunotoxina que produce lesión selectiva y permanente de neuronas colinérgica) en la edad adulta, presentan una disminución más pronunciada de ChAT y del receptor a GC, acompañada de niveles elevados de la hormona liberadora de corticotropina (CRF) en comparación con animales lesionados control (sin exposición a GC en etapa prenatal). Estos datos indican que, el estrés juega un papel pre-condicionante sobre las neuronas colinérgicas al hacerlas más proclives a la neurodegeneración en etapas posteriores de la vida (Aisa et al., 2009; Emgard et al.,2007).

Craig y colaboradores obtienen resultados similares en ratas adultas, tras lesionar el septum medial con Saporina-IgG-192 y posteriormente someter a ECRM, observaron que los animales lesionados y estresados, presentan alteraciones en la memoria espacial en comparación con los animales que solo fueron lesionados pero no estresados (Craig et al.,2011).

Por otro lado, se ha reportado que en respuesta a un estímulo estresante los niveles de ACh en hipocampo y CPF incrementan solo en ratas jóvenes y no en viejas (Mark et al., 1996; Mizuno et al.,1997). Episodios de estrés crónico disminuyen la reactividad del péptido neuroestimulador colinérgico del hipocampo (PNCH) y en consecuencia los niveles de ACh se reducen, debido a que dicho péptido estimula la actividad de la enzima ChAT (Kim et al.,2007). Se presenta una disminución similar de este péptido en la EA, la cual está asociada con desregulación del eje HPA y niveles altos de GC.

1.4 JUSTIFICAIÓN

La adolescencia es una etapa que transcurre entre la infancia y la edad adulta, caracterizada por grandes cambios físicos, mentales, emocionales y sociales. Durante este proceso biológico, aumentan las probabilidades de desarrollar trastornos mentales y dependencias al alcohol, tabaco y otras adicciones debido a que ciertas regiones del cerebro aún se encuentran en maduración.

El estrés crónico tiene un impacto negativo en el desarrollo cerebral, especialmente en estructuras con alta capacidad de plasticidad como el hipocampo, la amígdala y la CPF. Durante la adolescencia estas regiones continúan en maduración (Green et al., 2013). La influencia de las hormonas del estrés puede alterar el desarrollo normal de conexiones y circuitos neuronales en estas zonas cerebrales. Es conocido que el hipocampo realiza procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje, este interactúa con la CPF donde se realizan procesos ejecutivos como la toma de decisiones. A su vez, la amígdala se encarga del control de las emociones. Por lo tanto, alteraciones en estos circuitos neuronales por la exposición a estrés durante la adolescencia, podría traer consecuencias negativas a largo plazo como, modificaciones cognitivas y emocionales (Green et al., 2013; Eliand et al, 2013).

Por otra parte, estresores endógenos como la diabetes, afectan funciones metabólicas periféricas que impactan la integridad de las neuronas en el cerebro. Se ha sugerido que, episodios constantes de estrés durante la adolescencia pudieran dejar más vulnerable al organismo ante un insulto metabólico (como la diabetes), debido a los elevados niveles de GC y su impacto en la modulación del metabolismo energético (Magariños et al.,2000). Sin embargo, existen resultados contradictorios en la literatura al respecto.

Un sistema importante que se relaciona con la regulación de la respuesta al estrés en hipocampo y la CPF, es el sistema colinérgico (Paul et al., 2015). Por lo tanto, en el presente proyecto se pretende evaluar el efecto del estrés crónico en edades jóvenes y el subsecuente impacto de la diabetes experimental mediante la administración de STZ en edades adultas, sobre el estado emocional, las capacidades cognoscitivas, el sistema colinérgico y la integridad sináptica en hipocampo y CPF, regiones del cerebro vulnerables a estos procesos.

1.5 HIPÓTESIS.

El estrés crónico exacerbará los cambios inducidos por el tratamiento con estreptozotocina sobre colina acetiltransferasa en el núcleo basal magnocelular, la plasticidad neuronal en hipocampo y corteza prefrontal medial, así como el deterioro emocional y cognoscitivo en ratas jóvenes.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Determinar el efecto del estrés crónico y del tratamiento con estreptozotocina sobre los niveles de colina acetiltransferasa en núcleo basal magnocelular, la plasticidad neuronal en el hipocampo y la corteza prefrontal medial, así como su impacto en la capacidad cognoscitiva y emocional en ratas.

2.2 Objetivos específicos.

2.2.1 Estimar el efecto del estrés crónico y tratamiento con estreptozotocina sobre marcadores metabólicos: glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos en sangre.

2.2.2 Determinar el efecto del estrés crónico y tratamiento con estreptozotocina en el tamaño de las glándulas adrenales y peso corporal.

2.2.3 Examinar el efecto del estrés crónico y tratamiento con estreptozotocina sobre la ansiedad generada en los animales de experimentación a través del laberinto en cruz elevado.

2.2.4 Evaluar el efecto del estrés crónico y tratamiento con estreptozotocina en la memoria espacial y de trabajo de los roedores, empleando el laberinto en T.

2.2.5 Examinar la conducta relacionada con depresión a través de la prueba de nado forzado.

2.2.6 Determinar la inmunoreactividad de la colina acetiltransferasa en el Núcleo Basal Magnocelular y de PSD-95 en la región CA3 del hipocampo y corteza prefrontal medial.

2.2.7 Estudiar los cambios neuromorfológicos de las espinas dendríticas en corteza prefrontal medial.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales y condiciones de alojamiento

Se utilizaron ratas Wistar macho de 20-23 días de edad (50-75 g) del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, quienes fueron manejadas de acuerdo la Norma Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999. Los animales se agruparon en cinco individuos por caja y se mantuvieron en condiciones de ciclos luz/oscuridad de 12 hrs (luz encendida a las 7:00 am), con acceso a agua y comida *ad libitum*.

3.2 Diseño experimental

Una vez que los animales fueron aclimatados a las condiciones del cuarto e investigador, se inició el protocolo experimental el cual se dividió en 4 etapas que se describirán a continuación.

3.2.1 ETAPA 1: Estrés crónico por restricción de movimiento

Se formaron 2 grupos que fueron manejados de la siguiente manera del día 1 al día 22 de experimentación.

- a) **Estrés crónico (E):** Los animales se sometieron a un protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento (ECRM), durante 6 horas diarias por 5 días y después 4 horas diarias durante 15 días, completado un esquema de 21 de restricción de movimiento como se ha reportado anteriormente (n= 24 animales) (Tatyana et al., 2009)(Katie J et al., 2007).
- b) **No estrés (NE):** Los animales fueron manipulados diariamente por el experimentador por 5 minutos aproximadamente y regresados a sus jaulas de confinamiento diariamente (n= 24 animales).

Los animales del grupo E se introdujeron en un restrictor cilíndrico de acrílico con orificios de ventilación, durante 6 horas diarias por 5 días y después 4 horas diarias durante 15 días, completado un esquema de 21 de restricción de movimiento. Para las ratas de 21-25 días de edad (50-75 g), se utilizaron restrictores cilíndricos de acrílico con las siguientes dimensiones: 1 ¼" de diámetro por 5" de largo; para las ratas de 26-42 días de edad (5-150 g) 2" de diámetro por 8" largo. Medidas indicadas por IITC Life Science Inc.

Este procedimiento se realizó en un intervalo de horario de 7:00 a 15:00; al término de las respectivas horas de ECRM, las ratas se limpiaron con toallas húmedas; una vez limpias y secas, se regresaron a sus cajas de confinamiento.

3.2.1.a Evaluación de conducta relacionada con ansiedad

Para evaluar la conducta relacionada con ansiedad se realizó la prueba del laberinto en cruz elevado (LCE) 24 horas después de la última inmovilización. Este paradigma se basa en la libre exploración que presentan los roedores ante un ambiente nuevo, su diseño en cruz permite elegir entre dos pares de zonas distintas: un par de brazos peligrosos (brazos abiertos) y un par de brazos seguros (brazos cerrados). Los animales ansiosos evitan entrar a los brazos abiertos, por lo tanto el número de entradas, el tiempo y la distancia recorridas en este brazo, representan un buen indicador de ansiedad (Walf et al.,2007).

Las características del laberinto utilizado en este trabajo consintió en dos brazos cerrados de 50 cm de largo y 10 cm de anchura, cubiertos con paredes de 30 cm de altura. Los brazos abiertos fueron de las mismas longitudes que los cerrados, pero estos no estaban cubiertos por paredes. El laberinto se estaba elevado a 50 cm de piso y se ubicó en un cuarto especial para realizar la prueba en condiciones de oscuridad; una cámara infrarroja permitió al sistema de video y rastreo capturar cada sesión (ANY maze Video Tracking Software) (ver figura 3.2.1.a).

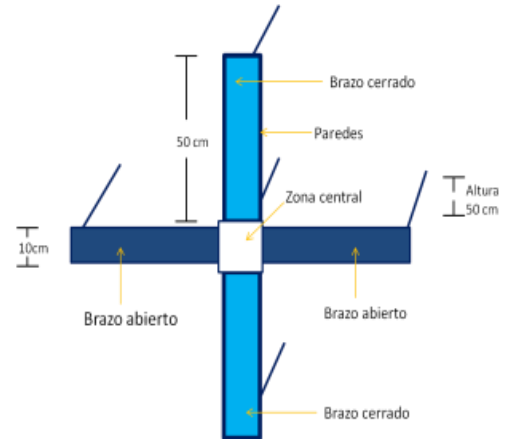


Figura 3.2.1.a: Características del laberinto en cruz.

El procedimiento utilizado en esta prueba fue el siguiente:

1. Antes de cada prueba se limpió y secó el laberinto con una solución de alcohol al 10% y se ingresó al programa los datos de cada animal. Se colocó al animal en la zona central de cara al brazo cerrado, que es la región donde los brazos abiertos y cerrados se cruzan.
2. Una vez posicionado al animal, se le permitió libre exploración por el laberinto durante 5 minutos. Durante este tiempo el sistema de vídeo y rastreo capturaba el número de entradas, el tiempo y la distancia recorridas en cada brazo. En caso de que un animal se cayera de los brazos, se detenía el programa y se colocaba al animal en la zona central para completar el tiempo de prueba.
3. Al finalizar el tiempo de exploración, se retiró al animal del laberinto y se colocó en su caja de confinamiento. Antes de colocar a otro animal, se realizó la limpieza del laberinto, como en el paso 1.

Esta prueba se realizó en un horario de 9:00 a 15:00 horas. El número de entradas, el tiempo y la distancia recorrida en cada brazo, fueron analizados.

3.2.1.b Determinación de marcadores metabólicos en sangre

Para la determinación de glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos, se realizó una toma de sangre ocular el día 22 (toma 1) en seis animales representativos por grupo. Se tomaron muestras subsiguientes previo a la inducción a diabetes al día 35 (toma 2) y momentos antes del sacrificio al día 60 (toma 3). Las tomas fueron realizadas con un ayuno de 6 horas. Para la extracción de sangre ocular, tras anestesiarse a los animales (cámara cerrada con éter), se les introdujo un tubo capilar con heparina por el ángulo medial del ojo a través de la membrana nictitante en dirección ventro-medio-caudal. Una vez dentro del seno venoso, la sangre se recolectó en un tubo seco para su posterior centrifugación. Los sueros fueron almacenados en tubos eppendorf a -70 °C hasta su procesamiento.

3.2.2 ETAPA 2: Inducción a diabetes mediante administración de estreptozotocina.

Una vez transcurridos 15 días de la última inmovilización por ECRM, se llevó a cabo la inducción a diabetes experimental mediante la administración de estreptozotocina (STZ).

La STZ (Sigma-Aldrich Cat. No.S0130; lote # SLBJ7785V) se disolvió en una solución amortiguadora de citratos (pH 4.5) como vehículo (VHC) a una temperatura aproximadamente de 4°C (sobre hielo). Cada dosis de STZ se pesó de manera individual para cada animal y se protegió de la luz en todo momento. La preparación de la disolución (STZ + VHC) se realizó al instante minutos previos de cada administración. La mitad de los animales de cada grupo (E,NE) recibieron a una inyección vía intravenosa (i.v) en la vena lateral de la cola, de 60 mg/ kg de STZ (n= 12 animales), mientras que la otra mitad recibieron 300 µL del vehículo vía i.v (n= 12 animales). Los animales fueron regresados a sus cajas bajo observación durante los días posteriores.

3.2.2.a Control de glucosa tras la administración de STZ

Para evaluar el efecto de STZ en los niveles de glucosa en la sangre, se realizó un punción en el extremo distal de la cola de la rata con una lanceta y la gota de sangre obtenida de la herida (0.1 µL) se recolectó directamente en una tira reactiva, previamente insertada en un glucómetro digital (Accu-CHEK Active® Roche Diagnostics).

A todos los animales se les determinó los niveles de glucosa basal 24 horas previas a la administración de STZ y 72 horas después, con un ayuno de 4 horas. Posteriormente, se hizo una determinación de glucosa cada dos semanas hasta el final del experimento. Aquellos animales que 72 horas después de la administración presentaron valores de glucosa mayor o igual a 200 mg/dL fueron incluidos en el estudio (García Z.U, 2011).

3.2.3 ETAPA 3: Evaluación final de conductas relacionadas con ansiedad, depresión y memoria de trabajo

Transcurridos 16 días de la inducción a diabetes experimental y una semana antes del sacrificio, se realizó nuevamente la prueba del LCE, con la intención de evaluar la ansiedad de nuestros animales tras el desarrollo del segundo insulto, la diabetes. Esta prueba se realizó bajo las mismas condiciones y procedimiento descritos en el numeral 3.2.1a.

Tres días después de la prueba LCE, se evaluaron las habilidades cognitivas de los animales mediante la prueba de alternación espontánea del laberinto en T. El aparato consiste en un brazo (zona de inicio) que se bifurca en dos brazos más en forma de T (zona de elección); en la entrada de cada brazo, se encuentra una puerta (guillotina). En el punto donde interceptan los tres brazos se localiza la zona media y la división central (ver figura 6.2.3).

El fundamento de esta prueba se basa en el comportamiento natural de alternancia espontánea que presentan los roedores, es decir, exploran de manera alternada ambos brazos del laberinto. Lo que se mide es el número de aciertos con respecto al total de sesiones (% alternación), el tiempo que tarda el animal en entrar al brazo de elección (latencia) y la duración en la zona media, con estos, logramos tener medidas aceptables, para evaluar la memoria de trabajo de nuestros animales en estudio (Deacon et al., 2006).

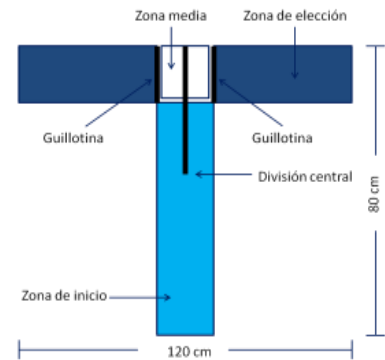


Figura 3.2.3: Laberinto en T.

El procedimiento utilizado para cada ensayo en esta prueba, fue el siguiente:

1. Se limpió y esparció aserrín (similar al de las jaulas de confinamiento) y se colocó la división central.
2. Fase de prueba: se situó al animal en la zona de inicio y se le permitió elegir libremente algunos de los brazos.
3. Tras la elección, se confinó al animal en el brazo seleccionado durante 30 segundos, bajando la guillotina de brazo correspondiente.
4. Después de los 30 segundos de confinamiento, se levantó la guillotina y se dirigió a la zona de inicio, donde se retiró del laberinto y destinó a su caja por 2 minutos.
5. Durante los 2 minutos, se limpió y se mezcló el aserrín nuevamente, para evitar pistas de olor en el laberinto. Se retiró la división central.

6. Fase de elección: trascurridos los 2 minutos, se situó nuevamente la animal en la zona de inicio y se le permitió libre elección entre los dos brazos.

Se realizaron 3 ensayos por día, durante 2 días en un horario de 9:00 a 15:00 horas, completando un total de 6 ensayos por animal. El % de alternación, la latencia y el tiempo en la zona media, fueron analizados (ver figura 3.2.3a).

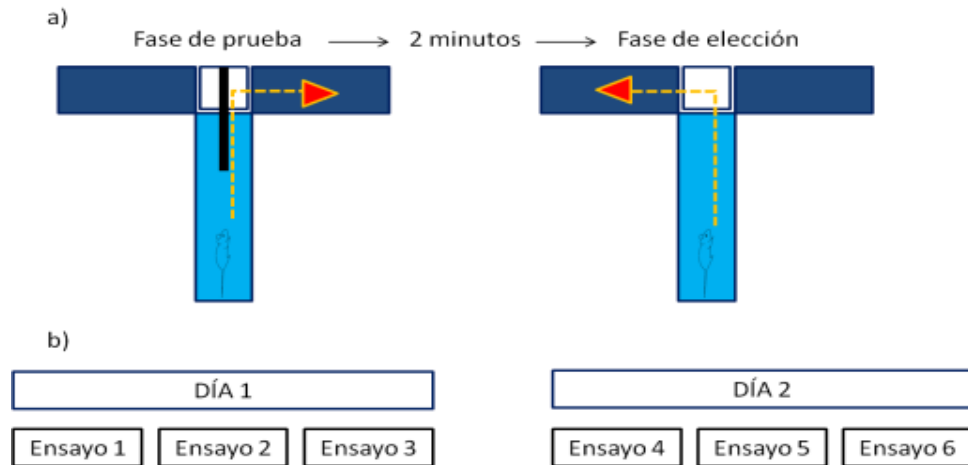


Figura 3.2.3a. Protocolo experimental laberinto en T. a) Procedimiento de un ensayo en el laberinto en T, donde se observa el comportamiento de alternación espontánea entre la fase de prueba y la fase de elección; b) protocolo experimental de dos días con un total de 6 ensayos.

Finalmente, 3 días después del ensayo de alternación espontánea del laberinto en T, se realizó la prueba de nado forzado (PNF) en todos los animales para evaluar conductas depresivas en los animales.

La PNF consiste en colocar al animal en un recipiente con agua donde no exista la posibilidad de escapar, esta situación estresante después de un cierto tiempo, conduce al animal a un estado de desesperanza que se caracteriza por una alta frecuencia y duración de los periodos de inmovilización. Éste hecho es interpretado como una disminución de la motivación del individuo para buscar una salida al problema (Landa et al.,2000).

Las características de los recipientes utilizados en éste trabajo fueron, 4 cilindros de acrílico de 45 cm de altura por 20 cm de diámetro. Éstos fueron llenados con agua (23-25 °C) hasta los 30 cm de

altura. Para evitar que los animales se vieran durante la prueba (lo cual puede alterar la conducta), se colocaron 2 divisores rectangulares de 60 cm de alto por 40 cm de ancho, los cuales formaban dos paredes por cilindro. Una cámara fue colocada en un tripié para la grabación de cada prueba (ver figura 3.2.3b).

El procedimiento utilizado para realizar esta prueba, fue el siguiente:

1. Se sujetó de la cola a cada animal y gentilmente se introdujo de manera individual en el cilindro con agua a una temperatura de 23-25 °C.
2. Una vez dentro del agua, se inició el conteo regresivo, con un tiempo total de 6 minutos.
3. Al finalizar los 6 minutos cada animal se retiró del cilindro (sujetándole por la cola), en el mismo orden en que fueron introducidos.
4. Los animales se secaron con una toalla y se colocaron bajo una cama con un foco para mantener su temperatura, una vez secos, se regresaron a su caja de confinamiento.

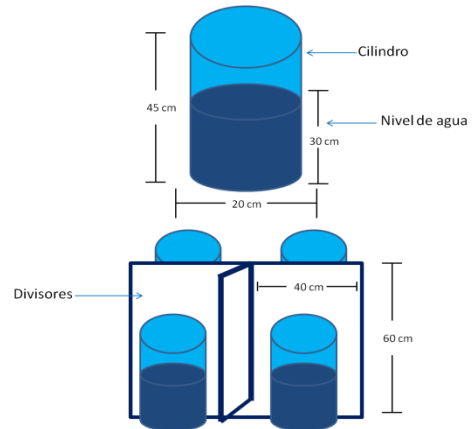


Figura 3.2.3b: Características de los cilindros.

Esta prueba se realizó en un horario de 9:00 a 15:00 horas. Los vídeos fueron analizados manualmente de la siguiente manera (Slattery et al.,2012;Can et al.,2012):

1. Cada video se enmascaró con un código para prevenir el sesgo en la medición.
2. La inmovilización se consideró como el comportamiento de flotar sobre el agua sin realizar ningún movimiento de escape, solo el mínimo necesario para mantener la cabeza por arriba del nivel del agua.
3. Con un cronometro digital, se contó el tiempo que cada animal permanecía inmóvil y se calculó el porcentaje de inmovilización (Tiempo inmóvil (s) / tiempo total de la prueba (s) *100).

3.2.4 ETAPA 4: Eutanasia y manejo de tejidos

La eutanasia se llevó a cabo 25 días después de la administración de STZ. La mitad de animales de cada grupo se sacrificó por decapitación con guillotina, mientras que la otra mitad por perfusión intracardiaca.

Para el procedimiento de perfusión intracardiaca, los animales se anestesiaron con pentobarbital (50 mg/kg, ip). Se realizó el monitoreo del efecto anestésico observando la presencia de signos vitales (pulso cardíaco y respiratorio), así como la ausencia de reacción al dolor en una de las extremidades. Una vez que el animal alcanzó dicho efecto anestésico, se llevó a cabo la técnica de perfusión intracardiaca con buffer fosfato (0.1 M, con pH de 7.4). El hemisferio derecho de cada cerebro, se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% (PFA, 4%, pH 7.4) durante 2 horas, y después se cambió a una solución de PBS (0.1 M, con pH de 7.4) hasta su procesamiento para marcaje diolístico. El hemisferio izquierdo se dejó en PFA (4%) durante 48 horas para después ser almacenado en PBS (0.1 M) hasta su procesamiento para el análisis histológico de PSD-95 y ChAT.

En ambos métodos de eutanasia, se registró el peso de las glándulas adrenales y del cerebro en fresco, para comparar el peso relativo y peso total respectivamente entre los grupos experimentales.

3.2.4a Técnicas inmunohistoquímicas

Se utilizaron cortes sagitales seriados de ambos hemisferios cerebrales para llevar a cabo las técnicas inmunohistoquímicas correspondientes. Los anticuerpos primarios fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal contra Colina Acetiltransferasa (hecho en Santa Cruz Biotechnology No. catálogo sc-55557, concentración 1:100), anticuerpo monoclonal contra PSD 95 (Thermo Fisher No. de catálogo 7E3-1B8, concentración 1:500) y el trazador lipofílico DIL (invitrogen No. de catálogo D282). Se eligió de manera específica el anticuerpo secundario con base en la características de cada anticuerpo primario. El resto de los reactivos utilizados en el proyecto fueron de la mejor calidad comercial posible.

Para el análisis histológico de PSD-95 y ChAT, cuatro días previo al corte, los cerebros fueron crioprotectados en una solución de sacarosa al 30%. Se realizaron cortes sagitales de 40 micras mediante un microtomo de deslizamiento (VT1000S, Laboratorios centrales, CINVESTAV). Después del corte, las secciones fueron conservadas -20°C en solución crioprotectora para inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia de PSD-95 se describe a continuación:

1. Las rebanadas de cerebro fueron lavadas 3 veces (15 minutos cada lavado), con PBS 0.1 M.
2. Se incubaron en una solución de bloqueo que contenía suero de caballo al 10%, albumina suero bovino al 5 % en PBS 0.1 M, durante una hora.
3. El anticuerpo primario contra PSD-95 fue incubado a una concentración 1:500, en una solución de tritón al 0.3%, suero de caballo 10%, albumina suero bovino al 5 %, en PBS 0.1 M, durante 48 horas a 4 °C.
4. Se realizaron 3 lavados del anticuerpo primario con PBS 0.1M, con una duración de 15 minutos por lavado.
5. Se incubó el anticuerpo secundario (Alexa 488 Jackson immunoresearch, 1:500) durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad.
6. Se realizaron 4 lavados del anticuerpo con PBS 0.1M, con una duración de 15 minutos por lavado y se las rebanadas se montaron con vectashield.

Las fotografías fueron capturadas en un microscopio confocal Leica TCS-SP8 (Laboratorios centrales, CINVESTAV), con un objetivo de 100 X/Oil y un tamaño de imagen de 1264 por 1264 pixeles y se conservaron los mismo parámetros para todas las imágenes (Speed 600 Hz, Line average 32). Se capturaron 3 imágenes de cada región de interés: corteza prefrontal medial y de la capa piramidal de la región CA3 del hipocampo. Se analizaron tres rebanadas por cada animal y se contaron con al menos 4 animales por grupo. Las imágenes fueron analizadas a mediante el software ImageJ (NIH, Freeware software), el procedimiento se describe a continuación: 1) La imagen en JPG se convirtió a un tamaño de 16 bits; 2) después se ajustó el umbral la imagen a nuestra marca de interés y se convirtió en imagen una binaria; 3) posteriormente se llevó a cabo la cuantificación mediante la herramienta de "Analyze particles". El tamaño de pixel definido para el conteo fue mínimo: 10 pxs y máximo: 60 pxs, como parámetro de circularidad se estableció mínimo:0.7 máximo:1 (Labno, 2008).

El procedimiento utilizado para la inmunohistoquímica de ChAT, se describe a continuación:

1. Los cortes de cerebro fueron lavadas 3 veces (15 minutos cada lavado), con PBS 0.1 M.
2. Se incubó con buffer de citratos (95-100 °C) por 10 minutos.
3. La solución anterior se retiró, se colocó NaBH₄ al 0.1% por 8 minutos y posteriormente se lavaron con PBS hasta no observar burbuja.
4. El tejido se permeabilizó con PBS-TX (0.2%) por 20 minutos.
5. Se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena con H₂O₂ al 0.3% durante 10 minutos.

6. La solución de bloqueo que contenía albumina al 2.5%, suero de caballo al 2.5% en PBS-Tritón (0.2%) se incubó durante 2 horas.
7. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tritón (0.2%), por 10 minutos cada uno.
8. El anticuerpo primario fue incubado a una concentración 1:100 en PBS por 36 horas
9. Se realizaron 3 lavados con PBS por 10 minutos cada uno.
10. El anticuerpo secundario biotinilado (1:500) se incubó en PBS, durante 2 horas.
11. Se realizaron 3 lavados con PBS por 10 minutos cada uno.
12. El kit vector ABC (VectorLab), se incubó durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente.
13. Se realizaron 3 lavados con PBS por 10 minutos cada uno y se reveló con DAB.
14. Tras la reacción, se lavó 3 veces con PBS por 10 minutos cada uno y las rebanadas se montaron con entellan.

Las fotografías fueron capturadas en un microscopio de campo claro, con un objetivo de 10 X Se capturaron 3 imágenes de la región de interés (NBM). Se analizaron tres rebanadas por cada animal y se contaron con al menos 4 animales por grupo. Las imágenes fueron analizadas a mediante el software ImageJ (NIH, Freeware software), el procedimiento se describe a continuación: 1) La imagen en JPG se convirtió a un tamaño de 16 bits; 2) después se ajustó el umbral la imagen a nuestra marca de interés y se convirtió en imagen una binaria; 3) se aplicó la función de watershed 4) posteriormente se llevó a cabo la cuantificación mediante la herramienta de "Analyze particles" ". El tamaño de pixel definido para el conteo fue mínimo: 100 pxs y máximo: infinito.

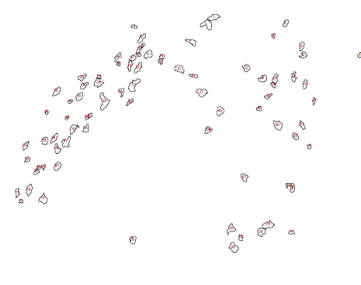
Imagen original



Ajuste de umbral



Analyze particles



3.2.4b Marcaje diolístico fluorescente

Para esta técnica se realizaron cortes sagitales de 80 micras con vibratomo (LEICA VT1000 S). Las rebanadas fueron disparadas con balas de tungsteno cubiertas con (1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate ('Dil'; DiIC18(3) (DIL) (Invitrogen, Cat. Num. D282 Dil) mediante el procedimiento que se describe a continuación:

1. Preparación del tubo: Se cortó aproximadamente 70 cm de tubo tefzel (Bio-Rad) y posteriormente se secó con flujo de gas nitrógeno grado 4.8 (99.995 % puro) con un tanque presurizado por 2 minutos. Se llenó el tubo tefzel con una solución de polivinilpirrolidona 10 mg/ml (PVP, Sigma, # P- 52888), tras dos minutos se retiró la solución y se secó el tubo con flujo de gas nitrógeno durante 10 minutos.

2. Preparación de DiL: Se pesó 5 mg de DiL (Invitrogen, Cat. Num. D282) en un eppendorf de 1.5 ml y fue disuelto en 334 µl de cloruro de metileno (Sigma, Cat # 17-3). Posteriormente se pesaron 167 mg de tungsteno (1.5 µm diametro) (BioRad Cat. Num. 165-2268) y se colocó sobre una base de vidrio limpia, donde se mezcló con la solución de Dil-cloruro de metileno. La mezcla se dejó evaporar y las partículas se recolectaron en papel parafilm. Finalmente las partículas se diluyeron en 10 mL de agua MiliQ y sonicaron durante 40 minutos.

3. Preparación de las balas: Con una jeringa, se llenó el tubo tefzel, con la solución Dil-tungsteno-agua MiliQ. Se insertó el tubo en la estación de preparación (Bio-Rad) y se dejó por 15 min con rotación constante para permitir la adhesión de las partículas de Dil al tubo. Transcurrido el tiempo se removió el líquido remanente con una jeringa lentamente y se secó el tubo tefzel con flujo de nitrógeno durante 20 min. Finalmente, se cortó el tubo tefzel cargado con balas de tungsteno-DiL en fracciones de 13 mm. Protegido de la luz se almacenó a 4 °C con desecante hasta disparo.

4. Liberación de partículas: Se llenó el cartucho con las balas y se montó en la pistola Helios-Gene Gun (Bio-Rad). Se colocó un filtro de 3 µm tamaño de poro para evitar que agregados mayores a esa medida pasaran y dañaran el tejido. Se conectó la pistola con el gas Helio (99.99% pureza) y bajo una presión de 120 psi se disparó dos veces sobre la región de interés a una distancia de 2.5-3 cm de la muestra. Éstas se dejaron reposar en PBS 0.1 M durante una noche protegida de la luz y al día siguiente se montaron en un portaobjetoscon glicerol.

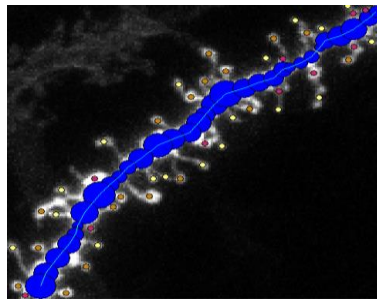
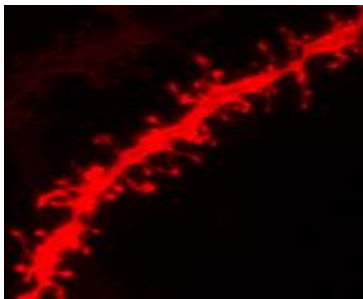
Las rebanadas fueron analizadas bajo microscopia de laser confocal (TC-SP8, Laboratorios Centrales, Cinvestav). Se tomaron imágenes con un objetivo de 100 X/Oil de 1264 por 1264 pixeles bajo los mismos parámetros (Speed 600 Hz, Line average 4). Para el conteo de espinas, se

seleccionó la segunda ramificación de la dendrita apical, con una longitud de entre 15 y 20 μm . Se analizaron al menos tres dendritas de la mPFC en al menos tres secciones por animal a través de NeuronStudio (NIH, Free Software). Solo las dendritas con una alta resolución señal/fondo y sin fragmentación fueron analizadas. La clasificación de espinas tipo hongo (mushroom), delgadas (thin) y regordetas (stubby), se realizó bajo los 3 criterios indicados por NeuronStudio (NIH, Free Software), los cuales establecen (NeuronStudio, 2007-2009):

a) Radio cuello (Neck ratio) : 1 → Espinas con un valor mayor son clasificadas como delgadas o hongo.

b) Radio delgado (Thin ratio) : 2.5 → Espinas con un "Radio cuello" menor a 1 y un "Radio delgado" mayor a 2.5, son consideradas espinas tipo delgadas, de lo contrario son clasificadas como regordetas ("Radio cuello" menor 1 y "Radio delgado" menor a 2.5).

c) Tamaño hongo (Mushroom size): 0.35 μm → Espinas con "Radio cuello" igual o mayor a 1 y con un diámetro de cabeza igual o mayor a 0.35 μm , son clasificadas como espinas tipo hongo de lo contrario son consideradas regordetas.



Vertices	Edges	Trees	Spines	Misc.
			Stubby: 10	
			Thin: 18	
			Mushroom: 18	
			Other: 0	
			Total: 46	

3.2.5 Diagrama representativo del diseño experimental.

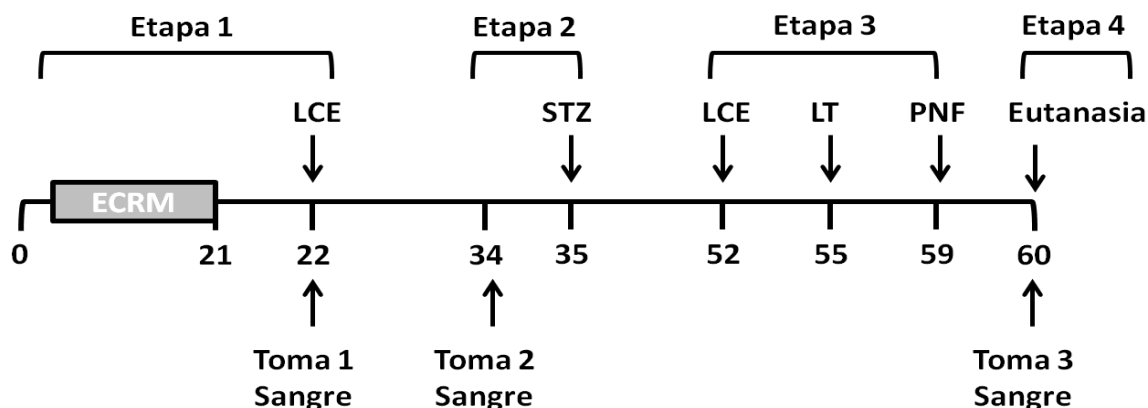


Figura 3.2.5: Esquema representativo del diseño experimental. ECRM= estrés crónico por restricción de movimiento; LCE= laberinto en cruz elevado; LT= laberinto en T; PNF= prueba de nado forzado; STZ= Estreptozotocina.

3.3 Análisis de datos.

Para el análisis estadístico se realizó la comparación de grupos múltiples mediante el análisis de varianzas (ANOVA de dos vías, factor 1: estrés, factor 2: STZ) seguido de la prueba estadística de Tuckey (GradPadPrism, versión 6.01). Los resultados se expresaron como media \pm error estándar. Una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

IV. RESULTADOS

4.1 Efecto del estrés crónico por restricción de movimiento durante la adolescencia.

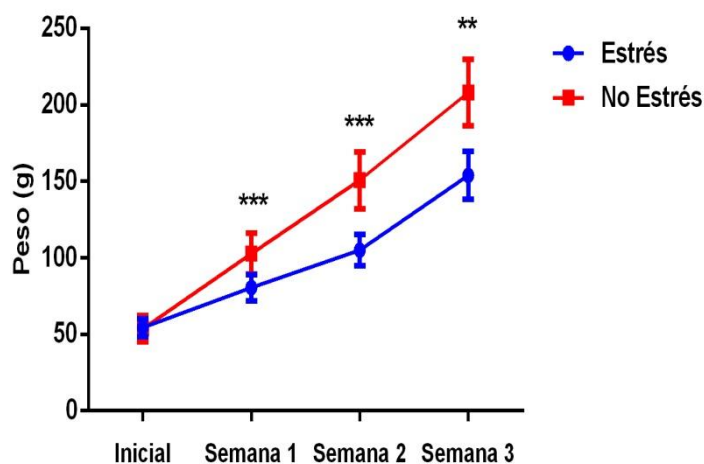


Figura 4.1. Durante el protocolo de ECRM, la ganancia de peso es menor en el grupo estrés (n=24) en comparación con el no-estrés (n=24). Esta diferencia es evidente a partir de la primera semana de ECRM y continua durante todo el protocolo de ECRM (semana 3). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.1.2 Efecto del estrés crónico por restricción de movimiento en la prueba conductual de ansiedad en animales adolescentes.

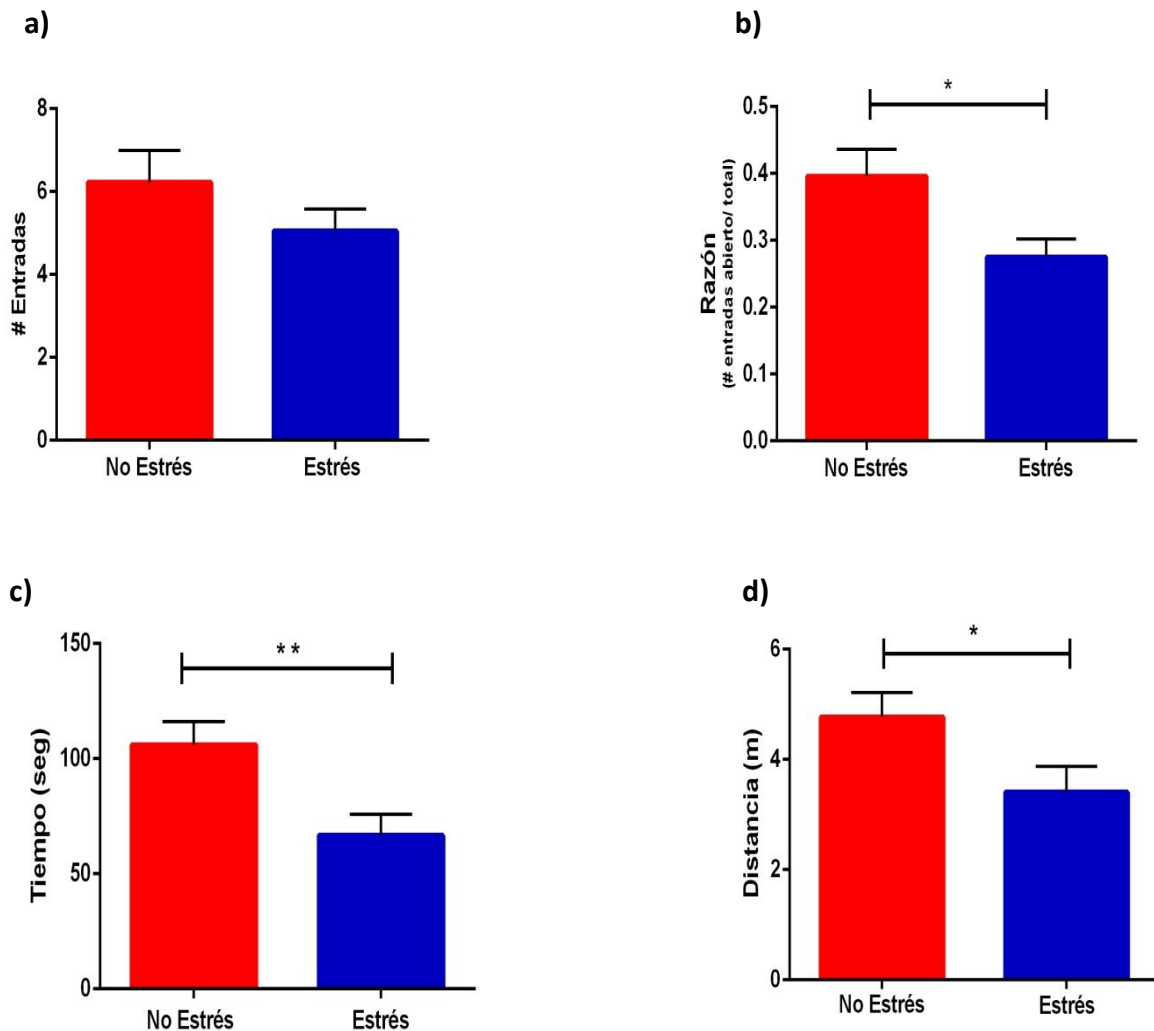


Figura 4.1.2 Los animales del grupo estrés y no-estrés se sometieron al laberinto de cruz elevado 24 horas después de la última inmovilización. Se reporta los datos respectivos al brazo abierto. **a)** El número de entradas al brazo abierto entre los animales estrés ($n=24$) y no-estrés ($n=24$) no mostró diferencias significativa ($p=0.21$). **b)** La razón de entradas al brazo abierto (número de entradas al brazo abierto respecto al total de entradas) fue menor en los animales del estrés que no-estrés ($p<0.05$). **c)** El tiempo que pasaron los animales con estrés en el brazo abierto fue menor en comparación con los animales no-estrés ($p<0.05$). **d)** La distancia total recorrida en el brazo abierto fue igualmente menor en el grupo de estrés que en el de no-estrés ($p<0.05$).

4.1.3 Efecto del estrés crónico por restricción de movimiento sobre los marcadores metabólicos: glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos en sangre.

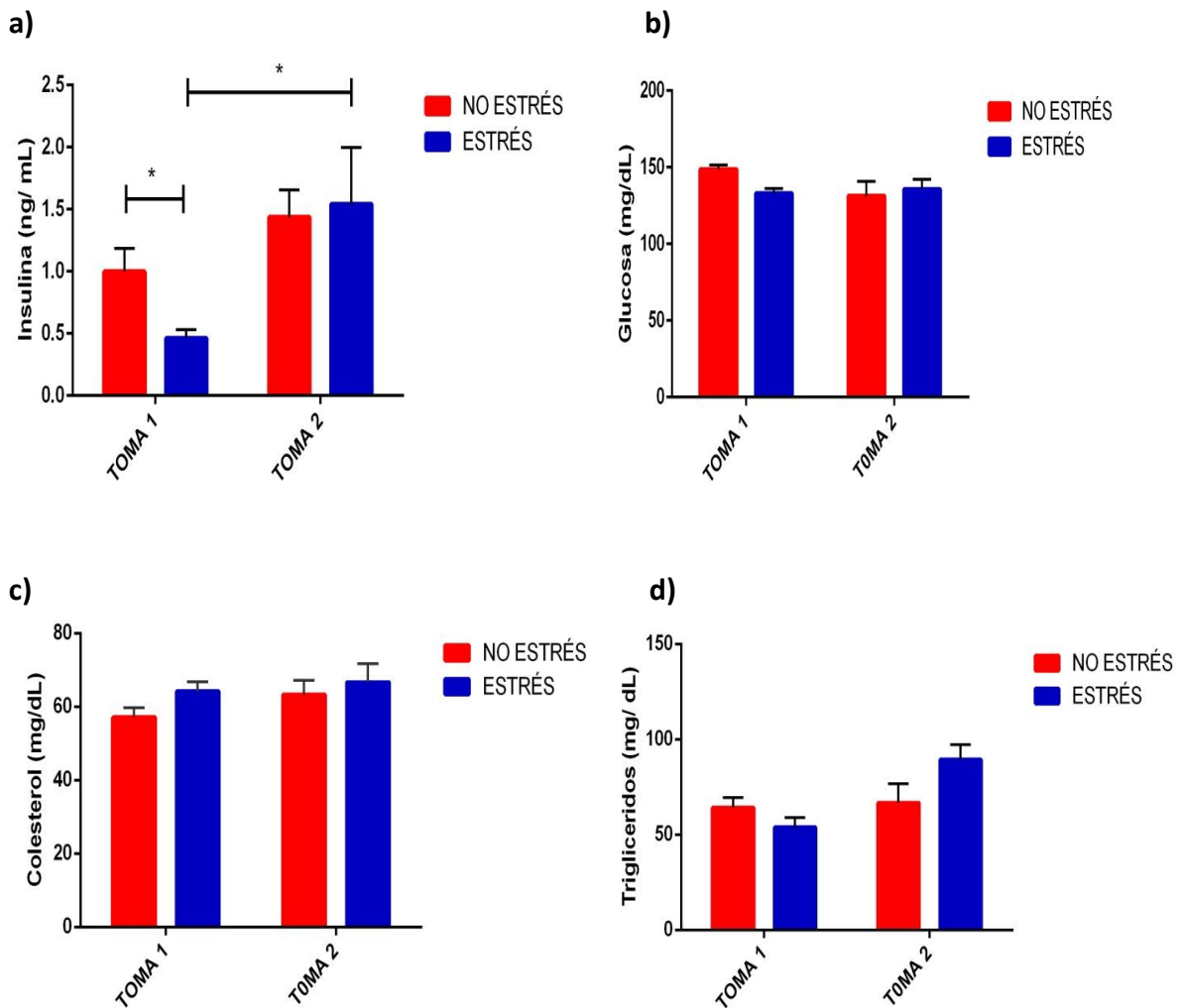


Figura 4.1.3. Niveles de insulina, glucosa, colesterol y triglicéridos a las 24 horas y a los 15 días después de la última inmovilización. **a)** Los niveles de insulina en los animales del grupo estrés, 1 día después de la última inmovilización son menores en comparación con los del grupo no-estrés ($p < 0.05$) (Toma 1). Sin embargo, los niveles de insulina de grupo estrés se elevan al día 15 ($p < 0.05$) (Toma 2), mientras que los del grupo no-estrés se mantienen constantes. **b), c) y d)** No se observa diferencia significativa en glucosa, colesterol y triglicéridos entre el grupo de estrés y no-estrés en las tomas 1 y 2.

4.2 Efecto de la inducción a diabetes en ratas jóvenes adultas después del protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento durante la adolescencia.

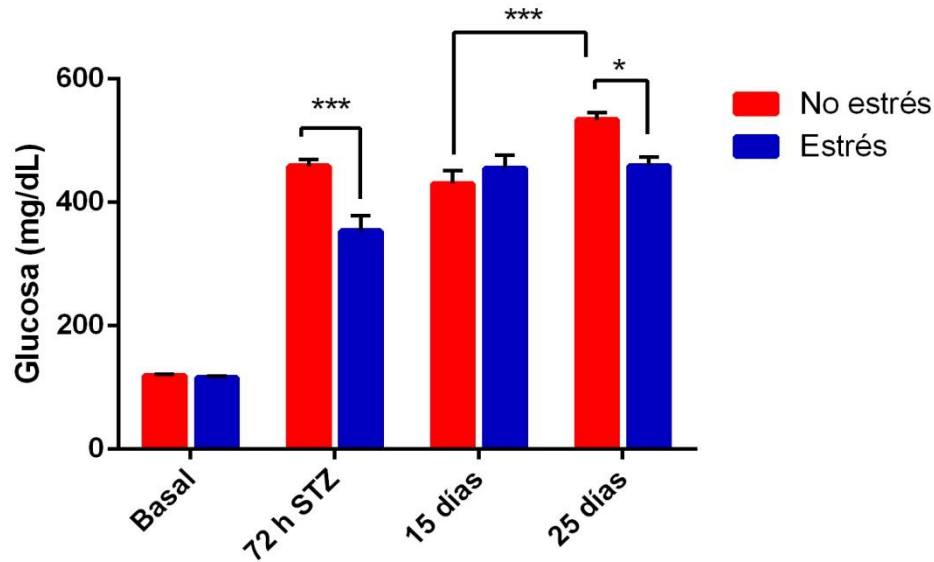


Figura 4.2. El efecto de STZ sobre los niveles de glucosa fueron evaluadas antes y 72 horas, 15 y 25 días después de la administración mediante el uso del glucómetro digital (Accu-CHEK Active® Roche Diagnostics.). Los valores de glucosa en sangre muestra que en estado basal (antes de administración de STZ) no existe diferencia significativa entre ambos grupos experimentales; Sin embargo, 72 horas después de la administración, los niveles de glucosa aumentan en ambos grupos en comparación con la toma basal, pero este aumento es menor en el grupo estrés ($p < 0.0001$) y permanece con niveles inferiores al grupo no-estrés a los 25 días después de la inducción a diabetes ($p < 0.05$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4.2.1 Efecto de la inducción a diabetes sobre marcadores metabólicos: glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos en sangre.

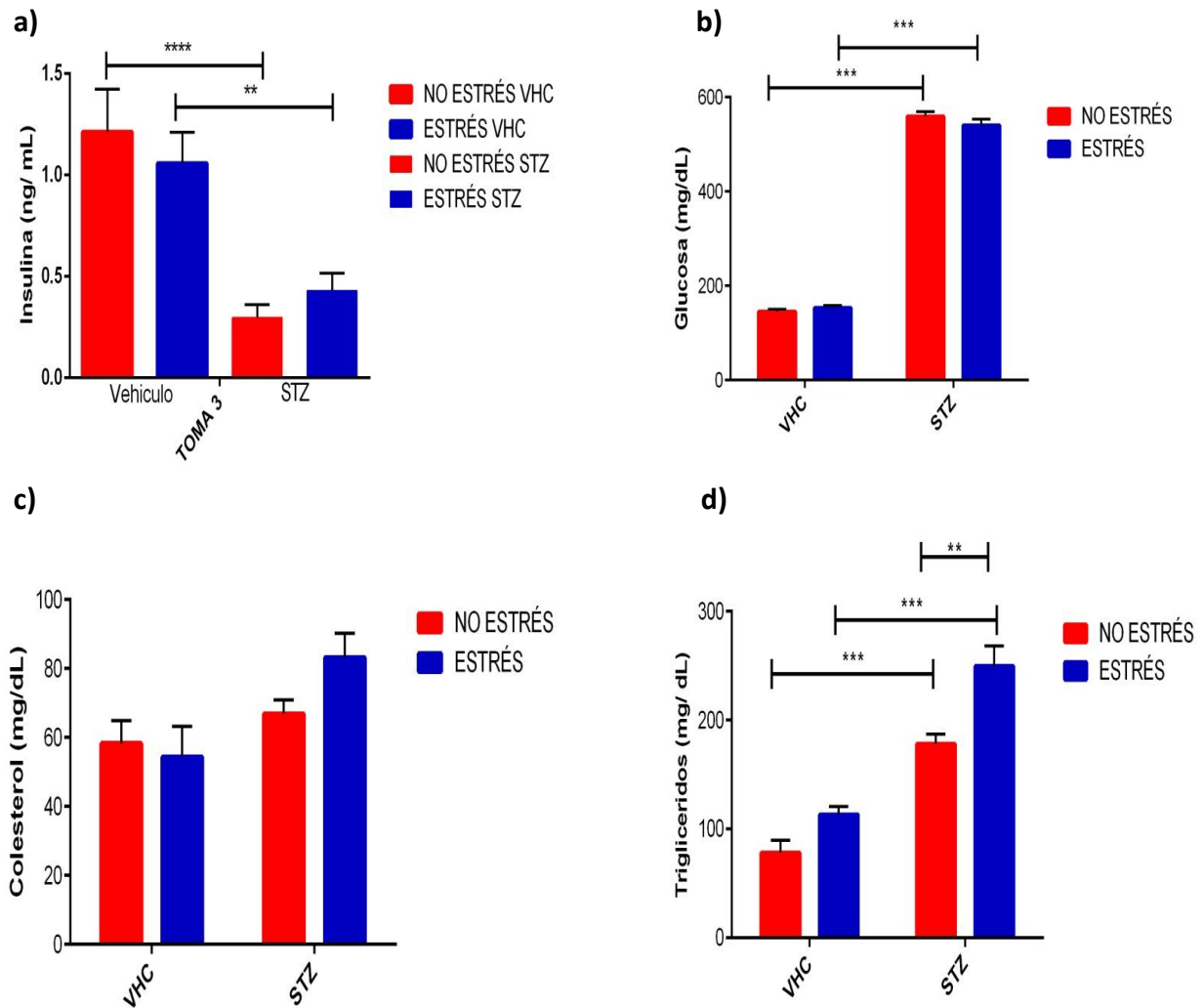


Figura 4.2.1. Niveles de insulina, glucosa, colesterol y triglicéridos en el último día de experimentación. Los niveles se evaluaron 25 días después de la inducción a diabetes (toma 3). **a)** Los niveles de insulina son similares entre el grupo estrés con VHC (n= 6) y no-estrés con VHC (n= 6), pero disminuyen tras la inducción a diabetes en comparación con los grupos VHC. **b)** Los niveles de glucosa aumentan a los grupos que se les administro STZ en comparación con el VHC. **c)** No se observan diferencia significativa en los niveles de colesterol entre los grupos. **d)** Los valores de triglicérido aumentan en los grupos con STZ en comparación con los VHC; este aumento es más pronunciado en el grupo de estrés. *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001

4.2.2 Ganancia de peso después de la inducción a diabetes experimental.

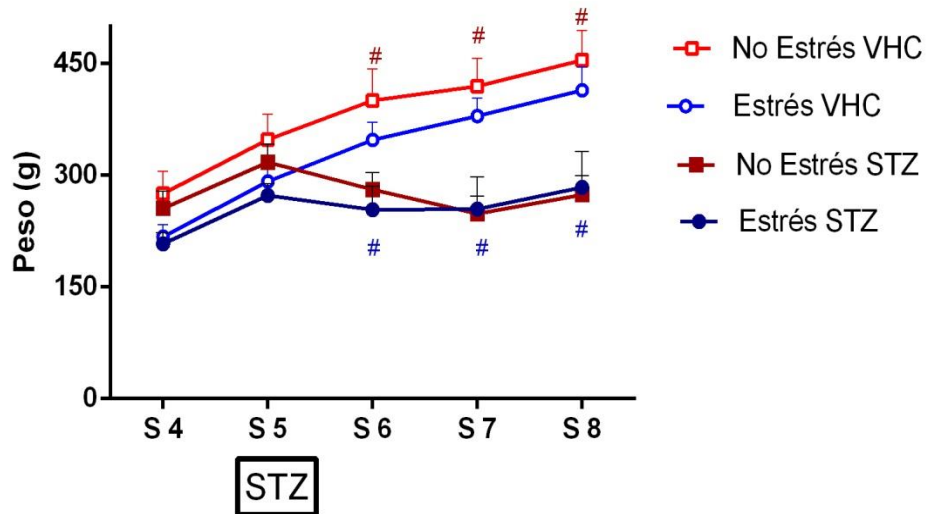


Figura 4.2.2. El peso corporal antes de la inducción a diabetes no muestra diferencias significativas entre los grupos, pero los animales que estuvieron sometidos a estrés son ligeramente más delgados; Una semana después de la administración de STZ (semana 6, S6), los animales del grupo con STZ no logran ganar peso, mientras que los animales con vehículos continúan aumentando de peso hasta la semana 8 (S8). # No estrés VHC vs No estrés STZ * $p < 0.05$; # Estrés VHC vs Estrés STZ * $p < 0.05$; $n = 12$.

4.2.3 Efecto de la administración de estreptozotocina en la conducta de ansiedad.

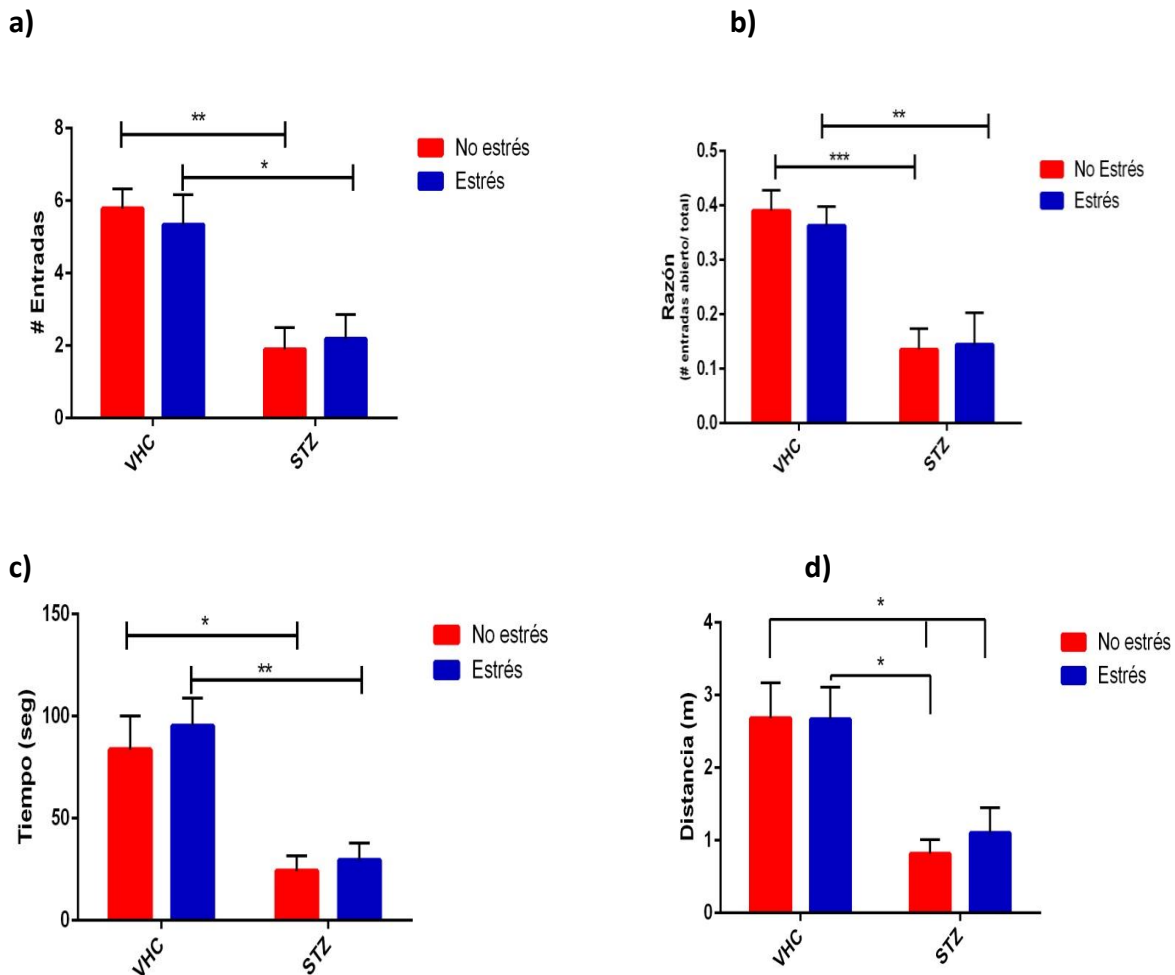
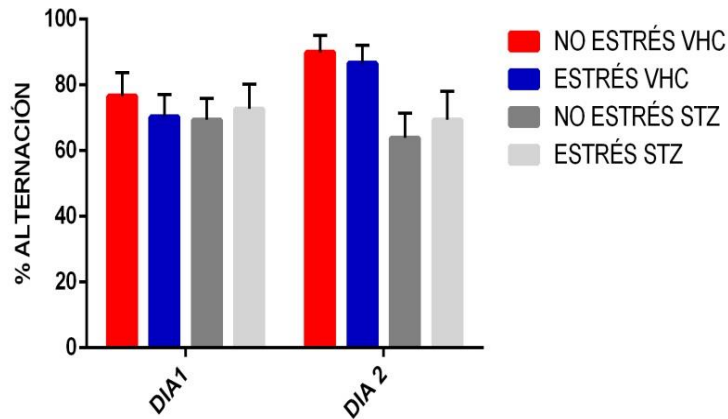


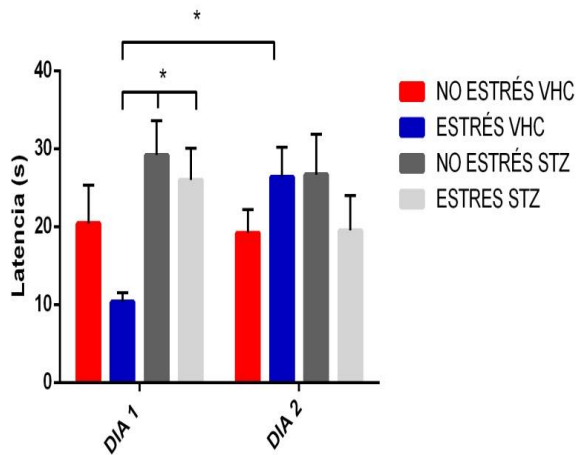
Figura 4.2.3. Evaluación de conducta de ansiedad mediante el laberinto en cruz elevado 16 días después de la inducción a diabetes. Se reportan los datos del brazo abierto. **a) y b)** El número y la razón entre el brazo cerrado y el brazo abierto fue menor en los grupos no-estrés y estrés tratados con STZ en comparación con los grupos tratados con vehículo **c)** El tiempo de permanencia en el brazo abierto fue menor en los grupos tratados con STZ en comparación con los grupos con vehículo. **d)** La distancia recorrida en el brazo abierto es menor en los animales tratados con STZ en comparación con los grupos tratados con vehículo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 12$.

4.2.4 Efecto de la administración de estreptozotocina en la memoria de trabajo.

a)



b)



c)

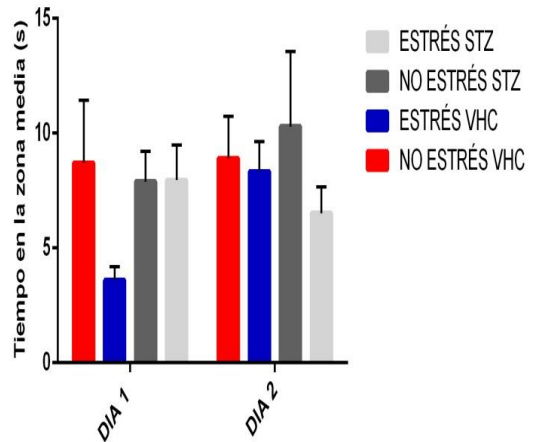


Figura 4.2.4. La prueba de laberinto en T se realizó 19 días después de la administración de estreptozotocina en animales del grupo estrés y no-estrés. **a)** No se observa diferencia significativa en el porcentaje de alternación en el día 1 o el día 2 entre los grupos. **b)** La latencia a entrar a un brazo elegido fue menor en el grupo estrés con vehículo en comparación con no-estrés con vehículo, pero no es significativo. En animales tratados con STZ se observa una latencia mayor en comparación con los animales tratados con vehículo en el primer día de la prueba (día1) ($p < 0.05$). Sin embargo, esta diferencia desaparece en el segundo día. **c)** El tiempo que pasan los animales en la zona media no fue significativa entre los grupos.

4.2.5 Efecto de la administración de estreptozotocina en la conducta de depresión.

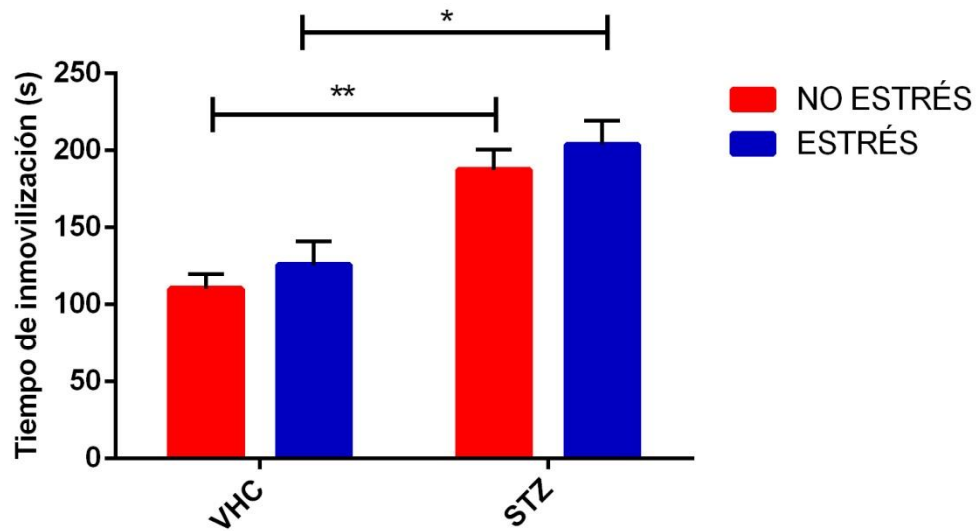


Figura 4.2.5 La prueba de nado forzado se realizó 22 días después de la inducción a diabetes en ratas adultas. El tiempo de inmovilización de los animales tratados con STZ es mayor que los grupos tratados con vehículo (No-estrés, $p < 0.01$; estrés, $p < 0.05$).

4.3 Análisis histológicos post-mortem

4.3.1 Efecto del estrés crónico y diabetes en el tamaño de las glándulas adrenales y peso cerebral.

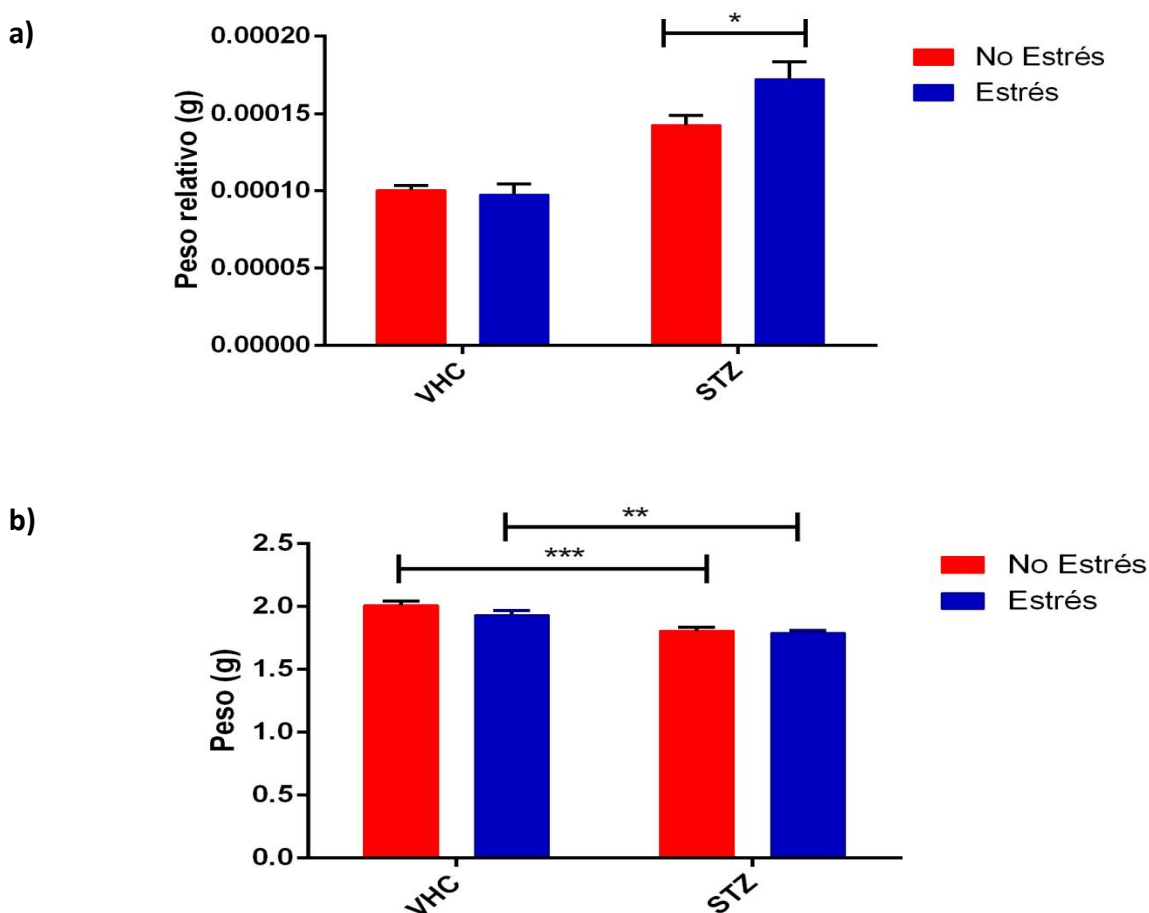


Figura 4.3.1 Efecto de estrés crónico durante la adolescencia y tratamiento con STZ en ratas adultas, sobre el peso relativo de las glándulas suprarrenales y peso del cerebro. **a)** El peso relativo de las glándulas adrenales no muestra diferencias significativas entre los grupos no diabéticos (VHC). Sin embargo, en los animales diabéticos (STZ), el grupo expuesto previamente al protocolo de ECRM, presentó un peso relativo de las glándulas adrenales mayor en comparación con el grupos de no estrés ($p < 0.05$). **b)** El peso del cerebro en fresco fue evaluado en los animales diabéticos (STZ) y comparado con animales que recibieron vehículo. Se observa una disminución en el peso cerebral en comparación con el grupo vehículo tanto en animales estrés como no-estrés (no-estrés VHC, $p < 0.01$ vs no-estrés STZ; estrés VHC, $p < 0.001$ vs estrés STZ).

4.3.2 Efecto del estrés crónico y diabetes sobre la PSD- 95 en corteza prefrontal media y la region CA3 del hipocampo.

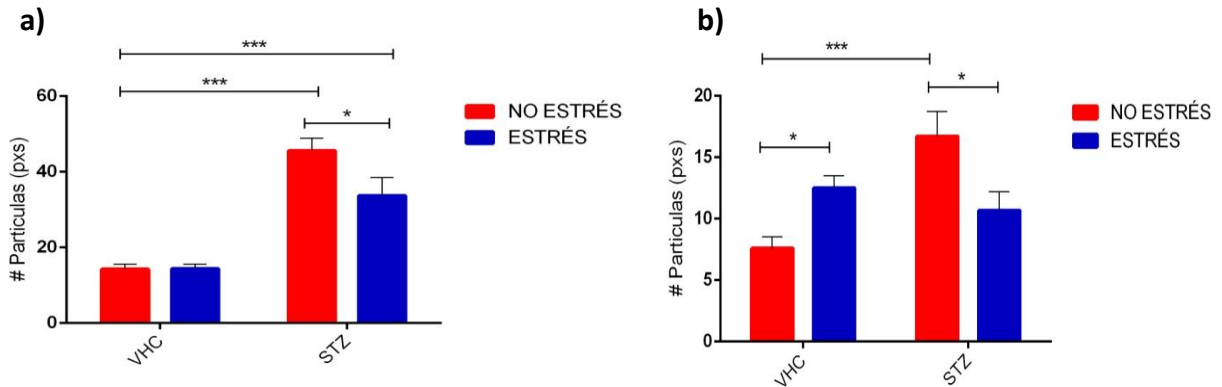


Figura 4.3.2 Efecto de estrés crónico y diabetes en la inmunoreactividad para PSD95 y . **a)** En corteza prefrontal medial se observa incremento de PSD 95 en los animales diabéticos (no-estrés STZ $p < 0.001$ vs no-estrés VHC; estrés STZ $p < 0.001$ vs estrés VHC), siendo esta aumento menor en el grupo de estrés STZ en comparación con el grupo no-estrés STZ. ($p < 0.05$). **b)** En la region CA3 del hipocampo el grupo no-estrés-STZ, PSD 95 aumenta en comparación con el no-estrés VHC ($p < 0.001$). En cuanto el grupo de estrés, los valores de PSD95 incrementaron en estrés VHC en comparación con no-estrés VHC ($p < 0.05$). Tras el desarrollo de diabetes no se observan diferencias significativas entre estrés VHC y estrés STZ; sin embargo, estrés STZ es menor en comparación con no-estrés-STZ ($p < 0.05$). (n=4).

4.3.3 Efecto del estrés crónico y diabetes sobre Colina acetiltransferasa en núcleo basal magnocelular.

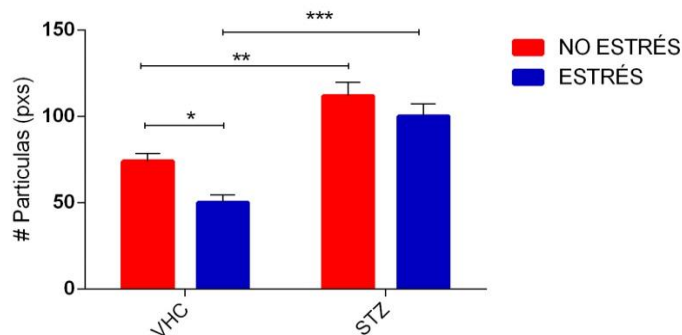


Figura 4.3.2 Efecto de estrés crónico y tratamiento con STZ, sobre Colina acetiltransferasa en Nucleo Basal Magnocelular. En el grupo de estrés VHC los valores de ChAT disminuyeron en comparación con no-estrés STZ ($***p < 0.05$). Con la inducción a diabetes, los valores de ChAT aumentan en comparación con sus respectivos controles VHC (no-estrés-STZ $**p < 0.01$ vs no-estrés VHC; estrés STZ $***p < 0.001$ vs no-estrés VHC).

4.3.4 Efecto del estrés crónico y diabetes sobre la espinas dendriticas en la corteza prefrontal medial.

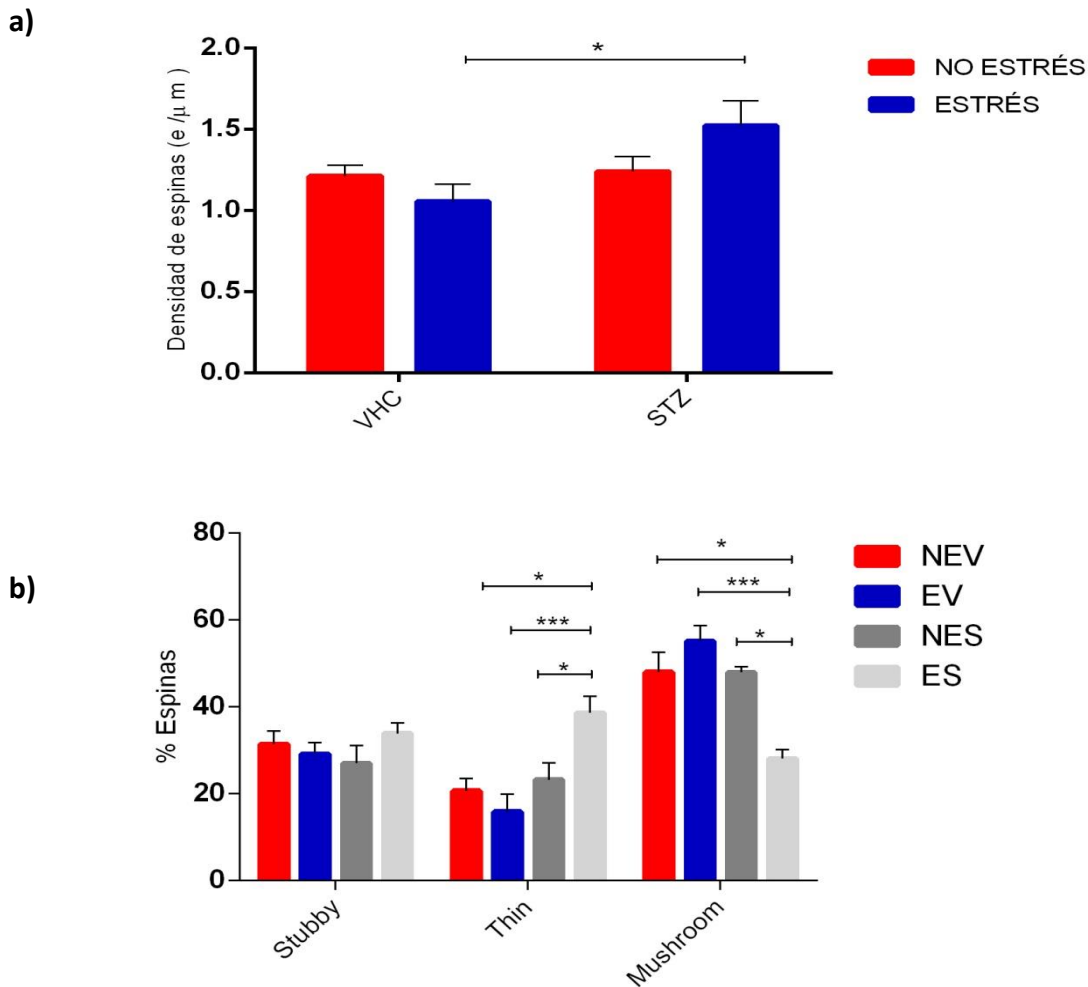


Figura 4.3.4. Efecto de estrés crónico y tratamiento con STZ, sobre la espinas dendriticas en la corteza prefrontal medial. **a)** Se muestra un ligero aumento en la densidad total de espinas en el grupo diabético con estrés (ES) respecto a su vehículo (EV), pero sin diferencia entre los demás grupos. **b)** se muestra el efecto del estrés y diabetes sobre la morfología de las espinas dendriticas. Observamos una disminución en las espinas tipo hongo (Mushroom) y un aumento en las tipo delgadas (Thin) del grupo estrés STZ (ES) en comparación con el resto de los grupos. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$. Con respecto a las espinas tipo Stubby, no observamos diferencias entre los grupos.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo principal de éste estudio fue determinar el efecto del estrés crónico durante la adolescencia y sus consecuencias a largo plazo, es decir en la edad adulta; específicamente nos interesaba responder, si los efectos generados por el estrés en la adolescencia, podrían potencializar el daño que ocasiona el desarrollo de diabetes en las capacidades cognoscitivas, la plasticidad neuronal, el sistema colinérgico y el metabolismo energético.

Considerando que la adolescencia es una etapa vulnerable para el desarrollo de trastornos de conducta, el primer paso en nuestra investigación fue evaluar si el estrés crónico podría incrementar los índices de ansiedad en los animales expuestos a ECRM.

1. Efecto del estrés en la adolescencia

En la prueba del LCE, observamos un aumento en la conducta relacionada con ansiedad en los animales del grupo de estrés en comparación con el grupo no- estrés. Estos resultados, coinciden con (Venheim et al., 2009) y (Negrón et al.,2014), quienes reportaron una disminución en la razón de entrada y tiempo de estancia del brazo abierto en ratas adolescentes sometidas a estrés crónico. La amígdala basolateral (BLA), el núcleo de la estría terminal (BNST), el hipocampo ventral (vHPC) y la corteza prefrontal (PFC) son regiones cerebrales encargadas de regular esta conducta (Calhoon et al.,2015). En roedores adultos, el estrés crónico altera este circuito, generando hipertrofia de BLA/BNST y el subsecuente comportamiento ansioso (Bourke et al., 2011). Por lo anterior, es posible que el estrés haya alterado este circuito en nuestros animales sometidos a ECRM, por lo que sería interesante evaluar los cambios en estas regiones (BLA/BNST) en ratas jóvenes en estudios posteriores.

Por otra parte, al explorar los cambios en marcadores del metabolismo energético tras el estrés crónico en ratas adolescentes, se estimaron los niveles de insulina, glucosa, colesterol y triglicéridos (TG). En cuanto a los valores de insulina, 24 horas después de finalizada la última inmovilización, observamos una disminución significativa en el grupo de estrés en comparación con el de no-estrés (toma 1). Sin embargo, esta disminución no fue permanente, ya que los niveles de insulina se recuperaron 15 días después de finalizado el estrés (toma 2).Estos resultados, se comparan con los obtenidos por Zardooz y colaboradores, donde encuentra niveles bajos después de 15 días de ECRM y recuperación al día 30 (Zardooz et al., 2006).

Un mecanismo que podría explicar la disminución de insulina en animales sometidos a estrés, es que existe un incremento en la depuración de insulina en el hígado. Tras un episodio de estrés, los niveles GC incrementa y estos a su vez, estimulan la expresión de un grupo de proteínas nucleares denominadas PPAR α (receptor activado por proliferadores peroxisomales), los cuales promueven la actividad de la hormona degradadora de insulina (IDE), en consecuencia, aumenta la degradación de insulina y disminuye así sus niveles plasmáticos (Lemberger et al., 1996; Morita et al., 2000).

Por otro lado, se sabe que durante la respuesta al estrés, las catecolaminas ejercen un efecto inhibitorio en las células β del páncreas y reducción en los niveles de insulina tras la activación del eje simpático-adreno-medular (Halter et al., 1984). Es importante mencionar que una de las funciones de los GC es mantener los requerimientos energéticos disponibles en caso de una situación de pelea o huida; por lo tanto, se podría entender esta disminución en los niveles de insulina como necesaria para mantener los niveles de glucosa en sangre por más tiempo. Por lo que la disminución de insulina parecería estar jugando un papel importante en la respuesta fisiológica al estrés.

En base a los supuestos anteriores, la disminución en los valores insulina, traería consigo un aumento en los niveles de glucosa. Sin embargo, en nuestro estudio, los animales de estrés (con niveles bajo de insulina), presentaron valores normales de glucosa, similares al grupo de no-estrés. Estos resultados difieren de Zardooz y colaboradores, quienes observan un incremento de glucosa con disminución de insulina en los animales sometidos a estrés (Zardooz et al., 2006).

Un elemento importante que podría estar participando en mantener los niveles normales de glucosa tras la disminución de insulina, es la osteocalcina, una hormona producida por los osteoblastos capaz de regular el metabolismo energético y proteger al organismo sobre los cambios metabólicos inducidos por los GC (Cooper et al., 2015) lo que aumenta la sensibilidad de la insulina (García et al., 2013). Curiosamente esta hormona aumenta durante la adolescencia debido a la remodelación ósea en este periodo (Kanbur et al., 2002), lo cual correlaciona bien con la posible partición y disposición de la osteocalciana para la regulación del metabolismo energético durante esta etapa. Lo que podría sugerir que si la osteocalcina se encuentra elevada durante la adolescencia, los niveles bajos de insulina debidos al estrés, no producirían una disminución de glucosa en sangre ya que el sistema estaría sensibilizado.

De manera semejante, en la distrofia muscular de Duchenne, se presentan niveles de insulina bajos, con valores de glucosa normales. Los investigadores proponen una posible disminución de

los receptores a insulina, pero permanece la cantidad suficiente para mantener los niveles de glucosa normales, ya que no se generan procesos de resistencia a insulina (DePirro et al., 1982).

A pesar de que se ha relacionado a los GC con el metabolismo de ácidos grasos (Wang et al., 2012); no se obtuvieron diferencias en los niveles de colesterol y TG en esta primera etapa. Es posible que al día 21 de ECRM, se haya alcanzado una adaptación metabólica al estrés (Zardoos et al., 2006).

Finalmente, un parámetro morfométrico para determinar si el estrés causó alteraciones fisiológicas, es la disminución en el peso corporal (Buynitsk et al., 2009; McLaughlin et al., 2007). En presente protocolo, efectivamente se observó una disminución en la ganancia de peso en el grupo de estrés en comparación con el grupo no-estrés. Diversos protocolos de estrés han reportado esta disminución en la ganancia de peso. Como parte de la activación del eje HPA, la actividad de la hormona liberadora de corticotropina aumenta; dicha hormona ejerce efectos anorexígenicos en el organismo, disminuyendo el apetito y la ganancia de peso (Makino et al., 1999).

Cabe mencionar que, durante el crecimiento en la adolescencia, la demanda metabólica aumenta. En este contexto, Eliand y colaboradores realizan una comparación del efecto del estrés en la reducción del peso corporal (roedores jóvenes vs adultos) y observan que 3 semanas de ECRM en adultos, resulta en un 10% de reducción del peso corporal, mientras que en adolescentes esta reducción es del 30% respecto al control (Eliand et al., 2012; Eliand et al., 2013). Por lo tanto, la pérdida de peso tras un episodio de estrés puede alterar las demandas metabólicas durante esta etapa y traer consigo efectos negativos en etapas posteriores.

En conclusión, tras 21 días de ECRM, observamos en el grupo de estrés incremento en la conducta de ansiedad, modificación metabólica en los niveles de insulina y disminución en la ganancia de peso.

2. Efecto de la diabetes experimental en ratas adultas después de la exposición a estrés durante la adolescencia

Finalizada la etapa de ECRM, el siguiente punto a evaluar en el estudio fueron los cambios metabólicos generados con la inducción a diabetes.

En los animales que recibieron la inyección con STZ, los niveles de insulina disminuyeron mientras que los de glucosa se elevaron, tal como se reportan en los modelos de diabetes experimental con STZ (Wu et al., 2008), lo cual indica que los animales con STZ desarrollaron diabetes. En cuanto a

los TG, observamos un incremento significativo en los animales diabéticos (tanto estrés como no-estrés) respecto a los no-diabéticos (tanto estrés como no-estrés). El efecto de STZ en animales con estrés en los niveles de TG fue aún mayor en comparación con los animales no-estrés.

Reporte previos indican que la diabetes activa el eje HPA , provocando la liberación de GC (Reagan et al.,2008).Estos son los responsables de incrementar los niveles de TG durante la diabetes. Se conoce que los GC inhiben al gen HES1 (Hairy and Enhancer of Split 1) necesario para el metabolismo de TG. Así mismo, se ha comprobado directamente que tras la inactivación de los receptores a GC, los niveles de TG disminuyen, en roedores con diabetes experimental inducida por STZ (Lemke et al., 2008).

Los conceptos anteriores, explican la elevación de TG en nuestros animales diabéticos. Sin embargo, es de resaltar el efecto ocasionado por el estrés durante la adolescencia. Hye-Yeong y colaboradores, demostraron que a nivel hepático, el ECRM altera el perfil de expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo y dextosificación de lípidos (Ha al., 2003). En este contexto, es probable que el ECRM modificó el patrón de expresión genética durante la adolescencia que le permitió amplificar su respuesta ante el desarrollo de diabetes y la exposición de GC consecuente, resultando entonces en un aumento exacerbado de TG en plasma.

Las observaciones anteriores correlacionan con los datos obtenidos en el tamaño relativo de las glándulas adrenales. Tras el desarrollo de diabetes experimental, el grupo estrés STZ, presentó un peso relativo superior con respecto al grupo de no- estrés STZ, lo cual sugiere que pudo existir un efecto sinérgico en la elevación de GC por el estrés y STZ resultando en una atrofia adrenal mayor.

Estos resultados son interesantes, ya que podemos observar dos consecuencias (atrofia adrenal y elevación de TG) relacionadas con la exposición previa a estrés que no logran revertirse tras retirar al estresor, al contrario, sufrieron modificaciones que potencializan los efectos ocasionadas por la diabetes experimental.

Por otro lado, a nivel conductual observamos un aumento en la ansiedad y depresión en los animales diabéticos, en comparación con los No-diabéticos. En humanos, la diabetes aumenta las probabilidades de desarrollar ansiedad, se sabe que 40 % de los pacientes con diabetes presentan síntomas relacionados con trastornos de ansiedad (Grigsby et al.,2002). En los modelos de diabetes experimentales con STZ, también se ha observado un incremento en ansiedad en LCE (Aksu et al., 2012). El circuito involucrado en esta conducta, es el mismo explicado anteriormente (BLA/BNST), donde los GC pueden modificar y alterar su función.

Además de la conducta de ansiedad, se evaluó la conducta depresiva en las ratas con estrés y con STZ. La conducta depresiva se ha relacionado con el acelerado incremento de AGEs en diabetes, ya que en animales diabéticos con STZ tratados con inhibidores de AGEs, muestran una mejora en el tiempo de inmovilización en la PNF y recuperación de la conducta depresiva (Wang et al., 2009).

No obstante, la exposición previa a ECRM durante la adolescencia no alteró estas conductas, en animales con diabetes. A pesar de que se ha vinculado fuertemente al estrés con el desarrollo de estos trastornos conductuales, esta asociación es más fuerte en mujeres que en hombres (Bale et al., 2015). En roedores, las hembras generan una respuesta mayor al estrés en comparación con los machos (Handa et al., 1994), en los cuales después de la pubertad, el incremento en testosterona promueve una respuesta de eje HPA más corta (Bale et al., 2015). Por lo anterior, es posible que en nuestro estudio, los roedores machos no generaron un efecto sostenido de ansiedad o depresión, por lo que no se lograron amplificar el efecto generado por la diabetes en estas conductas.

Creemos importante señalar que la PNF debería de acompañarse de la evaluación de las habilidades motoras, para descartar una posible variable motora que confunda el tiempo de inmovilización con alteraciones locomotoras.

En cuanto a las capacidades cognitivas, no observamos diferencias al evaluar a memoria de trabajo a través del laberinto en T. Contrario a nuestros datos, Wioeniewski y colaboradores, reportan una disminución en el porcentaje de alternación en ratas adultas tras 4 semanas de la inducción a diabetes con STZ (Wisniewski et al., 2003).

Dos variables importantes relacionadas con alteraciones en el aprendizaje y memoria en estos modelos son: la duración del estado diabético (hiperglucemia) y la edad de los animales (Kamal et al., 2000) (Rajashree et al., 2011). En el presente estudio, la duración de diabetes previa a la evaluación de la memoria de trabajo fue de 18 días aproximadamente en una edad muy joven. Es posible que la plasticidad y recuperación al daño que presentan los animales en esta etapa, mitigó el daño ocasionado por la STZ, sin consecuencias en la memoria de trabajo.

En relación con lo anterior, los resultados histológicos post-mortem indican un aumento en la plasticidad neuronal en el área CA3 del hipocampo y la corteza prefrontal medial.

El hipocampo es el primer blanco para los GC en el SNC; aquí los GC ejercen su efecto bimodal en la memoria y aprendizaje. El área CA3 del hipocampo es especialmente vulnerable a la acción de los GC. El estrés crónico y la diabetes, producen cambios consistentes y reversibles dentro del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de CA3, debido a cambios anatómicos y químicos en

neuronas postsinápticas, indicativos de plasticidad neuronal. Un marcador importante de plasticidad neuronal a nivel postsináptico, es la proteína PSD-95. Por lo anterior, en el presente estudio, fue importante evaluar los cambios de PSD-95 en el área CA3 del hipocampo.

Nuestros datos entorno a PSD-95 en CA3 del hipocampo indicaron un aumento en el grupo diabético que no se sometió a estrés (NE-STZ). Estos resultados coinciden con Grillo y colaboradores, quienes reportan incremento en PSD-95 en CA3 en ratas diabéticas con STZ. Este aumento se observa desde la primera semana con diabetes y este es más pronunciado en la quinta semana (Grillo et al., 2005).

Interesantemente, estos investigadores basados en el conocimiento que la diabetes eleva los niveles de GC y genera daños similares a los ocasionados por estrés crónico, demostraron que por sí solo el tratamiento de GC incrementa los niveles de PSD-95, aunque en menor medida que la STZ. Estos hallazgos, armonizan con el aumento de PSD-95 en los animales diabéticos que no fueron sometidos a estrés durante la adolescencia (NE-STZ).

Por otro lado, el grupo que se sometió a estrés y no desarrollo diabetes (E-VHC), presentó un incremento de PSD-95 en comparación con el control; estos datos se correlacionan con el aumento en el número de espinas dendríticas en el área CA3 tras un protocolo de 6 horas diarias durante 21 de ECRM reportado por Sunanda y colaboradores (Rao et al., 1995) y de igual manera se relacionan con lo observado en el trabajo de Grillo tras la administración de GC y aumento en menor medida de PSD 95 con respecto al grupo diabético.

Estas modificaciones son indicadores de cambios en la plasticidad del hipocampo, con formación de nuevas sinapsis. Sin embargo, se ha reportado disminución en el número de espinas dendríticas y acortamiento en la longitud de las mismas en la diabetes con STZ (Martínez -Tellez et al.,2005; Magariños et al., 1995). Es posible que el incremento de PSD-95 se deba a una respuesta de la neurona por intentar recuperar las espinas perdidas o el acortamiento del árbol dendrítico (Grillo et al.,2005).

Dentro de este marco, los niveles de PSD-95 en los animales que sufrieron estrés crónico en la adolescencia y diabetes en la edad adulta no concuerda con reportes anteriores. En este protocolo obtuvimos un patrón de respuesta diferente ya que tras el desarrollo de diabetes no observamos cambios en PSD-95. Estos datos podrían indicar un efecto "protector" ante los daños ocasionados por la diabetes; es decir, los GC liberados durante el ECRM pudieron jugar un papel importante en la formación y fortalecimiento de nuevas conexiones sinápticas, generando un fenómeno de resiliencia que le permitió confrontar mejor los daños derivados de la patología.

Este fenómeno de resiliencia ha sido evaluado recientemente por Romeo y colaboradores (Romeo et al., 2015), quienes debaten acerca de las posibles mecanismos por los cuales el eje HPA puede sufrir una reprogramación durante la adolescencia que le permita mejorar su respuesta ante subsecuentes estresores. Esta noción hace analogía con la "hipótesis de la higiene" en inmunología (Von Mutius et al., 2007), donde se establece que la exposición a gérmenes en edades tempranas puede ayudar al sistema inmunológico a adaptarse apropiadamente y desarrollar una mejor respuesta ante la exposición a otro microorganismo. Sin embargo, debido a la escasa información al respecto y bajo los datos obtenidos en este trabajo, no es posible afirmar este supuesto.

Existe evidencia que indica que el estrés crónico activa al sistema de opioides endógenos, los cuales mitigan la respuesta del eje HPA hacia un estresor agudo adicionado al estrés crónico. Los cambios en la función de los opioides pueden proteger a los animales de la respuesta excesiva por estrés. Visto así, en nuestro proyecto el estresor agudo corresponde a la diabetes y el crónico al ECRM.

Por otro lado, podemos observar el panorama opuesto, donde la exposición a estrés durante la adolescencia produjo una respuesta de plasticidad reducida en la edad adulta. Otros estudios han referido a este fenómeno, en el cual observan disminución de la plasticidad neuronal en hipocampo y corteza prefrontal e incremento en la amígdala de ratas jóvenes adultas que se expusieron a estrés crónico durante el periodo adolescente (Klein et al., 2013; Isgor et al., 2004).

Dentro de este orden de ideas podemos resumir que, el desarrollo de diabetes en el área CA3 del hipocampo incrementa los niveles de PSD-95 en un posible intento por recuperar la pérdida de espinas dendríticas y acortamiento dendrítico; mientras que este efecto parece ser mitigado por la exposición a estrés durante la adolescencia. El aumento en PSD-95 podría explicarse como parte de un mecanismo de protector ante la respuesta excesiva a GC en animales solamente diabéticos, pero aquellos que tuvieron estrés previo, no pueden activar este mecanismo compensatorio, lo que demuestra pérdida adaptativa al daño. En base a lo anterior, sería interesante evaluar el número de espinas dendríticas y sus cambios neuromorfológicos en el área CA3 del hipocampo y relacionarles con PSD-95, para tener así una idea más clara del proceso en función.

Con base en lo anterior, sería interesante evaluar el número de espinas dendríticas y sus cambios neuromorfológicos en el área CA3 del hipocampo y relacionarles con PSD-95, para tener así una idea más clara del proceso en función.

En seguimiento al estudio histológico, evaluamos a su vez los cambios plásticos en CPFm. Esta región fue particularmente importante en este proyecto, debido a su constante maduración durante la adolescencia y su importante participación en la regulación del eje HPA. Específicamente, nos enfocamos a la zona medial, la cual es más susceptible de sufrir modificación por la exposición a estrés, además de ejercer una estrecha comunicación con la amígdala y el hipocampo.

Nuestros resultados en relación a la abundancia de PSD-95 en la CPFm de ratas adultas muestran que no existe efecto permanente del estrés efectuado durante la adolescencia, pero se observa un incremento en PSD-95 cuando las ratas desarrollaron diabetes, siendo esta aumento ligeramente menor en los animales expuestos al estrés. Se ha reportado que en el inicio de la diabetes experimental, existe un aumento en la liberación de glutamato que trae consigo un aumento en la actividad neuronal, sin embargo si esta excitabilidad continua se genera perdida de espinas en la corteza prefrontal tras 14 semanas con diabetes (Tellez et al., 2005; Jalali et al., 2007). Es probable que debido al corto periodo de tiempo de exposición en el presente estudio en comparación con el anterior nos encontremos más en una etapa temprana de la enfermedad, con formación de nuevas sinapsis, similar a lo observado en el área CA3 del hipocampo.

Por otro lado, en el grupo diabético con estrés el incremento de PSD-95 fue menor que en el grupo diabético sin estrés. Este es un resultado no indica que la exposición a estrés durante la adolescencia provoca una menor excitabilidad en respuesta al desarrollo de diabetes, en relación con el grupo que no se expuso a estrés. Con base en lo anterior, Yuen y colaboradores encontraron que el estrés crónico durante la adolescencia disminuye la expresión de los receptores a glutamato en la corteza prefrontal por acción directa de los GC, los cuales promueven su degradación vía ubiquitinación (Yuen et al., 2012). En este contexto, es probable el estrés durante la adolescencia genere una sensibilización de este circuito, de tal manera que, cuando en la edad adulta se enfrenta nuevamente a concentraciones GC (diabetes), se activa esta vía e impide la expresión de los receptores a glutamato y en consecuencia de PSD-95.

Finalmente, para caracterizar más a fondo las modificaciones de plásticas de esta región, realizamos la evaluación del número y morfología de las espinas dendríticas, el cual nos permitiría comprender mejor los cambios obtenidos con PSD-95 y comparar con los reportes en la literatura, los cuales normalmente refieren a roedores adultos.

En cuanto al número de espinas dendríticas en la CPFm, obtuvimos un aumento en la densidad total de espinas dendríticas en el grupo diabético con estrés (estrés STZ) con respecto a su vehículo (estrés VHC).

Esta aparente contradicción (mayor número de espinas dendríticas y menor abundancia de PSD-95), nos habla de un fenómeno de poda sináptica (Schuldiner et al.,2014), donde un incremento de espinas se acompaña de una eliminación. La adolescencia es una etapa caracterizada por un aumento en la poda sináptica de la CPF. Interesantemente, este periodo es una fase marcada por una intensa actividad de los mecanismos de depresión a largo plazo (LTD), los cuales predisponen a la eliminación sináptica en esta región, inclusive la disminución de estos mecanismos, se relaciona con la transición a la edad adulta (Selemon et al., 2013).

La importancia de esta poda sináptica es establecer un ajuste y balance entre las conexiones excitatorias e inhibitorias dentro de los circuitos en desarrollo (Selemon et al., 2013). Por lo tanto una alteración de este equilibrio por la exposición a estrés o la diabetes, podría traer consecuencias a largo plazo. Se ha relacionado que aquellos individuos con inteligencia superior presentan un proceso de poda neuronal robusto en CPF durante la adolescencia (Shaw et al., 2006). Por otro lado, un exceso de poda sináptica se asocia con el trastorno de hiperactividad con déficit de atención (TDAH) (Shaw et al.,2009).

Dado lo anterior, es posible que las alteraciones conductuales observadas (depresión y ansiedad) en el presente trabajo de investigación, se relacionen con las perturbaciones encontradas en la CPF (Goto et al., 2010.) e inclusive podrían ser más evidentes en etapas donde la plasticidad neuronal disminuye.

En cuanto a la morfología de las espinas dendríticas en CPFm, observamos un comportamiento interesante, donde se ve un aumento en las espinas delgadas y disminución en las espinas tipo hongo en el grupo diabético con estrés. La variabilidad en forma y volumen de las espinas, se relaciona con sus propiedades funcionales. Una espina tipo hongo se vincula con una sinapsis fuerte y prolongada, mientras que las espinas delgadas en comparación con las hongo, se caracterizan por sinapsis más débiles y de exposición más corta (Yuste et al., 2010). Por otro lado, se sabe que las espinas tipo hongo se pueden convertir a espinas tipo delgadas cuando la actividad de LTD aumenta (Nägerl et al., 2004). Estos supuestos sugieren que en los animales que se expusieron a ECRM durante la adolescencia, podrían presentar una actividad de LTD mayor, en comparación con los animales diabéticos que no se expusieron a ECRM, por lo cual se propicia la formación de espinas delgadas. Esto podría advertir un desbalance entre el LTD/LTP en estos animales con consecuencias a futuro.

Por otro lado, el aumento en espinas delgadas y disminución en las espinas tipo hongo correlaciona bien con el supuesto mencionado anteriormente respecto a la degradación de los

receptores a glutamato. Si existen menos receptores a glutamato en la densidad postsináptica, es más fácil que se formen espinas delgadas en comparación con las hongo.

En conclusión hasta este punto tenemos que, el desarrollo de diabetes, trae consigo un aumento en PSD-95 en CPFM, quizá debido a un aumento en el LTP, en el intento por recuperar las pérdidas en espinas de manera similar que en el área CA3 del hipocampo; sin embargo, la exposición a estrés durante la adolescencia genera un incremento de PSD-95 menor y cambios en el número de espinas y su morfología, probablemente relacionado con la degradación de los receptores a glutamato (NMDA) y aumento en el LTD.

3. Sistema colinérgico en animales con estrés y diabetes experimental

El último aspecto que abordamos en el presente trabajo, fue la evaluación de la actividad colinérgica en el NBM. El estudio del sistema colinérgico fue valioso para nosotros debido a su importante relación con los procesos cognitivos (Craig et al., 2011) y su contribución en los procesos de plasticidad neuronal (Picciotto et al., 2012), vinculado quizás, con su papel en la regulación del estrés en PFC e hipocampo (Paul et al., 2015). Específicamente, nos enfocamos en el NBM quien tiene proyecciones hacia la PFC.

En el presente trabajo, observamos una disminución de la enzima ChAT en el grupo no diabético que se sometió a estrés durante la adolescencia. Estos resultados coinciden con lo reportado por Zhao y colaboradores, quienes observan disminución en ChAT tras la exposición a estrés crónico, el cual se mantiene días después de retirado el estresor (Zhao et al., 2013).

Por otra parte, en los animales que fueron sometidos a diabetes, se observa un incremento de ChAT en NBM en comparación con los animales que recibieron VHC, semejante a los resultados de PSD-95 en mPFC. Estos hallazgos difieren de los reportados por Wahba y colaboradores, quienes observan una disminución de ChAT en corteza en animales con 14 semanas de diabetes inducida con STZ (Wahba et al., 1988). Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que la exposición a GC en periodos cortos, provocan una hiperactivación del sistema colinérgico; tomando en cuenta que la diabetes incrementa los niveles GC, es probable que 25 días con diabetes, generen esta respuesta como mecanismo compensatorio. Por otro lado, es posible que este aumento en ChAT en nuestros animales diabéticos contribuya con los trastornos de ansiedad y depresión observados (Mineur et al., 2013).

Cabe señalar que, la liberación de acetilcolina (ACh) en el sistema límbico, influyen en la plasticidad neuronal. A través de la activación/inactivación de sus receptores nicotínicos y muscarínicos, lo que facilita la activación de las neuronas glutamatergicas y la generación del LTP

(Picciotto et al., 2012). En relación con lo anterior, nuestros datos sugieren que la activación del sistema colinérgico en el NBM regula la actividad de la plasticidad en mPFC, ya que el incremento de ChAT va de la mano con el aumento en PSD-95 en mPCF.

En conjunto la PFC y ACh juega un papel importante en la modulación de los procesos cognitivos relacionados con la atención (Klinkenberg et al., 2011). Patologías como la esquizofrenia y el TDAT, se asocian fuertemente con alteraciones en mPFC y ACh. Se ha reportado que tras la administración de agonistas nicotínicos específicos, las capacidades cognitivas dependientes de CPFm mejoran, en ambos pacientes. (Newhouse et al., 2004; Young & Geyer et al., 2013). Por lo tanto, alteraciones en NBM y CPFm, durante la adolescencia puede aumentar las posibilidades de desarrollar alteraciones psicológicas y cognitivas en el futuro. El supuesto anterior coincide con la nueva hipótesis colinérgica sobre el Alzheimer, propuesta por McDonald y colaboradores, quienes establecen que alteraciones en el sistema colinérgico, disminuyen la habilidad del cerebro para enfrentar insultos posteriores como el estrés, alteraciones circadianas, vejez, accidentes cerebrovasculares, entre otros; dejándole más susceptible de desarrollar alteraciones cognitivas (Craig et al., 2011). En este contexto, se le atribuye al sistema colinérgico con un papel neuroprotector, dado quizás por su capacidad para generar cambios plásticos.

Como conclusión general, los datos obtenidos en este trabajo indican que la exposición a estresores durante la adolescencia trae consigo consecuencias metabólicas y fisiológicas negativas, aunado a cambio neuromorfológico en las espinas dendríticas de la CPFm, los cuales correlacionan histológicamente con un aumento en PSD-95 en CPFm y ChAT en NBM y conductualmente con las conductas de depresión y ansiedad.

Estos cambios, junto con el aumento en la plasticidad en CA3 podrían relacionarse con la conservación de las habilidades cognoscitivas que clásicamente son alterados por la diabetes. Finalmente es posible que estos cambios en la plasticidad neuronal se deban a un mecanismo de resiliencia desarrollado en esta ante la exposición a los dos tipos de estresores: psicológico (ECRM) y fisiológico (diabetes). Sin embargo, es necesario realizar otros futuros experimentos para entender la generación de los mecanismos resilientes generados a diferentes etapas del desarrollo.

VI. CONCLUSIONES

6.1 El estrés crónico durante la adolescencia modifica el metabolismo energético, el cual disminuye los niveles de insulina y potencializa el aumento de los triglicéridos ocasionados por la diabetes en la edad adulta.

6.2 De manera independiente, el estrés crónico durante la adolescencia y la diabetes en la edad adulta incrementan la conducta relacionada con ansiedad, sin efecto sinérgico aparente.

6.3 La memoria de trabajo no se ve afectada por la exposición a estrés crónico durante la adolescencia y el subsecuente desarrollo de diabetes.

6.4 La diabetes aumenta la conducta relacionada con depresión, independientemente de la exposición a estrés.

6.5 El estrés crónico durante la adolescencia disminuye la inumureactividad de de la enzima ChAT en el NBM en la edad adulta, mientras que el desarrollo de diabetes incrementa estos valores, independientemente del la exposición a estrés.

6.6 En la corteza prefrontal medial, la exposición a estrés crónico en la adolescencia mitiga el incremento de PSD-95 ocasionado por la diabetes en la edad adulta.

6.7 En el área CA3 del hipocampo, el estrés crónico en la adolescencia incrementa la inumureactividad de PSD-95 y previene el incremento ocasionado por la diabetes en la edad adulta.

6.8 El estrés crónico en la adolescencia y el subsecuente desarrollo de diabetes, aumentan la densidad de espinas dendríticas y generan cambios neuromorfológicos en las mismas.

6.9 El estrés crónico en la adolescencia y el subsecuente desarrollo de diabetes aumentan el peso relativo de las glándulas adrenales, resultando en una atrofia adrenal mayor.

VII. PERSPECTIVAS

7.1 Incrementar el daño generado por STZ, mediante el tiempo de duración de la diabetes para evaluar los efectos crónicos a nivel cognitivo y metabólico inducidos por la enfermedad.

7.2 Estresar durante la adolescencia e inducir a diabetes experimental en distintas etapas de la vida (adulto y vejez), para evaluar la vulnerabilidad de la plasticidad neuronal en estas etapas.

7.3 Medir el número de espinas dendríticas y estudiar sus cambios morfológicos en el área CA3 del hipocampo y la amígdala.

7.4 Determinar la inmunoreactividad de la enzima ChAT en septum medial y correlacionar con los cambios en la plasticidad neuronal de CA3.

7.5 Evaluar posibles fenómenos de resiliencia generados durante la adolescencia, retando al sistema ante la exposición al mismo estresor, en periodos posteriores de la vida.

7.6 Medir los receptores a mineralocorticoides y glucocorticoides en CPFm, para relacionarle con los cambios en PSD-95 y la enzima ChAT.

7.7 Realizar pruebas conductuales para evaluar posibles alteraciones en los proceso de atención, como la tarea de orden temporal.

7.8 Evaluar los efectos del estrés con un paradigma multimodal para descartar posible fenómeno de adaptación al estresor.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahám, I., Harkany, T., Horvath, K. M., Veenema, A. H., Penke, B., Nyakas, C., & Luiten, P. G. M. (2000). Chronic Corticosterone Administration Dose-Dependently Modulates A β (1–42)– and NMDA-Induced Neurodegeneration in Rat Magnocellular Nucleus Basalis. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(6), 486-494. doi:10.1046/j.1365-2826.2000.00475.x
- Aisa, B., Gil-Bea, F. J., Marcos, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., & Ramírez, M. J. (2009). Neonatal stress affects vulnerability of cholinergic neurons and cognition in the rat: Involvement of the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology*, 34(10), 1495-1505. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.003
- Aksu, I., Ates, M., Baykara, B., Kiray, M., Sisman, A. R., Buyuk, E. Uysal, N. (2012). Anxiety correlates to decreased blood and prefrontal cortex IGF-1 levels in streptozotocin induced diabetes. *Neuroscience Letters*, 531(2), 176-181.
- Alberti, K. G. M. M., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine*, 15(7), 539-553. doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S
- Bale, T. L., & Epperson, C. N. (2015). Sex differences and stress across the lifespan. *Nat Neurosci*, 18(10), 1413-1420. doi:10.1038/nn.4112
- Bartus, R. T. (1978). Evidence for a direct cholinergic involvement in the scopolamine-induced amnesia in monkeys: Effects of concurrent administration of physostigmine and methylphenidate with scopolamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 9(6), 833-836. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(78)90364-7
- Biessels, G.-J., Kamal, A., Urban, I. J. A., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W., & Gispen, W. H. (1998). Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Research*, 800(1), 125-135. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00510-1
- Bourke, C. H., & Neigh, G. N. (2011). Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. *Hormones and Behavior*, 60(1), 112-120. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.03.011
- Buynitsky, T., & Mostofsky, D. I. (2009). Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(7), 1089-1098. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.05.004
- Calhoun, G. G., & Tye, K. M. (2015). Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat Neurosci*, 18(10), 1394-1404. doi:10.1038/nn.4101
- Can, A., Dao, D. T., Arad, M., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., & Gould, T. D. (2012). The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(59), 3638. doi:10.3791/3638
- Cintra, A., Bhatnagar, M., Chadi, G., Tinner, B., Lindberg, J., Gustafsson, J. Å. Fuxe, K. (1994). Glial and Neuronal Glucocorticoid Receptor Immunoreactive Cell Populations in Developing, Adult, and Aging Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746(1), 42-61. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb39210.x

- Cook, S. C., & Wellman, C. L. (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Journal of Neurobiology*, 60(2), 236-248. doi:10.1002/neu.20025
- Cooper, M. S., Seibel, M. J., & Zhou, H. (2016). Glucocorticoids, bone and energy metabolism. *Bone*, 82, 64-68. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.038
- Craig, L. A., Hong, N. S., & McDonald, R. J. (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(6), 1397-1409. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.03.001
- Chattarji, S., Tomar, A., Suvrathan, A., Ghosh, S., & Rahman, M. M. (2015). Neighborhood matters: divergent patterns of stress-induced plasticity across the brain. *Nat Neurosci*, 18(10), 1364-1375. doi:10.1038/nn.4115
- Deacon, R. M. J., & Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nat. Protocols*, 1(1), 7-12. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.2
- DePirro, R., Lauro, R., Testa, I., Ferretti, I., De Martinis, C., & Dellatonia, R. (1982). Decreased insulin receptors but normal glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 216(4543), 311-313.
- Doody, R. S., Dunn, J. K., Clark, C. M., Farlow, M., Foster, N. L., Liao, T., Massman, P. (2001). Chronic Donepezil Treatment Is Associated with Slowed Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 12(4), 295-300. Retrieved from http://www.karger.com/DOI/10.1159/000051272
- DRACHMAN, D. A. (1977). Memory and cognitive function in man: Does the cholinergic system have a specific role? *Neurology*, 27(8), 783. doi:10.1212/wnl.27.8.783
- Eiland, L., Ramroop, J., Hill, M. N., Manley, J., & McEwen, B. S. Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 37(1), 39-47. doi:10.1016/j.psyneuen.2011.04.015
- Eiland, L., & Romeo, R. D. (2013). Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience*, 249, 162-171. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.048
- Elliott, J. M., Scott, E. C., Margaret, F., & Stephen, D. G. (2007). Cholinergic Molecular Substrates of Mild Cognitive Impairment in the Elderly. *Current Alzheimer Research*, 4(4), 340-350. doi:http://dx.doi.org/10.2174/156720507781788855
- Emgård, M., Paradisi, M., Pirondi, S., Fernandez, M., Giardino, L., & Calzà, L. (2007). Prenatal glucocorticoid exposure affects learning and vulnerability of cholinergic neurons. *Neurobiology of Aging*, 28(1), 112-121. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.015
- Formiga, F., Reñe, R., & Pérez-Maraver, M. (2015). Dementia and diabetes: Casual or causal relationship? *Medicina Clínica (English Edition)*, 144(4), 176-180. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.medcle.2015.05.015
- García-Martín, A., Reyes-García, R., Ávila-Rubio, V., & Muñoz-Torres, M. (2013). Osteocalcin: A link between bone homeostasis and energy metabolism. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 60(5), 260-263. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.endoen.2012.06.012

- García, Z. U. (2011). Efectos crónicos de la cafeína sobre el nivel y tolerancia a la glucosa en ratas sanas y con diabetes mellitus experimental. (Maestría en Ciencias), Universidad de Colima, Centro universitario de investigación biomédica.
- Goh, S.-Y., & Cooper, M. E. (2008). The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(4), 1143-1152. doi:doi:10.1210/jc.2007-1817
- Goto, Y., Yang, C. R., & Otani, S. (2010). Functional and dysfunctional synaptic plasticity in prefrontal cortex: roles in psychiatric disorders. *Biological psychiatry*, 67(3), 199-207.
- Green, M. R., & McCormick, C. M. (2013). Effects of stressors in adolescence on learning and memory in rodent models. *Hormones and Behavior*, 64(2), 364-379. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.09.012
- Grigsby, A. B., Anderson, R. J., Freedland, K. E., Clouse, R. E., & Lustman, P. J. (2002). Prevalence of anxiety in adults with diabetes: a systematic review. *Journal of psychosomatic research*, 53(6), 1053-1060.
- Grillo, C. A., Piroli, G. G., Wood, G. E., Reznikov, L. R., McEwen, B. S., & Reagan, L. P. (2005). Immunocytochemical analysis of synaptic proteins provides new insights into diabetes-mediated plasticity in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 136(2), 477-486. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.019
- Group, A. D. C. (2004). Long-term donepezil treatment in 565 patients with Alzheimer's disease (AD2000): randomised double-blind trial. *The Lancet*, 363(9427), 2105-2115. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16499-4
- Gust, D. A., Wilson, M. E., Stocker, T., Conrad, S., Plotsky, P. M., & Gordon, T. P. (2000). Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Is Altered by Aging and Exposure to Social Stress in Female Rhesus Monkeys. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(7), 2556-2563. doi:doi:10.1210/jcem.85.7.6696
- Ha, H.-Y., Kim, K.-S., Yeom, Y. I., Lee, J.-K., & Han, P.-L. (2003). Chronic restraint stress massively alters the expression of genes important for lipid metabolism and detoxification in liver. *Toxicology letters*, 146(1), 49-63.
- Halter, J. B., Beard, J. C., & Porte, D. (1984). Islet function and stress hyperglycemia: plasma glucose and epinephrine interaction. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 247(1), E47-E52. Retrieved from <http://ajpendo.physiology.org/content/247/1/E47.abstract>
- Handa, R. J., Burgess, L. H., Kerr, J. E., & O'Keefe, J. A. (1994). Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Hormones and Behavior*, 28(4), 464-476.
- Hill, M. N., & McEwen, B. S. (2010). Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(5), 791-797. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.11.001
- 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(5), 636-648. doi:10.1002/hipo.10207

- Jalali, M.-R., & Sharayeli, M. (2007). Dendritic spine changes in medial prefrontal cortex of male diabetic rats using Golgi-impregnation method. *Archives of Iranian medicine*, 10(1), 54-58.
- Kamal, A., Biessels, G.-J., Gispen, W. H., & Ramakers, G. M. J. (2006). Synaptic transmission changes in the pyramidal cells of the hippocampus in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Brain Research*, 1073–1074, 276-280. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.070>
- Kamal, A., Biessels, G., Duis, S., & Gispen, W. (2000). Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia*, 43(4), 500-506.
- Kamal, A., Biessels, G. J., Urban, I. J. A., & Gispen, W. H. (1999). Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression. *Neuroscience*, 90(3), 737-745. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00485-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00485-0)
- Kanbur, N. Ö., Derman, O., Şen, T. A., & Kinik, E. (2002). Osteocalcin. A biochemical marker of bone turnover during puberty.
- Kim, H. G., & Kim, K. L. (2007). Decreased hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein associated with stress exposure in rat brain by proteomic analysis. *Journal of Neuroscience Research*, 85(13), 2898-2908. doi:10.1002/jnr.21407
- Klein, Z. A., & Romeo, R. D. (2013). Changes in hypothalamic–pituitary–adrenal stress responsiveness before and after puberty in rats. *Hormones and Behavior*, 64(2), 357-363. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.01.012>
- Klinkenberg, I., Sambeth, A., & Blokland, A. (2011). Acetylcholine and attention. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 430-442.
- Labno, C. (2008). particle counting - automated and manual. (Consultado: 28 octubre del 2015) Retrieved from http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:analysis:particle_counting_-_automated_and_manual
- Landa. (2000). Los fármacos antihipertensivos y la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado: participación de los sistemas de neurotransmisión. *Arch Neurocién (Mex)*, 5, 74-83.
- Lemberger, T., Saladin, R., Vázquez, M., Assimacopoulos, F., Staels, B., Desvergne, B., Auwerx, J. (1996). Expression of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gene Is Stimulated by Stress and Follows a Diurnal Rhythm. *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1764-1769. doi:10.1074/jbc.271.3.1764
- Lemke, U., Krones-Herzig, A., Diaz, M. B., Narvekar, P., Ziegler, A., Vegiopoulos, S., Sreter, R. A. (2008). The glucocorticoid receptor controls hepatic dyslipidemia through Hes1. *Cell metabolism*, 8(3), 212-223.
- Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (1995). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: Involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*, 69(1), 89-98. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00259-L](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(95)00259-L)
- Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (2000). Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(20), 11056-11061. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27147/>

- Makino, S., Asaba, K., Nishiyama, M., & Hashimoto, K. (1999). Decreased type 2 corticotropin-releasing hormone receptor mRNA expression in the ventromedial hypothalamus during repeated immobilization stress. *Neuroendocrinology*, 70(3), 160-167.
- Mark, G. P., Rada, P. V., & Shors, T. J. (1996). Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala. *Neuroscience*, 74(3), 767-774. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00211-4](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(96)00211-4)
- Martínez-Tellez, R., de Jesús Gómez-Villalobos, M., & Flores, G. (2005). Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Research*, 1048(1), 108-115.
- McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N., & Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci*, 18(10), 1353-1363. doi:[10.1038/nn.4086](https://doi.org/10.1038/nn.4086)
- McLaughlin, K. J., Gomez, J. L., Baran, S. E., & Conrad, C. D. (2007). The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Research*, 1161, 56-64.
- Mesulam, M. M., Rosen, A. D., & Mufson, E. J. (1984). Regional variations in cortical cholinergic innervation: Chemoarchitectonics of acetylcholinesterase-containing fibers in the macaque brain. *Brain Research*, 311(2), 245-258. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90087-8](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(84)90087-8)
- Mineur, Y. S., Obayemi, A., Wigstrand, M. B., Fote, G. M., Calarco, C. A., Li, A. M., & Picciotto, M. R. (2013). Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety-and depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), 3573-3578.
- Mizuno, T., & Kimura, F. (1997). Attenuated stress response of hippocampal acetylcholine release and adrenocortical secretion in aged rats. *Neuroscience Letters*, 222(1), 49-52. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)13340-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(97)13340-7)
- Morita, M., Kurochkin, I. V., Motojima, K., Goto, S., Takano, T., Okamura, S., Imanaka, T. (2000). Insulin-Degrading Enzyme Exists Inside of Rat Liver Peroxisomes and Degrades Oxidized Proteins. *Cell Structure and Function*, 25(5), 309-315. doi:[10.1247/csf.25.309](https://doi.org/10.1247/csf.25.309)
- Nägerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B., & Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*, 44(5), 759-767.
- Negrón-Oyarzo, I., Pérez, M. Á., Terreros, G., Muñoz, P., & Dagnino-Subiabre, A. (2014). Effects of chronic stress in adolescence on learned fear, anxiety, and synaptic transmission in the rat prelimbic cortex. *Behavioural Brain Research*, 259, 342-353. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.11.001>
- NeuronStudio. (2007-2009). Dendritic Spine Classification(Fecha de consulta: 28 de octubre 2015) <http://research.mssm.edu/cnic/help/ns/classifier.html>

- Newhouse, P. A., Potter, A., & Singh, A. (2004). Effects of nicotinic stimulation on cognitive performance. *Current opinion in pharmacology*, 4(1), 36-46.
- Paul, S., Jeon, W. K., Bizon, J. L., & Han, J.-S. (2015). Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7. doi:10.3389/fnagi.2015.00043
- Pedersen, W. A., McMillan, P. J., Kulstad, J. J., Leverenz, J. B., Craft, S., & Haynatzki, G. R. (2006). Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice. *Experimental Neurology*, 199(2), 265-273. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.01.018
- Perez-Cruz, C., Muller-Keuker, J. I. H., Heilbronner, U., Fuchs, G. (2007). Morphology of Pyramidal Neurons in the Rat Prefrontal Cortex: Lateralized Dendritic Remodeling by Chronic Stress. *Neural Plasticity*, 2007, 14. doi:10.1155/2007/46276
- Picciotto, Marina R., Higley, Michael J., & Mineur, Yann S. (2012). Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron*, 76(1), 116-129. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036
- Puron. (2014). Interacciones histaminérgicas y colinérgicas en el núcleo basal magnocelular y la corteza insular durante la formación de la memoria al sabor aversivo. (Doctorado), UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, Juriquilla, Querétaro.
- Rajashree, R., Kholkute, S. D., & Goudar, S. S. (2011). Effects of duration of diabetes on behavioural and cognitive parameters in streptozotocin-induced juvenile diabetic rats. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 18(4), 26.
- Rao, M. S., & Raju, T. (1995). Effect of chronic restraint stress on dendritic spines and excrescences of hippocampal CA3 pyramidal neurons—a quantitative study. *Brain Research*, 694(1), 312-317.
- Reagan, L. P., Grillo, C. A., & Piroli, G. G. (2008). The As and Ds of stress: Metabolic, morphological and behavioral consequences. *European Journal of Pharmacology*, 585(1), 64-75. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.050
- Romeo, R. D. (2013). The Teenage Brain: The Stress Response and the Adolescent Brain. *Current directions in psychological science*, 22(2), 140-145. doi:10.1177/0963721413475445
- Romeo, R. D. (2015). Perspectives on stress resilience and adolescent neurobehavioral function. *Neurobiology of Stress*, 1, 128-133. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.11.001
- Ryan, C. M., & Geckle, M. (2000). Why is learning and memory dysfunction in Type 2 diabetes limited to older adults? *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 16(5), 308-315. doi:10.1002/1520-7560(2000)9999:9999::AID-DMRR141>3.0.CO;2-X
- Schuldiner, O., & Yaron, A. (2015). Mechanisms of developmental neurite pruning. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(1), 101-119.
- Selemon, L. (2013). A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. *Translational psychiatry*, 3(3), e238.
- Shaw, P., Greenstein, D., Lerch, J., Clasen, L., Lenroot, R., Gogtay, J., Giedd, J. (2006). Intellectual ability and cortical development in children and adolescents. *Nature*, 440(7084), 676-679.

- Shaw, P., Sharp, W. S., Morrison, M., Eckstrand, K., Greenstein, D. K., Clasen, Rapoport, J. L. (2009). Psychostimulant treatment and the developing cortex in attention deficit hyperactivity disorder. *The American journal of psychiatry*, 166(1), 58-63.
- Skeberdis, V. A., Lan, J.-y., Zheng, X., Zukin, R. S., & Bennett, M. V. L. (2001). Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-d- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3561-3566. doi:10.1073/pnas.051634698
- Slattery, D. A., & Cryan, J. F. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat. Protocols*, 7(6), 1009-1014. doi:http://www.nature.com/nprot/journal/v7/n6/abs/nprot.2012.044.html#supplementary-information
- Starr, V. L., & Convit, A. (2007). Diabetes, Sugar-Coated but Harmful to the Brain. *Current opinion in pharmacology*, 7(6), 638-642. doi:10.1016/j.coph.2007.10.007
- Stranahan, A. M., Arumugam, T. V., Cutler, R. G., Lee, K., Egan, J. M., & Mattson, M. P. (2008). Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci*, 11(3), 309-317. doi:http://www.nature.com/neuro/journal/v11/n3/supinfo/nn2055_S1.html
- Subiabre. (2012). MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL ESTRÉS Y LAS CONDUCTAS DEPRESIVAS *Rev. Farmacol. Chile*, 5, 19. Retrieved from http://www.sofarchi.cl/medios/pub/Dagnino_A_Revista_de_Farmacologia_de_Chile_2012_V5_%20N1.pdf
- Swaab, D., Raadsheer, F., Endert, E., Hofman, M., Kamphorst, W., & Ravid, R. (1994). Increased cortisol levels in aging and Alzheimer's disease in postmortem cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroendocrinology*, 6(6), 681-687.
- Takeuchi, M., Sato, T., Takino, J.-i., Kobayashi, Y., Furuno, S., Kikuchi, S., & Yamagishi, S.-i. Diagnostic utility of serum or cerebrospinal fluid levels of toxic advanced glycation end-products (TAGE) in early detection of Alzheimer disease. *Medical Hypotheses*, 69(6), 1358-1366. doi:10.1016/j.mehy.2006.12.017
- Toth, E., Gersner, R., Wilf-Yarkoni, A., Raizel, H., Dar, D. E., Richter-Levin, Zangen, A. (2008). Age-dependent effects of chronic stress on brain plasticity and depressive behavior. *Journal of Neurochemistry*, 107(2), 522-532. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05642.x
- Venheim, E. R. (2009). *The Effects of Restraint Stress on Anxiety-like Behavior in Adolescent and Adult Male Sprague-dawley Rats: An Examination of the Effects of Early-life Stress on the Development of Psychopathologies*: Lake Forest College.
- Von Mutius, E. (2007). Allergies, infections and the hygiene hypothesis—the epidemiological evidence. *Immunobiology*, 212(6), 433-439.
- Vyas, A., Pillai, A. G., & Chattarji, S. (2004). Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*, 128(4), 667-673. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.013
- Wahba, Z., & Soliman, K. (1988). Effect of diabetes on the enzymes of the cholinergic system of the rat brain. *Experientia*, 44(9), 742-746.

- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protocols*, 2(2), 322-328. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Wang, S.-h., Sun, Z.-l., Guo, Y.-j., Yuan, Y., & Yang, B.-q. (2009). Diabetes impairs hippocampal function via advanced-glycation-end product-mediated new neuron generation in animals with diabetes-related depression. *Toxicological sciences*, kfp126.
- Wilson, I. A., Gallagher, M., Eichenbaum, H., & Tanila, H. Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding. *Trends in Neurosciences*, 29(12), 662-670. doi:10.1016/j.tins.2006.10.002
- Wisniewski, K., Fedosiewicz-Wasiluk, M. g., Holy, Z., Car, H., & Grzêda, E. (2003). Influence of NMDA, a potent agonist of glutamate receptors, on behavioral activity in 4-week streptozotocin-induced diabetic rats. *Polish journal of pharmacology*, 55(3), 345-352.
- Wrighten, S. A., Piroli, G. G., Grillo, C. A., & Reagan, L. P. (2009). A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(5), 444-453. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.013>
- Wu, K. K., & Huan, Y. (2008). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols in Pharmacology*, 5.47. 41-45.47. 14.
- Young, J. W., & Geyer, M. A. (2013). Evaluating the role of the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Biochemical pharmacology*, 86(8), 1122-1132.
- Yuen, Eunice Y., Wei, J., Liu, W., Zhong, P., Li, X., & Yan, Z. Repeated Stress Causes Cognitive Impairment by Suppressing Glutamate Receptor Expression and Function in Prefrontal Cortex. *Neuron*, 73(5), 962-977. doi:10.1016/j.neuron.2011.12.033
- Yuste. (2010). *Dendritic spine* (Vol. 1). Cambridge, Massachusetts: The MIT Press.
- Zardoos, H., Zahedi Asl, S., Gharib Naseri, M. K., & Hedayati, M. (2006). Effect of chronic restraint stress on carbohydrate metabolism in rat. *Physiology & Behavior*, 89(3), 373-378. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.06.023>
- Zhao, T., Huang, G.-B., Muna, S., Bagalkot, T., Jin, H.-M., Chae, H.-J., & Chung, Y.-C. (2013). Effects of chronic social defeat stress on behavior and choline acetyltransferase, 78-kDa glucose-regulated protein, and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein in adult mice. *Psychopharmacology*, 228(2), 217-230. doi:10.1007/s00213-013-3028-6