



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Postgrado

TESIS

**“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN
HIPOCAMPO DE RATAS”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

I.B.Q. Diana Itzel Talavera Mondragón

Directora de tesis: D. C. Bertha Fenton Navarro

Co-Directora: D. C. Luz Torner Aguilar

Morelia Michoacán, a junio de 2022

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Glicobiología de la División de Estudios de Posgrado en la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH. Y en el Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI) IMSS, bajo la asesoría de la D en C. Bertha Fenton Navarro y la D en C María de la Luz Torner Aguilar.

Apoyado por:

CONACyT beca No. 64885

COMITÉ TUTORAL.

Presidente: D.C. José Miguel Cervantes Alfaro.

Vocal 1: D.C. Bertha Fenton Navarro.

Vocal 2: D.C. María de la Luz Torner Aguilar.

Vocal 3: D.C. Marcia Gauthereau Torres.

Vocal 4: M.C. Manuel López Rodríguez.

DEDICATORIA

A mis padres, por haberme guiado hasta este punto de mi vida en el que finalizo una etapa muy importante para mí. Este grado de maestra en ciencias de salud es de ellos, por apoyarme y alentarme a seguir siempre adelante.

A mi hermano que siempre ha estado para mí cuando necesito su apoyo.

A mi novio, Alberto, por apoyarme, escucharme, alentarme, acompañarme, quererme y siempre estar para mí.

A mi abuelita Coco, porque estuvo conmigo desde un inicio y me hubiera encantado que estuviera al finalizar.

A mis abuelitos, tíos, amigos y todos los que contribuyeron a formar la gran persona en la que me he convertido.

Y sobre todo a Dios que sin el no podría haber logrado este título y alcanzar las metas que hasta el día de hoy he alcanzado.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Concepto de estrés.....	1
1.2 Origen del estrés.....	1
1.3 Tipos de estrés.....	2
1.4 Fisiología del estrés.....	3
1.5 Hipocampo.....	6
1.5.1 Regulación del eje HPA por medio del hipocampo.....	6
1.6 Estrés postnatal.....	8
1.7 Estrés vital temprano en humanos.....	11
1.8 Relación entre estrés postnatal sobre estrés oxidativo.....	12
1.9 Radicales libres.....	13
1.10 Estrés oxidativo.....	14
1.11 Sistema antioxidante.....	15
2 ANTECEDENTES	18
3 JUSTIFICACIÓN	21
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
5 HIPOTESIS	24
6 OBJETIVOS	24
6.1 Objetivo general.....	24
6.2 Objetivos específicos.....	24
7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
7.1 Materiales.....	25
7.2 Métodos.....	25
7.2.1 Recolección de tejido cerebral (hipocampo) para la cuantificación de enzimas antioxidantes.....	28
7.2.2 Homogenización del hipocampo y determinación de proteínas totales.....	28
7.2.3 Actividad de las enzimas antioxidantes.....	29
7.3 Análisis estadístico.....	31

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

8	RESULTADOS	32
9	DISCUSIÓN	50
10	CONCLUSIONES	60
11	REFERENCIAS BIBILOGRÁFICAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Activación del sistema nervioso autónomo bajo situaciones de estrés ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 2. Activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) bajo condiciones de estrés. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 3. Activación de los receptores de glucocorticoides (GR)..... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 4. Esquema de metodología. (grupos ontrol en condiciones basales y control en condiciones de estrés)	26
Figura 5. Esquema de metodología. Grupos de SM en condiciones basales (estrés crónico) y SM estrés (estrés agudo + estrés crónico).	27
Figura 6. Esquema de la metodología general del proyecto..... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 7. Peso (g) de crías de ratas.....	32
Figura 8. Comparación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en machos.....	33
Figura 9. Comparación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en hembras.	33
Figura 10. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en hipocampo.	34
Figura 11. Comparación de la actividad de catalasa (CAT) en machos.....	35
Figura 12. Comparación de la actividad de catalasa (CAT) en hembras.	35
Figura 13. Actividad de catalasa (CAT) en hipocampo.	36
Figura 14. Comparación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX) en machos.	37
Figura 15. Comparación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX) en hembras.....	38
Figura 16. Actividad de glutatión peroxidasa (GPX) en hipocampo.	39
Figura 17. Comparación de la actividad de glutatión reductasa (GSH) en machos..	40
Figura 18. Comparación de la actividad de glutatión reductasa (GSH) en hembras.....	40
Figura 19. Actividad de glutatión reductasa (GSH) en hipocampos.	41
Figura 20. Comparación de la actividad de glutatión transferasa (GST) en machos.	42
Figura 21. Comparación de la actividad de glutatión transferasa (GST) en hembras.	43
Figura 22. Actividad de glutatión transferasa (GST) en hipocampo.....	44
Figura 23. Comparación de la cuantificación de FRAP en machos.....	44
Figura 24. Comparación de la cuantificación de FRAP en hembras.....	45
Figura 25. Actividad de la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP) en hipocampo.	46
Figura 26. Comparación de la cuantificación de MDA en machos.....	47
Figura 27. Comparación de la cuantificación de MDA en hembras.	48
Figura 28. Actividad del malondialdehído (MDA) en hipocampo.....	49
Figura 29. Esquema de resultados.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de resultados de las actividades de las enzimas antioxidantes..... 49

RESUMEN

El estrés postnatal provoca consecuencias negativas en el desarrollo cerebral y neuroendocrino del individuo, las cuales se asocian con un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la capacidad de defensa de los antioxidantes fisiológicos. **Objetivo:** Evaluar las actividades de enzimas antioxidantes y parámetros de estrés oxidativo en hipocampo de crías de ratas en presencia de estrés agudo y crónico postnatal. **Metodología:** Se utilizaron crías de ratas Sprague Dawley, teniendo 4 grupos: Control basal (CB), Control estrés (CE), SM basal (SMB) y SM estrés (SME). Cada grupo se dividió en machos y hembras. Al grupo CB se mantuvo con la madre hasta el día postnatal (PN) 14 y al grupo de SM le fueron separadas las crías de las madres 3h diarias del PN 1-14, eutanizando ambos grupos el PN15 en condiciones basales. Los grupos CE y SME, fueron estresados por SM 3h previo a la eutanasia (PN15). Posteriormente se extrajo el hipocampo, se congeló a -70°C y se homogenizó para determinar proteínas totales y cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes utilizando métodos colorimétricos. **Resultados:** Al realizar las comparaciones entre condiciones basales: se obtuvo una diferencia significativa entre las enzimas CAT, FRAP y MDA en ambos sexos; GSH y GST en hembras. Al realizar las comparaciones en condiciones de estrés, se presentó diferencia significativa entre CAT y MDA en ambos sexos; GSH, GST Y FRAP en hembras; GPX en machos. Además de que se observó una diferencia significativa entre los grupos CE y SME en GPX, GSH y GST en machos y MDA en ambos sexos. **Conclusión:** La actividad de las enzimas antioxidantes se encuentran disminuidas debido al estrés postnatal causado por SM en el hipocampo de crías de ratas, lo que estará provocando un estado de estrés oxidativo en el organismo.

ABSTRACT

Postnatal stress causes negative consequences in brain and neuroendocrine development of the individual, which are associated with an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the defense capacity of physiological antioxidants. **Objective:** To evaluate the activities of antioxidant enzymes and oxidative stress parameters in hippocampus of rat pups in the presence of acute and chronic postnatal stress. **Methodology:** Sprague Dawley rat pups were used, having 4 groups: Basal control (BC), Control stress (CS), SM basal (SMB) and SM stress (SMS). Each group was divided into males and females. The BC group was kept with the mother until postnatal day (PN) 14 and the SM group was separated from the mother 3h daily from PN 1-14, euthanizing both groups on PN 15 under basal conditions. The CS and SMS groups were stressed by SM 3h prior to euthanasia (PN15). Subsequently, the hippocampus was extracted, frozen at -70°C and homogenized to determine total proteins and quantify the activity of antioxidant enzymes using colorimetric methods. **Results:** When comparisons were made between basal conditions: a significant difference was obtained between CAT, FRAP and MDA enzymes in both sexes; GSH and GST in females. When comparisons were made under stress conditions, there was a significant difference between CAT and MDA in both sexes; GSH, GST and FRAP in females; GPX in males. In addition, a significant difference was observed between the CS and SMS groups in GPX, GSH and GST in males and MDA in both sexes. **Conclusion:** The activity of antioxidant enzymes is decreased due to postnatal stress caused by SM in the hippocampus of rat pups, which will be causing a state of oxidative stress in the organism.

Palabras clave: Especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo, separación maternal, estrés postnatal, enzimas antioxidantes.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Concepto de estrés

El interés por el estudio del estrés ha cobrado particular relevancia en el último siglo; si bien no es un fenómeno exclusivo de la actualidad, en los últimos tiempos se ha posicionado como uno de los principales problemas de salud tanto física como mental de los individuos (Spangenberg-Morelli, 2015). La expresión del término estrés es utilizada por primera vez en el año 1926 por Selye. En su acepción inicial estrés significa respuesta a algún estímulo o agente que producía dicha reacción, al cual se le denominó estresor (Estr et al., 2006), que forma parte de la vida de cualquier persona, pero si su presencia es excesiva puede ser dañino para la mente y el cuerpo (Capdevila, 2005).

El estrés es una respuesta natural y necesaria para la vida y para la supervivencia. Cuando esta respuesta natural aparece en exceso se produce una sobrecarga de tensión esto repercute de manera negativa en el organismo, provocando la aparición de enfermedades y anomalías patológicas que impiden el desarrollo y funcionamiento normal del ser humano (Estr et al., 2006).

1.2 Origen del estrés

El estrés ocurre cuando los cambios en el medio externo o interno son traducidos por el organismo como una amenaza a su propia homeostasis. La habilidad del organismo de ejecutar la respuesta apropiada a cambios ambientales potencialmente estresantes está estrechamente ligada entre el correcto reconocimiento del cambio ambiental y la activación de la respuesta de estrés (Stojanovich, 2010).

La mayoría de los cambios evolutivos se ven acompañados por la relación entre un entorno fuera del rango normal que experimenta una población (entorno estresante) y los cambios que se presentan en los organismos ya sean, morfológicos, fisiológicos o comportamentales (Hallgrímsson & Hall, 2005).

Para describir las reacciones adaptativas del organismo que afronta alguna demanda la cual supone una amenaza en el estado de homeostasis, Selye propone el síndrome general de adaptación, en el cual los procesos adaptativos son explicados en tres fases teóricas consecutivas las cuales son:

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

1. Fase de alarma: Se da frente a un estresor en la cual se produce un incremento generalizado de las fuerzas defensivas del organismo provocado por una estimulación del sistema nervioso que prepara al organismo para una reacción de lucha.
2. Fase de resistencia o adaptación: En la cual se continua el estímulo, ocurre un proceso de adaptación a nivel de los tejidos del organismo que deben intensificar su actividad funcional característica para que el cuerpo pueda operar en función de las exigencias del estresor.
3. Fase de agotamiento. La cual se lleva a cabo si la exposición al estresor continúa, aquí el organismo pierde la capacidad de adaptación adquirida y el ser vivo entra en fase de agotamiento, la cual se va a prolongar en tanto el estresor sea lo suficientemente severo y aplicado por el tiempo necesario (Estr et al., 2006).

La habilidad de eliminar el estresor activamente mediante la relocalización o la evitación requiere la evolución de la habilidad que detecta o anticipa los cambios estresantes y el reconocimiento o memoria de las estrategias o ajustes exitosos para evitarlos; estas estrategias se dan cuando los eventos estresantes son predecibles, prolongados y frecuentes en relación a los tiempos generacionales de los individuos (Stojanovich, 2010).

1.3 Tipos de estrés

Según el tiempo que dura la respuesta fisiológica se puede dividir en:

- Agudo: Este sucede cuando el organismo pide una respuesta intensa, pero de muy breve duración. Esto ocurre cuando el factor estresante deja de estar presente y así los mecanismos de retroalimentación garantizan que la respuesta al estrés finalice (Olf, 1999).
- Crónico: La respuesta es menor pero dura un mayor periodo de tiempo. Esto ocurre cuando el factor estresante persiste por largos periodos de tiempo y las respuestas fisiológicas que son adaptativas a corto plazo se transforman en dañinas a largo plazo (Olf, 1999).

Durante el estrés agudo, se producen respuestas fisiológicas adaptativas, como el aumento de la secreción de hormonas adrenocorticotropas, principalmente el cortisol, pero las respuestas excesivas o prolongadas, que es lo que ocurre en el estrés crónico pueden tener efectos nocivos en el eje HPA y esto puede desencadenar una serie de enfermedades psicológicas (Juruena, 2011).

La exposición prolongada a los glucocorticoides está provocando la supresión en funciones importantes del sistema inmunitario y por esto aumenta la susceptibilidad a infecciones y

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

enfermedades. También se ha relacionado a los niveles altos de glucocorticoides con la atrofia de dendritas de las neuronas del hipocampo, por esto el estrés crónico daña una parte del cerebro que es especialmente importante para el almacenamiento de recuerdos y memoria (Hill, 2009). Además el estrés crónico en fase de agotamiento genera una hipercolesterolemia crónica la cual se ha demostrado que en el animal puede ser neurotóxica para las estructuras cerebrales vulnerables como el hipocampo (Duval, et al. 2010).

Esta neurotoxicidad se manifiesta al nivel del hipocampo por una atrofia de las neuronas piramidales CA3 del cuerno de Amón y una disminución del volumen y del número de neuronas del giro dentado. Esta atrofia en el hipocampo secundaria al estrés crónico tiene una serie de consecuencias las cuales son:

1. Disminución de la neurogénesis.
2. Aumento de la excitotoxicidad (glutamato) debido a una pérdida glial.
3. Disminución de la neuroplasticidad.
4. Disminución del volumen del hipocampo relacionado con la duración e intensidad de la depresión (Duval, et al. 2010).

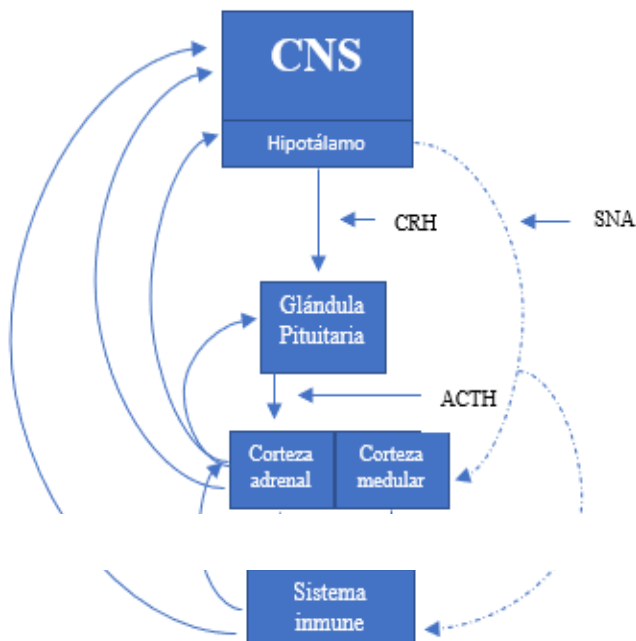
1.4 Fisiología del estrés

Las principales vías activadas por los factores de estrés son el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), constituye uno de los principales sistemas endocrinos que mantienen la homeostasis cuando el organismo se ve sometido a un reto o a un estrés (Baes et al., 2014) y el sistema nervioso autónomo (SNA) el cual es el encargado de “la respuesta de emergencia” generalmente en el estrés agudo (Ader et al., 1995).

El SNA tiene dos divisiones, el sistema nervioso parasimpático (PNS), el cual controla las funciones involuntarias en reposo, como pueden ser la digestión y el ritmo circadiano y el sistema nervioso simpático (SNS), el cual reacciona en situaciones de amenaza y provoca un aumento de los procesos involuntarios que se requieren para responder a las amenazas físicas. En respuesta a los factores de estrés, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y a la arginina vasopresina (Won & Kim, 2016). Las fibras del SNS liberan el neurotransmisor norepinefrina en varios órganos, incluida la médula suprarrenal, esto provoca la liberación de epinefrina o adrenalina en el torrente sanguíneo, aumentando las tasa cardíaca, respiratoria y el

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

flujo sanguíneo a los músculos para preparar al organismo para emitir las respuestas de lucha o huida (Kemeny, 2003). La activación del SNS estimula a su vez la liberación de CRH por parte del hipotálamo, creando un bucle de retroalimentación bidireccional positiva (Reiche et al., 2004).



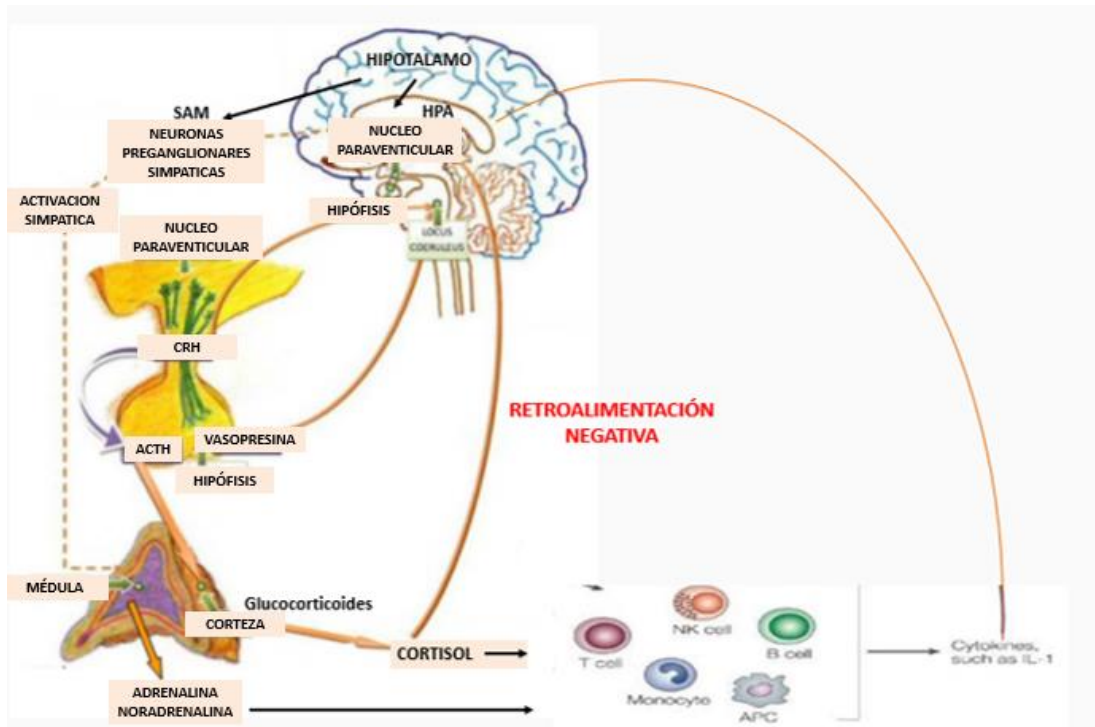
El eje HPA constituye uno de los principales sistemas endocrinos que mantienen la homeostasis cuando el organismo se ve sometido a un reto o a un estrés (Baes et al., 2014).

El sistema de estrés inicia en los núcleos de la amígdala, los cuales, al ser activados, transmiten su mensaje a las neuronas hipotalámicas a través de diferentes vías, activando al eje HPA, a través de la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en la circulación portal de la hipófisis por el núcleo paraventricular hipotalámico. En la hipófisis anterior, la CRH estimula la síntesis de proopiomelanocortina, el cual es el precursor de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) en el torrente sanguíneo (Faravelli et al., 2012). El aumento de ACTH circulante estimula la liberación de glucocorticoides de la corteza suprarrenal, siendo el cortisol el principal glucocorticoide en humanos y la corticosterona en ratas. El cortisol se encarga de llevar a cabo la retroalimentación negativa, la cual se da al interactuar los glucocorticoides con sus receptores ubicados en la hipófisis, el hipotálamo y el hipocampo (Baes et al., 2014).

Los efectos de estas hormonas sobre sus tejidos diana pueden detectarse luego de una hora del inicio de la respuesta al estrés. Estos glucocorticoides refuerzan las acciones del sistema nervioso

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

simpático y tienen efectos metabólicos adicionales que facilitan la liberación de energía hacia la sangre. Pasado el tiempo de estrés y regresando a su estado de homeostasis, las respuestas simpáticas neuronales disminuyen y los glucocorticoides presentes en la circulación general ejercen retroalimentación negativa sobre las células productoras de CRH y ACTH en el eje del Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (Hill, 2009).



Además de impactar al sistema neuroendocrino las exposiciones a experiencias estresantes pueden disminuir una serie de funciones inmunitarias, ejemplos de estas son la inhibición de diversas funciones de los linfocitos como son la capacidad de proliferar cuando se expone a una sustancia ajena al organismo y ralentizar las respuestas inmunes integradas como puede ser la coagulación o cicatrización (Ader, 2014). Algunos de estos efectos inmunológicos de los factores de estrés se deben a los potentes efectos supresores del cortisol sobre las células inmunitarias, ya que son capaces de inhibir la liberación de mensajeros como citoquinas (proteínas que se encargan de regular el funcionamiento de las células del sistema inmune) e interferones (proteínas producidas por el sistema inmune como respuesta a agentes externos)

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

haciendo que los linfocitos en circulación respondan en menor intensidad a las señales de alarma infecciosa (Dragoş & Tănăsescu, 2010). A su vez esta hormona es capaz de liberar a diferentes citocinas proinflamatorias al momento de acoplarse a sus receptores de membrana, las cuales ingresan al tejido nervioso alterando al eje HPA y al SNC lo que provoca cambios de comportamiento que se asemejan a la enfermedad y también pueden estar asociados a la depresión ya que se tienen una serie de alteraciones de aprendizaje y memoria, incapacidad de placer, reducción de la conducta social, alteraciones de sueños entre otros (Kemeny, 2003). Estos efectos pueden explicar los cambios afectivos y cognitivos asociados a las enfermedades inflamatorias y también se pueden explicar algunos síntomas depresivos asociados al estrés (Maier & Watkins, 1998).

1.5 Hipocampo

El hipocampo es una extensión de la parte temporal de la corteza cerebral. Se puede distinguir externamente como una capa de neuronas densamente empaquetadas, que se curvan en una estructura en forma de S en el borde del lóbulo temporal (Anand & Dhikav, 2012). Se encuentra por pares en el cerebro, son regiones únicas y vitales las cuales se encuentran en los hemisferios cerebrales; en el lado izquierdo, dominante, ejerce la función del aprendizaje y la memoria verbal y en el lado derecho, no dominante, ejerce la memoria no verbal (Duvernoy, 2013).

El hipocampo consta de dos partes las cuales son el hipocampo y el giro dentado, ambas partes están separadas por el surco del hipocampo y se curvan entre sí (Anand & Dhikav, 2012). Es considerado la principal estructura especializada en la memoria, sus propiedades funcionales hacen que esta estructura sea adecuada para una variedad de habilidades cognitivas y comportamientos, incluyendo la percepción de orden superior y lenguaje (Hannula & Duff, 2017). Esta región cerebral está dividida en tres regiones, CA1, CA2 y CA3 la cuales en conjunto forman el bucle trilaminar el cual es el centro de procesamiento de la memoria a largo plazo.

1.5.1 Regulación del eje HPA por medio del hipocampo

La regulación de los niveles de cortisol se lleva a cabo por medio de una retroalimentación del eje HPA, cuando este eje se encuentra activado de una manera anormal se da un aumento de los niveles

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

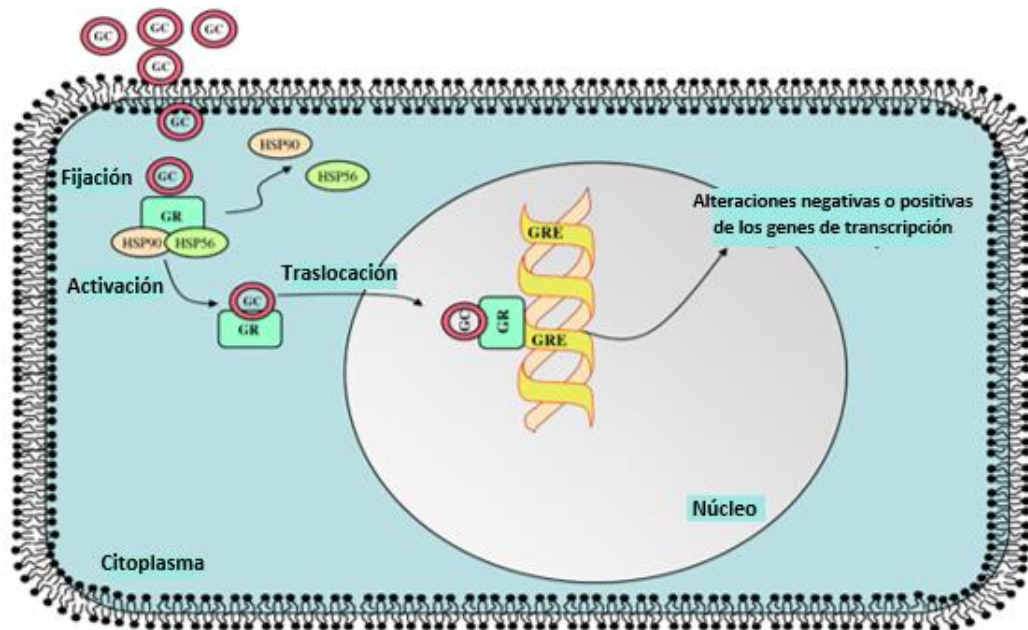
circulantes de cortisol, generando diversas enfermedades entre ellas la depresión (Mario F. Juruena, 2014). Esta regulación se lleva a cabo a través de dos subtipos de receptores intracelulares que se encuentran en el hipocampo, denominados: receptores de mineralocorticoides (MR) y receptores glucocorticoides (GR) (Kloet et al., 1998). El receptor de tipo I (MR) se encuentra limitado y con una densidad relativamente alta en el hipocampo y en sitios sensoriales y motores fuera del hipotálamo, mientras que los receptores de tipo II (GR) se encuentran de una manera más amplia, estando presente en el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo y en cuerpos celulares catecolaminérgicos del tronco cerebral (Arriza et al., 1988).

Estos receptores se localizan en el citoplasma y en respuesta a la unión del ligando, en este caso las hormonas esteroideas, se translocan en el núcleo donde regulan la expresión de ciertos genes al unirse a elementos específicos de respuesta hormonal (HRE) en sus regiones reguladores (Dallman et al., 1987).

Los receptores de tipo I participan en el control de la expresión basal de CRF y AVP y en el control de la secreción máxima de ACTH y los receptores de tipo II participan en el control de la secreción de ACTH inducida por el estrés (Baes et al., 2014). El mecanismo de acción de los receptores se basa en el modelo de “tráfico nucleocitoplásmico” (como se muestra en la Figura 3), en donde el GR en su forma “no activada” se encuentra en el citoplasma asociado con un complejo multiproteico de proteínas chaperonas (Spencer et al., 1998), conformado por: dos moléculas de hsp 90, una hsp 70, una hsp 56 y una inmunofilina (Kloet et al., 1998). Tras unirse a los esteroides, el GR sufre un cambio en su conformación, se disocia del complejo de las proteínas HSP y se traslada del citoplasma al núcleo, donde se une a los elementos de respuesta a los glucocorticoides (GRE) en el ADN o interactúan con otros factores de transcripción. Los elementos de respuesta pueden conferir una regulación positiva o negativa a los genes a los que se unen (Guiochon-Mantel et al., 1996). EL GR activado no puede volver a unirse al ligando ya que requiere volver a asociarse con el complejo de las proteínas HSP para mantener al receptor en un estado conformacional receptivo a la hormona. Los receptores GR tienen una baja afinidad, pero una alta capacidad para el cortisol por esto a concentraciones basales de cortisol, la retroalimentación negativa esta mediada principalmente por el MR en hipocampo, mientras que bajo condiciones de estrés y por lo tanto altas concentraciones de cortisol, el receptor GR en el hipocampo se encargan de llevar a cabo la retroalimentación (Mario F. Juruena, 2014). La activación del GR es necesaria para la regulación

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

por retroalimentación del HPA cuando los niveles de glucocorticoides son elevados, pero el MR también desempeña un papel importante al modular la regulación dependiente del GR (Spencer et al., 1998). Por esto el equilibrio de estos efectos mediados por el MR y el GR en el sistema del estrés son muy importantes para el correcto funcionamiento del eje HPA (Kloet et al., 1998).



1.6 Estrés postnatal

Las primeras dos semanas de vida en los roedores son esenciales para el desarrollo de la mayor parte de los sistemas que subyacen a la expresión de respuestas neuroendocrinas, emocionales y cognitivas. A este periodo se le conoce como periodo de hiporrespuesta al estrés (SHRP) el cual es un periodo de intenso cambio celular en donde la actividad del eje HPA muestra un bajo perfil hacia factores estresantes (O'Mahony et al., 2011), minimizando la exposición del cerebro a corticosteroides, teniendo niveles bajos de ACTH (Schmidt et al., 2003). Este periodo de hiposensibilidad en las ratas se mantiene gracias a componentes específicos del cuidado materno, como son el lamido, acicalamiento y la entrega de leche en el intestino (Gunnar & Quevedo, 2007), cabe destacar que para él bebe mamífero, la madre es la fuente y el modulador más importante de la estimulación (M. A. Hofer, 1984). Durante el periodo postnatal temprano, las ratas dependen de la madre para obtener calor, alimento y excreción de residuos corporales (O'Mahony et al., 2011), además de ser importante

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

para la correcta nutrición de la cría, la cual necesita la estimulación táctil para mantener los niveles basales de actividad de las enzimas de crecimiento como son la ornitina descarboxilasa (ODC) así como los niveles de la hormona de crecimiento (GH) (Kuhn et al., 1990) y lo que es más importante se han estudiado que estos cambios en la relación madre-hijo pueden estar afectando a la función y la estructura neuroquímica del cerebro (Cirulli et al., 2003).

La separación y el aislamiento de la madre durante el SHRP desde los días postnatales 3 al 14 activa al eje HPA lo que estará provocando un hipercorticosteronemia. En los modelos de roedores, este aumento de corticosterona se encuentra perjudicando a los mecanismos de afrontamiento del estrés en la rata adulta (Mishra et al., 2019). La separación maternal se considera un inductor de estrés al cual se le conoce como estrés postnatal (Delgado, 2017). Cuando las crías son sometidas a este estresor provoca un descenso de la temperatura corporal y el aumento de la emisión de vocalizaciones ultrasónicas, las cuales van desde 30 – 150 kHz lo que quiere decir que son indetectables al oído humano, se tratan de llamadas de socorro para estimular el comportamiento y búsqueda de la mamá (Myron A. Hofer & Shair, 1978), las crías al ser devueltas al nido aumentan los cuidados maternos, es decir los lamidos y la lactancia lo que da lugar a una alteración aguda en lugar de crónica de la búsqueda del cuidado materno por parte de las crías (Pryce et al., 2001). Tanto las manipulaciones que alteran el lamido y el acicalamiento como las variaciones normales del cuidado materno producen alteraciones a largo plazo en el eje HPA y en el comportamiento emocional (Gunnar & Quevedo, 2007). Además, existe una gran cantidad de evidencias sobre el efecto negativo del estrés crónico sobre la neurogénesis y sobre la plasticidad sináptica. Mas específicamente al someter a las crías a un estado de estrés postnatal estos presentan en su adultez un sistema HPA disfuncional, manifestando cambios emocionales debido al mal funcionamiento del sistema de retroalimentación de los glucocorticoides (McEwen,2012).

La relación maternal y sus efectos sobre el desarrollo de las crías ha sido estudiada mediante el uso de protocolos animales de manipulación postnatal (Rodríguez & Gómez, 2012). Se ha demostrado que las alteraciones en la experiencia de las ratas durante el periodo postnatal temprano pueden tener consecuencias duraderas en la capacidad de respuesta al estrés (O'Mahony et al., 2011). Estos estudios se han realizado utilizando el modelo de separación maternal (SM), el cual se basa en el hecho de que las manipulaciones de la relación madre-hijo en los primeros años de vida tienen

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

consecuencias a largo plazo en las respuestas neuroendocrinas y de comportamiento de la cría (Cirulli et al., 2003). Además de que estos animales sometidos a este estrés temprano tienen una tendencia a desarrollar diferentes enfermedades en la vida adulta, inclinándose más hacia los trastornos de ansiedad y depresión (O'Mahony et al., 2011).

En estos modelos se altera el tiempo de separación de las crías con sus madres y se evalúa como esta separación afecta los futuros desempeños en pruebas de comportamiento y funcionamiento neuroendocrino. Estos estudios han aportado grandes conocimientos sobre las consecuencias neurobiológicas y conductuales de las experiencias de la vida temprana (Rodríguez & Gómez, 2012).

En los estudios de separación maternal, la duración de la separación se utiliza para simular diferentes entornos ambientales; cuando se trata de simular un entorno benéfico, relacionado con efectos positivos en el comportamiento y protección contra influencias negativas, las crías se someten a separaciones por periodos de tiempo más cortas, es decir, de minutos en lugar de horas (Nylander & Roman, 2013). Por el contrario, cuando se trata de simular un entorno de riesgo, relacionado a condiciones adversas que provocaran consecuencias negativas se utilizan periodos más largos de separación maternal. Afectando las interacciones sociales y sensoriales tempranas entre la madre y la cría que son vitales para el desarrollo normal de las neuronas y el comportamiento (Nylander & Roman, 2013). Este procedimiento fue estudiado por Plotsky y Meaney (1993) el cual se basa en separar a las crías de sus madres durante 180 minutos al día desde los días 2 al 14 de su vida, haciendo alusión a lo que suceda en condiciones seminaturales, cuando las hembras subordinadas deben situar sus nidos a cierta distancia de las fuentes de alimento y agua, lo que ocasiona periodos prolongados de separación de sus crías que van desde 2-3h (P.M. & M.J., 1993).

Al evaluar los efectos en las crías sometidas a SM sobre la reactividad al estrés fueron completamente opuestos a los de la manipulación materna de pocos min al día. Al llegar a la edad adulta estos animales sometidos al modelo de SM mostraron un aumento significativo de las respuestas hipofisarias y suprarrenales al estrés agudo (P.M. & M.J., 1993). Muchos estudios demuestran que la SM prolongada se considera un entorno de riesgo que se asocia con el estrés en los primeros años de vida y que tendrá consecuencias negativas más adelante (Nylander & Roman, 2013). La SM también provocó una disminución de la unión de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo,

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

hipotálamo y el córtex frontal lo que provocó un aumento en la retroalimentación negativa lo que va a provocar una mayor reactividad al estrés (Weaver et al., 2004). Además de estos resultados se tienen estudios los cuales sugieren que una exposición prolongada al estrés en los primeros meses de vida puede provocar un aumento en la ansiedad, reacciones de pánico, depresión y alucinaciones en la vida adulta (Mishra et al., 2019).

1.7 Estrés vital temprano en humanos

Se ha demostrado que las experiencias de estrés en los primeros años de vida están asociadas a un gran número de trastornos psicológicos, especialmente la depresión y la ansiedad (Green et al., 2010), a estas experiencias se les denomina estrés vital temprano (ELS) el cual incluye las diferentes experiencias traumáticas que se producen en la infancia y que influyen negativamente en el desarrollo infantil en todos los aspectos de su vida, es decir, conductual, emocional, social y cognitivo (Juruena et al., 2020). Ejemplos de estas experiencias pueden ser la pérdida de los padres, enfermedad infantil, violencia familiar, privación de los alimentos, ropa, refugio y amor. El maltrato infantil se trata de un problema social de primer orden, muy complejo que además de traer consecuencias psicológicas puede afectar gravemente la salud mental del niño hasta la edad adulta (Martins et al., 2011).

Los estudios sobre el maltrato infantil y efectos que se producen a lo largo de la vida se asocian a una serie de problemas de conducta en los niños y adolescentes, los cuales pueden incluir comportamientos internalizantes, como son la ansiedad, la depresión y la inhibición y los comportamientos externalizantes los cuales se pueden reflejar por la agresión, delincuencia y el aumento del nivel de actividad (Murray et al., 2014). El maltrato y la negligencia infantil son agentes de alteración del neurodesarrollo, los cuales dependen del momento en que se produzcan para causar graves “cicatrices” neurológicas en algunas estructuras, las cuales pueden hacer más vulnerables a algunos tipos de psicopatologías específicas como son el trastorno de ansiedad generalizada (TAG), el trastorno de pánico y algunas fobias (Carr et al., 2013). Se ha demostrado que, durante la primera infancia y la adolescencia, se están formando importantes estructuras cerebrales, por lo que las consecuencias negativas que ocasionen los eventos traumáticos son duraderas y pueden permanecer durante toda la vida (Juruena et al., 2020). Uno de los sistemas clave de respuesta al estrés es el eje HPA, el cual constituye uno de los principales sistemas endocrinos que se encargan de mantener la homeostasis del organismo cuando se encuentra frente a factores estresantes (Nemeroff, 1984). El desarrollo del eje HPA y de las regiones cerebrales implicadas en su regulación comienza en la etapa prenatal y continúa después del nacimiento, en esta etapa este eje encuentra muy sensible a los

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

factores de estrés, de hecho, las respuestas al estrés del HPA se observan a partir de las 18-20 semanas de gestación (Gunnar & Quevedo, 2007). La ELS inducida por estresores prenatales, la separación maternal o el modelo de anidación limitada, los cuales tienen en común un cuidado materno fragmentado, da como resultado una hiperreactividad del eje HPA en la edad adulta, la cual se encuentra relacionada con el aumento de la señalización de la hormona ACTH y con el deterioro de la retroalimentación negativa mediada por el receptor de glucocorticoides (Van Bodegom et al., 2017). De este modo la ELS es capaz de “programar” las respuestas neuroendocrinas, neuronales y conductuales de un organismo al estrés (Van Bodegom et al., 2017). Se ha observado que los niños que han sufrido separaciones permanentes o de larga duración de sus padres, muestran un eje HPA hiperactivo con un aumento de las concentraciones de cortisol salival (Faravelli et al., 2012). Además la ELS durante las etapas críticas de la maduración del cerebro puede interrumpir procesos del desarrollo específicos, como son la alteración a los neurotransmisores, la transcripción de genes o la diferenciación neuronal, lo que traerá resultados aberrantes a la función del circuito neuronal a lo largo de la vida (Chen & Baram, 2016).

1.8 Relación entre estrés postnatal sobre estrés oxidativo

El estrés postnatal puede ser un periodo persistente en el cual la activación del eje HPA es mantenida en el tiempo y se le considera un fenómeno crónico (Zárate et al., 2014). Cuando la cría se encuentra separado de la madre y no recibe los cuidados maternos necesarios, como son el acicalamiento y contacto corporal, la cría experimenta un aumento en la metilación del gen del receptor de glucocorticoides GR en el hipocampo (Gunnar & Quevedo, 2007), por lo tanto habrá una disminución en la expresión de estos receptores, los cuales también se encuentran regulando la actividad de la microglía, cuando estos receptores se ven alterados, la actividad de la microglía aumenta, provocando un estado de excitotoxicidad neural por glutamato, debido a la apertura descontrolada de los canales NMDA, aumentando el flujo de entrada de Ca^{+} (Mogi et al., 2011). Este estado de excitotoxicidad neuronal, estará aumentando la actividad de la óxido nítrico sintasa (ONS) y por lo tanto aumentará la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) hasta producir un estado de estrés oxidativo (Dragoș & Tănăsescu, 2010).

1.9 Radicales libres

Un radical libre, también conocido como especie reactiva de oxígeno (ERO) es una molécula que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado en la órbita final, teniendo como consecuencia una configuración altamente inestable (Mayor Oxilia, 2010).

Existen diferentes especies reactivas de oxígeno las cuales son:

- Anión superóxido (O_2^-): Es producido por la cadena respiratoria mitocondrial, es altamente reactivo y citotóxico formado por la reducción parcial del O_2 en dos sitios de la cadena respiratoria (Hernández-Saavedra, Daniel; McCord, 2008).
- Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2): Como tal no es un radical libre, pero es una forma reactiva de gran importancia, ya que posee la capacidad de generar al radical hidroxilo cuando se encuentra en presencia de metales como el hierro (Corrales MSc & Muñoz Ariza, 2012).
- Radical Hidroxilo (HO): Es conocido por ser el más reactivo. Este al unirse con las proteínas puede causar modificaciones en casi todos los aminoácidos, formando enlaces covalentes entre ellos e induciendo a la fragmentación de la cadena polipeptídica, produciendo una pérdida de la función o una mayor susceptibilidad a las enzimas proteolíticas (González-torres & Ortiz-muñiz, 2000).
- Oxígeno Sínglete (O_2^1): Este radical libre es producido por diferentes procesos como son la fagocitosis, reacciones catalizadas por peroxidasas, entre otras. Se caracteriza por qué en su estado molecular no tiene restricciones en la transferencia de electrones esto le da la característica de ser altamente reactivo.

La producción de radicales libres en el organismo es un fenómeno que ocurre en situaciones normales, pero al haber un desequilibrio entre su producción y eliminación es lo que provoca la aparición de una serie de patogenicidades (Paredes Salido & Roca Fernández, 2002).

1.10 Estrés oxidativo

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero este a su vez es la principal fuente de radicales libres, que si no se neutralizan de manera adecuada puede tener efectos adversos sobre la función celular (Mayor Oxilia, 2010).

El termino estrés oxidativo hace referencia a condiciones en las que las células se encuentran expuestas a niveles excesivo ya sea de oxígeno molecular o de derivados químicos del oxígeno a los que se le conocen como especies reactivas de oxígeno (Zalba et al., 2003). En términos químicos el estrés oxidativo es un aumento negativo en la reducción del potencial celular o una disminución en la capacidad reductora de los pares redox como el glutatión. Los efectos de este tipo de estrés dependen de la magnitud de esos cambios es decir de la capacidad que tiene la célula de superar estas pequeñas perturbaciones para así poder recuperar su estado original; una exposición a estrés oxidativo severa puede provocar la muerte celular, una exposición moderada a la oxidación puede desencadenar apoptosis, por el contrario, si esta exposición es muy intensa puede provocar necrosis celular (Paredes Salido & Roca Fernández, 2002).

Durante la última década se ha puesto puntual interés en la investigación sobre el estrés oxidativo, del cual se piensa que contribuye al desarrollo de una amplia gama de enfermedades, pero aún no está claro, si los oxidantes las desencadenen o si se producen como consecuencia de estas enfermedades y así provocan los síntomas característicos de cada enfermedad (Paredes Salido & Roca Fernández, 2002). Durante la respuesta al estrés agudo, los procesos fisiológicos van a desviar la energía movilizada de las reservas entre los distintos órganos del cuerpo para que de esta manera el cuerpo esté preparado para acontecimientos futuros. Sin embargo, esto no sucede así en el estrés crónico ya que los niveles elevados de glucocorticoides liberados durante este tipo de estrés pueden llevar a un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) que pueden inducir directamente la disfunción mitocondrial. Diversos factores de estrés crónico pueden perturbar la homeostasis redox del organismo, causando un estrés oxidativo, el cual tiene como resultado la activación de las vías de señalización intracelular implicadas en los trastornos psiquiátricos (Filipović et al., 2017).

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

Las alteraciones inducidas por el estrés en la actividad del eje del HPA y su relación con el estrés oxidativo pueden ser causadas por el aumento de los niveles de GC (McIntosh y otros, 1998a, b). Dado que las CG cumplen sus funciones a través de los receptores de glucocorticoides (GR), la desregulación (hiper o hipoactividad) del eje HPA inducida por el estrés crónico puede ser el resultado de la alteración del control de la retroalimentación negativa en los centros superiores del eje, es decir, el hipocampo y la corteza prefrontal (Filipović et al., 2017).

Las EROs son altamente reactivas y pueden estar atacando a las macromoléculas como el ADN, proteínas y lípidos. Cuando estas EROs se encuentran reaccionando particularmente con los lípidos se lleva a cabo la reacción conocida como peroxidación lipídica, en la cual los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), principalmente el ácido araquidónico se peroxida para formar malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2nonenal (HNE) y otros productos de reacción como los F₂-isoprostanos, siendo estos compuestos ampliamente aceptables para medir el estrés oxidativo en el organismo (Tsikas, 2017).

El MDA es un compuesto dicarbonilo: CH-ácido y un ácido protónico en solución acuosa, con un valor pKa de 4,46. Debido a sus funcionalidades carbonílicas, el MDA es químicamente reactivo, además se polimeriza fácilmente y presenta reacciones con centros nucleófilos de varias biomoléculas como son el ADN y los aminoácidos de las proteínas. Debido a esto el MDA no solo se considera un marcador de estrés oxidativo, sino también se consideran compuestos biológicamente activos de importancia fisiológica y patológica (Esterbauer, 1996).

Para realizar el análisis químico del MDA se lleva a cabo la medición del ácido tiobarbitúrico (TBARS) para la evaluación de la peroxidación lipídica mediante espectrofotometría. Bajo condiciones ácidas y a temperaturas elevadas, una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de TBA para formar un derivado de color rojo, el cual se mide a 532nm de luz visible; a este compuesto coloreado se le conoce como TBA-MDA (Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, 1990).

1.11 Sistema antioxidante

La evolución de los organismos los llevo a crear sistemas de defensa antioxidantes, para poder neutralizar a las especies reactivas de cualquier elemento. El termino antioxidante se le atribuye a cualquier sustancia que retarda o previene la oxidación de un sustrato oxidable, que puede ser de cualquier naturaleza, lípido, proteína, DNA, etc.

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

Estos sistemas de defensa antioxidantes se encuentran formados por elementos tanto enzimáticos como no enzimáticos, que actúan en conjunto para proteger a la célula de los EROs. El componente enzimático es el encargado de defender en primera línea al organismo, esto lo hace al evitar el acúmulo de EROs principalmente anión superóxido (HO^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2), canalizando la transferencia de electrones de un sustrato hacia los radicales libres (Corrales MSc & Muñoz Ariza, 2012).

El balance de oxidación y reducción (redox) es de vital importancia para el retorno de la homeostasis celular y este es realizado por enzimas antioxidantes como son: glutatión peroxidasa (GPX), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) entre otras (Hernández-Saavedra, Daniel; McCord, 2008).

- Superóxido dismutasa (SOD): Son un grupo de metaloenzimas que se encuentran en organismo aeróbicos y algunas veces en anaeróbicos obligados, estas enzimas son esenciales para la defensa contra la toxicidad causada por los EROs. Su principal función es destruir a los radicales superóxidos libres y así contribuir al mantenimiento del balance fisiológico entre oxidantes y antioxidantes. Se conocen tres formas de SOD dependiendo del metal que utilicen como cofactor: CuZn-SOD citosólica y extracelular presentes en células eucarióticas, Mn-SOD mitocondrial en células eucarióticas y Fe-SOD generalmente presentes en células procariontes. Todas estas enzimas catalizan la reacción de transformación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno (Salim, 2017).
- Catalasa: Es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza, se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos. Es una metaloproteína tetramérica que se encarga de la destrucción del H_2O_2 generado por el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción, pero por afinidad por el sustrato (Salim, 2017).
- Glutatión peroxidasa (GPX): Es una enzima dependiente de Selenio (Se) que cataliza la reducción de peróxido de hidrogeno, utilizando como agente reductor al glutatión reducido (GSH). Esta enzima es de gran importancia ya que se encuentra localizado en todos los órganos y tejidos, como parte del sistema antioxidante del glutatión, por lo que está

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades. La catalasa (CAT), al igual que la GPX, se encarga de eliminar el H_2O_2 y su localización celular es similar, pero sus mecanismos de acción son diferentes, ya que CAT está llevando a cabo su actividad cuando hay un aumento en la cantidad de H_2O_2 presente en las células, en cambio GPX actúa cuando el H_2O_2 se producen en menores cantidades (Fink & Scandalios, 2002).

- Glutación reductasa (GR): Esta enzima se encuentra formando parte de un sistema antioxidante (GPX/GSH) y a su vez la enzima CAT se encuentra formando otro complejo (SOD/CAT) los cuales no actúan a la par, ya que la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 , por su parte la GPX actúa en presencia de concentraciones bajas los que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas (Margis et al., 2008).
- Glutación transferasa (GST): La familia de estas enzimas forma parte de uno de los grupos más grandes de las enzimas detoxificantes altamente conservadas e implicadas en el metabolismo de muchos xenobióticos. Posee un alto rango de sustratos que permite que la enzima se conjugue con la GSH para poder proteger a la célula, generando compuestos menos reactivos y más solubles, que pueden ser fácilmente eliminados de la célula a través de transportadores específicos de membrana (Julieta et al., 2007).

Además de las enzimas antioxidantes existen otras pruebas que miden el efecto antioxidante combinado de las defensas no enzimáticas de muestras biológicas; estas pruebas son importantes ya que proporcionan un índice de la capacidad de resistencia al daño oxidativo. Los antioxidantes no enzimáticos son reductores, es decir inactivan a los oxidantes mediante reacciones redox en las que una ERO se reduce a expensas de la oxidación de la otra, debido a esto el poder antioxidante no enzimático puede denominarse análogamente como capacidad reductora. (Ben Ahmed et al., 2016).

Una prueba simple y rápida que mide esta capacidad reductora férrica del plasma es el ensayo de FRAP el cual se encarga de medir el poder antioxidante, este ensayo se basa en la reducción del complejo Fe (III) de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) por antioxidantes para formar un compuesto coloreado inducido por la aparición del quelato de Fe (II) -TPTZ, el cual se mide comparando el cambio de absorbancia a 593 nm (Marques et al., 2014).

2 ANTECEDENTES

El entorno postnatal ha sido de gran relevancia y es objeto de gran cantidad de estudios debido a la amplia literatura que indica que las experiencias durante la vida temprana suele ser la causa de gran diversidad de alteraciones. A lo largo de los años se ha visto que las variaciones en este entorno temprano tienen diferentes efectos en el desarrollo cerebral de las crías, como pueden ser: las variaciones hormonales en madres gestantes y lactantes, la manipulación de las camadas o las diferentes formas de separación materna; estos efectos inducen modificaciones que se presentan en la adolescencia y la edad adulta (Delgado, 2017).

Existen evidencias epidemiológicas en las cuales se asocia al estrés postnatal con el desarrollo de enfermedades mentales tales como trastornos de ansiedad, depresión, abuso de sustancias y trastornos de comportamiento (Riveros Barrera & Dueñas, 2014). Las fisiopatologías de estas enfermedades se asocian fuertemente al estrés oxidativo, el cual se caracteriza por la producción excesiva de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (EROs) en el organismo sobrepasando los niveles de defensa de los antioxidantes fisiológicos (Tapia-Saavedra, 2005).

Según los estudios de Liu & col., 1997, Meaney & col., 1996, realizados con ratas, observaron que las crías que no experimentaron el cuidado materno a través del acicalamiento como lameduras y contacto físico son adultos más temerosos, más reactivos al estrés y presentan alteraciones de la memoria y aprendizaje hasta la edad adulta. En cambio, las crías que si tuvieron los cuidados maternos postnatales como son el acicalamiento, desarrollaron una mejor regulación del eje del hipotálamo-pituitaria-adrenal la cual proporciona una respuesta más equilibrada al estrés, con más bajos niveles de cortisol y una normalización más rápida a valores basales.

Se han hecho diferentes estudios en ratas adultas, en donde se evalúa la actividad de las enzimas antioxidantes fisiológicas en distintos modelos como puede ser deprivación maternal, aislamiento social, modelo de estrés leve crónico para evaluar la depresión, entre otros. Según lo reportado por Djordjevic et al., 2010 se expusieron diferentes grupos de ratas macho Wistar a un aislamiento psicosocial crónico en donde se promueve el desequilibrio oxidativo en el SNC, al atacar al sistema de defensa antioxidante como resultado obtuvieron que las enzimas SOD y CAT no se veían afectas por este modelo de aislamiento social, en cambio la actividad de la GPX si se veía disminuida y

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

comprometida la actividad de GR, lo que puede cambiar el balance redox hacia la acumulación de H_2O_2 y radicales OH, y biomoléculas peroxidadas que podrían alterar aún más la actividad de las enzimas sensibles al H_2O_2 . Paralelamente a la disminución de la actividad de GPX, el aumento de la expresión de la proteína GLR podría interpretarse como un intento de restablecer el equilibrio redox dentro de la célula aumentando la reserva de GSH, y por mecanismos distintos de los que involucran a GPX. Sin embargo, la actividad de la enzima GLR no pudo aumentar todo su potencial. Esta discrepancia entre la expresión y la actividad de la GLR también podría tomarse como un indicador del estrés oxidativo subyacente (Djordjevic, 2010).

Según lo reportado por Lucca et al., 2009 utilizaron el modelo de estrés leve crónico en ratas donde evaluó las variaciones actividad de las enzimas SOD Y CAT en el hipocampo, la corteza prefrontal y el córtex, como resultado obtuvieron un aumento de la CAT en el hipocampo, cerebelo, estriado y corteza y una disminución de la actividad de SOD en estas mismas regiones del cerebro de ratas estresadas. Con estos resultados se crea el paradigma de que el estrés leve crónico induce un aumento del daño oxidativo y alteraciones en la actividad de la actividad de la SOD que puede conducir a un aumento del daño oxidativo, contribuyendo, al menos en parte, a las enfermedades relacionadas con el estrés, como la depresión (Lucca et al., 2009).

Según lo reportado por Uysal et al., 2005 examinaron los efectos de la deprivación maternal en el estrés oxidativo en el hipocampo, la corteza prefrontal y las regiones del estriado del cerebro en ratas lactantes, aquí se obtuvieron resultados muy interesantes ya que se evaluaron durante el periodo de hipersensibilidad al estrés (SHRP) y al término de este periodo. Los resultados arrojaron que durante en SHRP las actividades de las enzimas antioxidantes se veían aumentadas en cambio al finalizar este periodo las actividades de estas enzimas se veían disminuidas. Haciendo énfasis que la actividad de la SOD aumento en las tres regiones del cerebro, pero hubo una disminución en la actividad de GPX en las regiones del hipocampo y el estriado de las crías en el día 20. Se concluyo que el aumento de la actividad de SOD puede ocurrir para convertir los niveles elevados de radicales superóxidos. Sin un aumento en la actividad SOD sin un aumento en la actividad de GPX puede ser perjudicial. El SOD convierte los radicales de superóxido en peróxido de hidrógeno. Un aumento en la actividad de SOD resulta en niveles elevados de peróxido de hidrógeno. En ausencia de

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

cantidades iguales de GPX para desintoxicar el peróxido de hidrógeno generando radicales de hidroxilo con consecuencias muy perjudiciales (Uysal et al., 2005).

El modelo de deprivación maternal es el que más se asemeja al modelo de separación maternal que se utilizara en este trabajo ya que este también fue evaluado en crías de ratas. Sin embargo, tiene diferencias muy significativas tanto en consecuencias como en el diseño experimental, que son que en este modelo de deprivación maternal es utilizado para generar un estado de trauma en las crías, sometiéndolas a una separación maternal durante 24h previo a la eutanasia.

3 JUSTIFICACIÓN

La importancia de la separación maternal de la cría es evidente por su impacto a largo plazo en muchas funciones biológicas y de comportamiento las cuales van desde respuestas endocrinas e inmunes del estrés hasta déficits cognitivos en la edad adulta. (Mercedes, 2015). La falta de interacción madre-hijo, produce un estrés psicológico el cual conduce a experiencias tempranas adversas que afectan la corteza prefrontal, se altera el eje HPA ocasionando una sobreproducción de cortisol el cual se puede unir a los receptores de las células inmunes, las cuales liberan citocinas proinflamatorias ocasionando una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, produciendo un estado de estrés oxidativo, el cual contribuye al inicio de algunos trastornos psiquiátricos (Riveros Barrera & Dueñas, 2014).

El aumento del estrés oxidativo y el envejecimiento celular acelerado pueden ser vías subyacentes que contribuyen al deterioro de la salud física en los individuos con depresión. Siendo esta enfermedad una de las principales causas de morbilidad en todo el mundo, teniendo una alta prevalencia y un profundo impacto en el funcionamiento y la calidad de vida (Benmhammed et al., 2019).

La depresión está ligada también a otros trastornos como la ansiedad o el consumo de sustancias adictivas y es la principal enfermedad afectiva entre pacientes con enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer o la diabetes. El número de personas con depresión o ansiedad ha aumentado en cerca de un 50 por ciento, de 416 millones a 615 millones (Medina et al., 2015).

En México, estos padecimientos ocupan el cuarto lugar en complicaciones médicas, y la depresión es uno de los más frecuentes. El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) señala que 29.9 por ciento de los habitantes mayores de 14 años sufren algún nivel de depresión ocasional, mientras que 12.4 por ciento los experimenta de manera frecuente. Estas cifras son aún más alarmantes, ya que la posiciones escalan hasta convertirse en la primera razón para el deterioro en la calidad de vida entre mujeres y la novena para los hombres (INEGI, 2015).

El trastorno de depresión, generalmente comienza en edades tempranas, reduce sustancialmente el funcionamiento de las personas, es un padecimiento, recurrente y tiene importantes costos económicos y sociales (Berenzon et al., 2013). Aunado a esto las personas que padecen depresión

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

corren un mayor riesgo de padecer enfermedades que suelen estar asociadas al aumento de la edad, como las enfermedades cardiovasculares, la obesidad, la diabetes, el cáncer y los trastornos cognitivos, y tienen una mayor tasa de mortalidad por todas las causas (Kaufman et al., 2000).

El estudio de los efectos comportamentales, fisiológicos y neuro bioquímicos que esta situación de estrés causa al ser humano es restringido. Por lo tanto, el uso de modelos experimentales que simulen situaciones reales de nuestro entorno como la separación maternal en el estado postnatal de la cría es fundamental para tener un panorama más completo acerca de las diferentes patogenicidades producidas por esta afectación y como se encuentra la actividad de las enzimas antioxidantes fisiológicas contrarrestando el efecto de dicho estrés (Riveros Barrera & Dueñas, 2014).

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han reportado varios estudios en donde se demuestra que la actividad de las enzimas antioxidantes fisiológicas se ven disminuidas en el hipocampo de ratas sometidas a estrés oxidativo causado por estrés crónico y esto aumenta el riesgo de padecer futuras enfermedades psiquiátricas. Sin embargo, se tiene poca información sobre las variaciones de las actividades enzimáticas y parámetros oxidativos en el hipocampo de ratas que están pasando por un periodo de estrés postnatal y la poca información que se encuentra en la bibliografía solamente reportan resultados en condiciones basales. En este proyecto se evaluarán las actividades de las enzimas antioxidantes y parámetros oxidativos, tanto en grupos en condiciones basales como en condiciones de estrés. Además, cabe resaltar que no hay estudios donde se hayan estudiado simultáneamente el total de enzimas antioxidantes y parámetros del estrés oxidativo que se abordan en el presente proyecto.

5 HIPOTESIS

Las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX, GST Y GR y el parámetro de estrés oxidativo (FRAP) disminuyen en el hipocampo de ratas al ser sometidas a estrés postnatal y la actividad de MDA aumenta en estas mismas condiciones.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar las actividades de enzimas antioxidantes y parámetros de estrés oxidativo en hipocampo de crías de ratas en presencia de estrés agudo y crónico postnatal.

6.2 Objetivos específicos

De las actividades de SOD, CAT, GPX, GSH, GST FRAP y MDA en hipocampo de ratas macho y hembras:

1. Evaluar el efecto del tratamiento: grupos controles (CB-CE) contra separación maternal (SMB-SME).
2. Evaluar el efecto de la condición de eutanasia: control (CB-SMB) contra estrés (CE-SME).
3. Evaluar los resultados en base al sexo.

7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

7.1 Materiales

- Ratas Sprague-Dawley: Los animales que se utilizaron en el presente estudio fueron crías de ratas macho y hembras de la cepa Sprague-Dawley, durante los primeros 15 días posnatales (PN 15), contando el día de nacimiento como el día 0. Cada camada se ajustó a 10 crías, constituidas en su mayoría de 5 machos y 5 hembras mantenidas bajo ciclo luz – oscuridad (12:12), temperatura (22-26°C) y humedad 50 – 60%.
- Reactivos con grado analítico

7.2 Métodos

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062 ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio 2011 del Consejo Nacional de Investigación, Washington, DC. Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

Grupo control: El cual está formado por Control basal (2 grupos) y Control estrés (2 grupos)

- Control basal: Las ratas que pertenecieron a este grupo nunca fueron separadas de sus madres es decir siempre estuvieron dentro del nido hasta el día del sacrificio (PN 15).
- Control estrés: Las ratas que pertenecieron a este grupo estuvieron dentro del nido hasta el día PN 15, este último día fueron sometidas a un tipo de estresor (SM) durante 3h antes del sacrificio.

*Cada grupo estuvo conformado por machos y hembras, preferentemente en cantidades iguales.

Dando como resultado una n = mínima de 8 y máxima de 10.

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

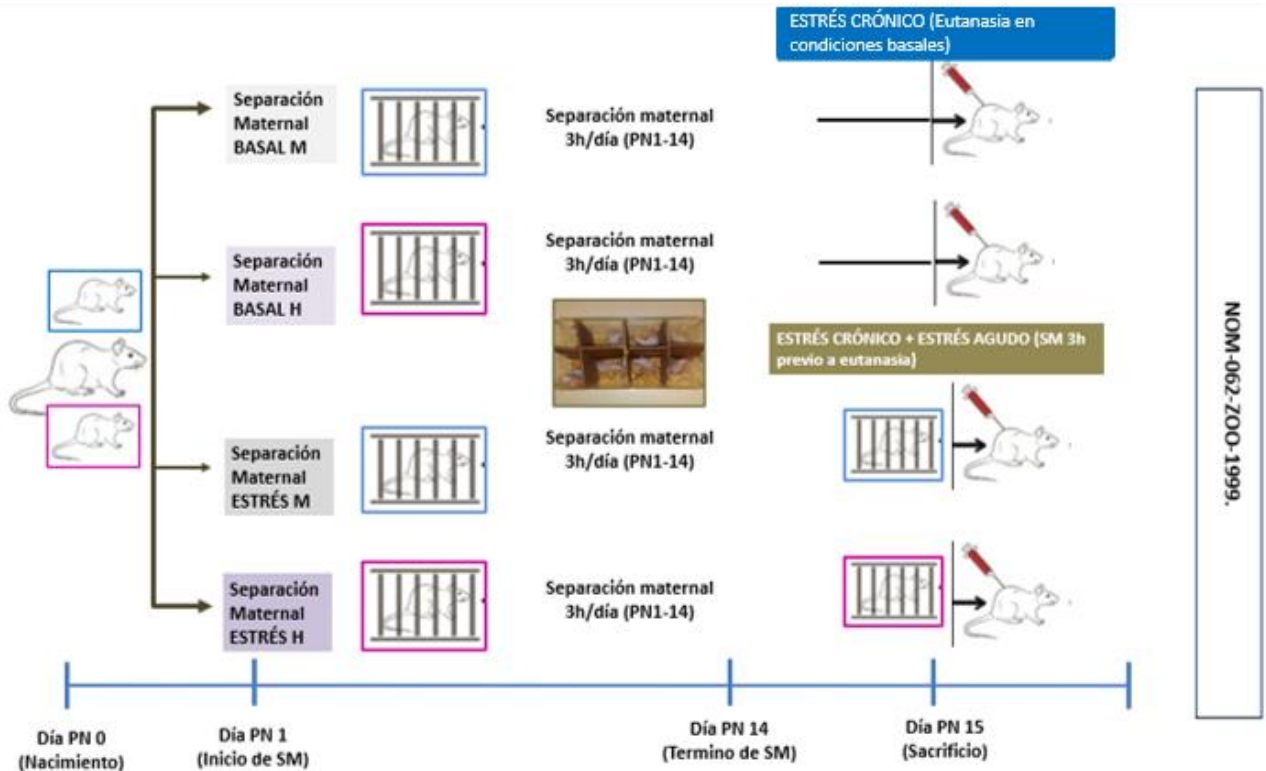


Figura 1. Esquema de metodología. Grupos Control en condiciones basales y control en condiciones de estrés. Machos y hembras.

Grupo separación maternal (SM): El cual está formado por 2 grupos (SM basal) y 2 grupos (SM estrés).

- SM basal: Las ratas que pertenecieron a este grupo fueron separadas de sus madres y crías de la misma camada, siguiendo el protocolo de separación maternal, durante 3h al día desde el día PN 1 hasta el día PN 14 es estrés crónico, en un cuarto aislado de la colonia bajo condiciones de temperatura controlada (30 – 35 °C). Fueron sacrificadas en condiciones basales, es decir sin estrés en el día del sacrificio (PN 15).
- SM estrés: Las ratas que pertenecieron a este grupo también fueron separadas de sus mamás y de sus hermanos, siguiendo el protocolo de SM, durante 3h al día desde el día PN 1 hasta el día PN 14, en un cuarto aislado de la colonia bajo condiciones de temperatura controlada (30 – 35 °C). El día PN 15 fueron sometidas a un tipo de estresor (SM) durante 3h antes del sacrificio.

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

*Cada grupo estuvo conformado por machos y hembras, preferentemente en cantidades iguales.

Dando como resultado una n = mínima de 8 y máxima de 10.

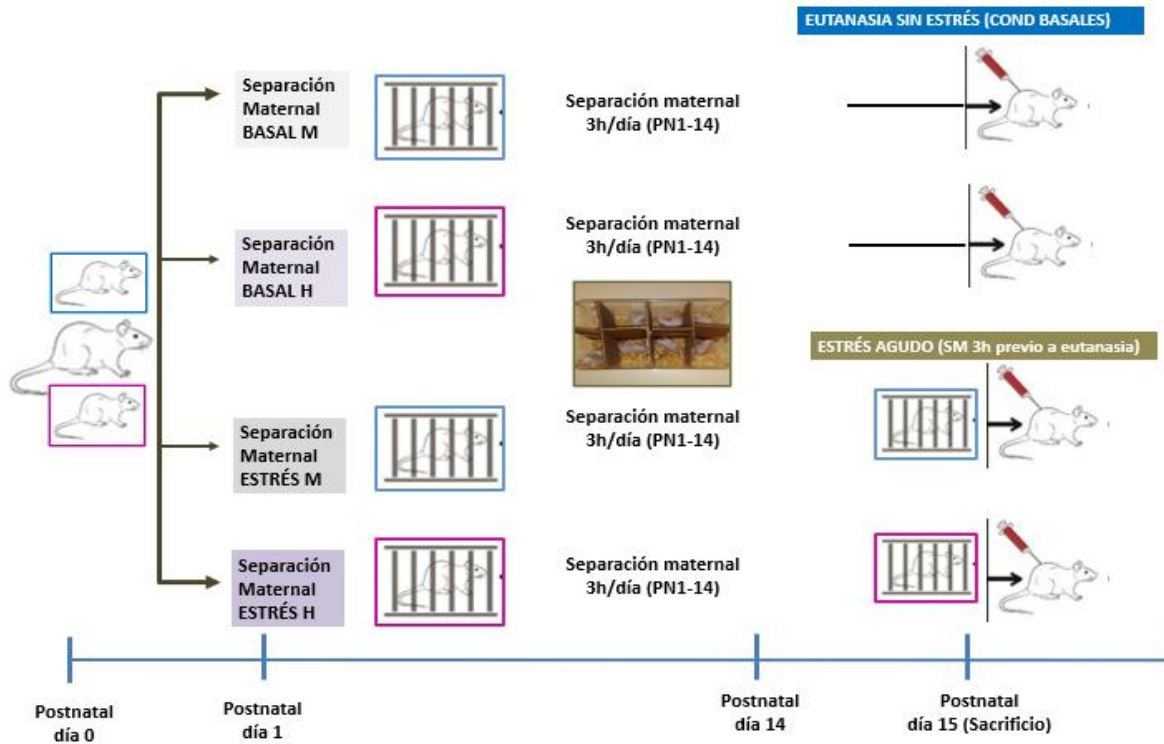
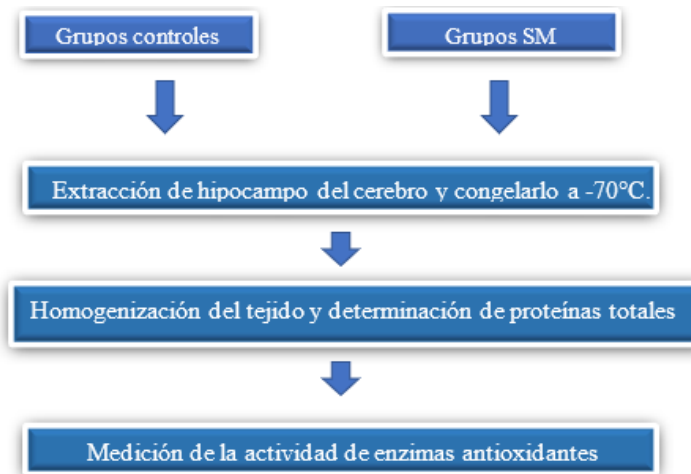


Figura 2. Esquema de metodología. Grupos de SM en condiciones basales (estrés crónico) y SM estrés (estrés agudo + estrés crónico). Machos y hembras.

METODOLOGÍA GENERAL DEL PROYECTO



7.2.1 Recolección de tejido cerebral (hipocampo) para la cuantificación de enzimas antioxidantes.

Llegando al día PN 15 siguiendo las diferentes metodologías de cada grupo, se anestesiaron los animales con una dosis letal de 10mg/kg de pentobarbital sódico, se tomó el peso de cada rata para posteriormente ser eutanizadas. Se realizó una incisión en el cráneo dejando al descubierto el cerebro, se disecciono el hipocampo y se recolecto en tubos eppendorf. Estas muestras se congelaron a -70°C hasta su posterior uso.

7.2.2 Homogenización del hipocampo y determinación de proteínas totales.

Se realizarán los homogenizados de los hipocampos aislados, utilizando una solución buffer fosfato salino (PBS), pH de 7, con inhibidor de proteasas, haciendo uso del sonicador. Se realizó la determinación de proteínas de los homogenizados mediante el método de Bradford M. 1976. En donde se utilizó albumina de suero bovino (BSA) como curva patrón para obtener la concentración de proteína total de cada muestra para medir la actividad de las enzimas antioxidantes.

7.2.3 Actividad de las enzimas antioxidantes

7.2.3.1 Superóxido dismutasa (SOD):

La actividad de SOD se evaluó utilizando una modificación de los métodos de (Beyer, 1987), espectrofotométricamente con el uso de EDTA (0.1 mM), NBT Cloruro azul de nitrotetrazolio (1.5 mM), Riboflavina 10 mM y SOD de 0.01-1 U/mL en Buffer fosfatos (0.067 M, pH:7), a esta mezcla se añadirá la muestra problema del tejido. Se midieron los cambios a 560 nm.

La actividad se reportó como unidades de actividad enzimática de SOD $UA_{SOD} = UA_{SOD} / \text{mg}$ de proteína.

7.2.3.2 Catalasa (CAT):

Se realizó la medición de la actividad en base al método descrito por Aebi, 1984. Se utilizó buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.0, posteriormente se añade el homogenado del tejido, posteriormente se añade H_2O_2 30 mM disuelto en buffer fosfatos y se midieron los cambios en la absorbancia a 0, 30, y 70 seg a 240 nm.

El resultado se reportó como Unidades de catalasa /mg proteína. Una unidad de catalasa se define como micromoles de H_2O_2 descompuestos/min, usando el coeficiente de extinción molar de H_2O_2 .

7.2.3.3 Glutación peroxidasa (GPX):

La actividad de GPX se evaluó con la disminución de la absorbancia causada en la reacción (C. Y. Wang, 1995). El principio de la técnica se basa en la oxidación del guayacol en presencia de H_2O_2 por la actividad de la peroxidasa dando como producto al tetraguayacol y H_2O . Por lo tanto, se midió la disminución de la absorbancia de dicha oxidación (Chance & Maehly, 1955).

Se utilizó buffer de fosfatos (0.1 M pH 7.0) con guayacol 4 mM, posteriormente se añadió la muestra problema, y H_2O_2 como sustrato (1% disuelto en el buffer de fosfato), se mezcla y se registra la disminución de absorbancia a 420 nm a intervalos de 30 s por 3 min. La actividad se reportó como unidades GPX/mg proteína (Chance, B & Maehly C, 1995; Wang, C.Y 1994).

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

7.2.3.4 Glutación transferasa (GST):

La actividad de esta enzima se midió por el método establecido por (Clarke, 2020). Se utilizará 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (100 mM), Buffer de fosfatos (0.1 M, pH: 6.5) y glutatión reducido, se mezcla y se incuba por 10 min a 30°C. Posteriormente se añade la muestra del tejido. Midiendo la absorbancia a 340 nm durante 5 min a intervalos de 1 min. Se reportó como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.

7.2.3.5 Glutación reductasa (GR):

El ensayo se basa en lo reportado por (Sedlak & Lindsay, 1968). A la mezcla homogénea de los tejidos se le adiciona amortiguador Tris (0.2 M, pH 8.2) y de Cloruro azul de nitrotetrazolio (NBT) (0.01 M), se mezcló y se le añade de metanol absoluto. Se mezclaron suavemente las placas y se centrifugaron a 3000 rpm a TA por 15 min. Se midió la absorbancia a 412 nm. Se reportó como $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína.

7.2.3.6 Malondialdehído (MDA)

La determinación de malondialdehído (MDA) en plasma siguiendo el método de Ohkawa et al 1979. Las muestras de tejido se homogenizaron utilizando buffer de fosfatos (0.1M) pH 7.0. Posteriormente se mezclaron con 2 hidroxitolueno butilado BHT (7 mM), ácido clorhídrico (HCl, 0.05 M) y ácido tiobarbitúrico (TBA, 1%). Se realizó una incubación de 60 min a 90°C. Se enfrió y posteriormente se añadió n-butanol. Se precipita y el sobrenadante se midió a 532nm. Los valores obtenidos de las muestras problema, serán interpolados en una curva de 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP; 0.1-5 $\mu\text{M}/\text{l}$). Los valores se reportarán como TBARS nmol/g tejido.

7.2.3.7 Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

Se realizó con una modificación a la metodología de Benzie y Strain (1996). Donde se tipifica la capacidad de los antioxidantes contenidos en la muestra para reducir la tripiridil-triazina férrica (Fe^{3+} -TPTZ) a la forma ferrosa (Fe^{2+}), la cual tiene una absorbancia máxima a 593 nm.

El reactivo FRAP fue preparado diariamente, y mantenido a 37 °C, mediante la mezcla de amortiguador de acetato (300 mM pH 3.6) con una solución 10 mM de TPTZ (2, 4, 6 tripiridil-s triazina, Acrôs Organics, EEUU) en HCl 40 mM, y una solución 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, en una proporción de 10:1:1.

7.3 Análisis estadístico

Se realizará por medio de estadística descriptiva donde se utilizarán las medidas de tendencia central y dispersión de valores (media \pm Desviación Estándar). Asimismo, en caso de ser normal la distribución de datos, se realizará un análisis de varianza (ANOVA), para determinar las diferencias significativas, en caso de existir diferencias, se realizará un análisis post-hoc con la prueba de Tukey. Un símbolo = $p < 0.05$, dos símbolos = $p < 0.01$, tres símbolos = $p < 0.001$. El tamaño de la muestra fue de 8 a 10 animales por grupo.

(*): Diferencias contra control basal (CB) del mismo sexo.

(+): Diferencia entre grupos del mismo tratamiento.

(#): Diferencia contra control estrés (CE).

(^): Diferencia entre sexos contra control basal (CB).

(°): Diferencia entre los tratamientos de SM.

8 RESULTADOS

Al día PN 14 se registró el peso corporal de las ratas de todos los grupos, grupo controles y grupos SM, donde no se observaron cambios significativos. (Ver figura 7). Con esto se puede comprobar que las crías de ratas sometidas a los diferentes tratamientos no se ven afectadas en su estado nutricional.

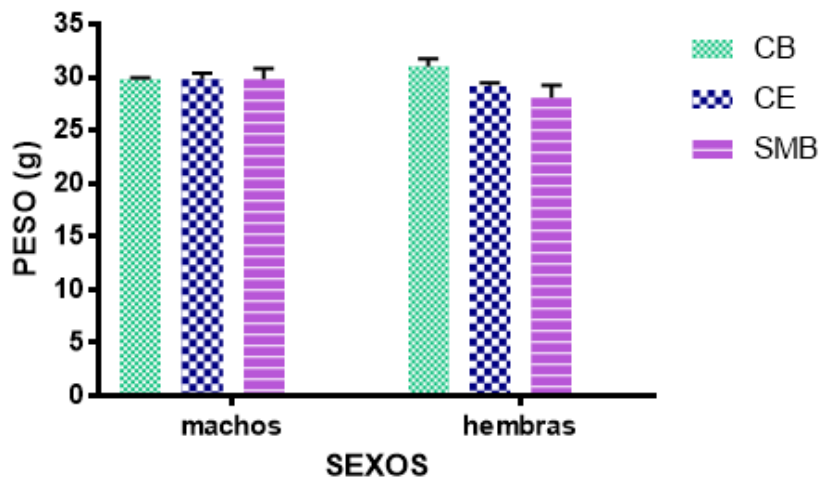


Figura 3. Peso (g) de crías de ratas. La gráfica representa el peso (g) de las crías de ratas sometidas a estrés postnatal (día 14). CB: Control Basal, CE: Control Estrés, SMB: Separación Maternal Basal. No existen diferencias entre el género. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ni tampoco entre los tratamientos.

- Actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD)

En la Figura 8 y 9 se muestran los resultados del análisis estadístico ANOVA de dos vías para hacer las siguientes comparaciones: los grupos en condiciones basales no mostraron diferencias significativas entre CB y SMB en machos y hembras. Al comparar los grupos de acuerdo con el factor de eutanasia (CE vs SME) tampoco presentaron diferencias significativas entre machos y hembras. Comparando los grupos controles (CB-CE) tampoco se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras. Al comparar los grupos expuestos a SM, tampoco se encontraron diferencias en ambos géneros.

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

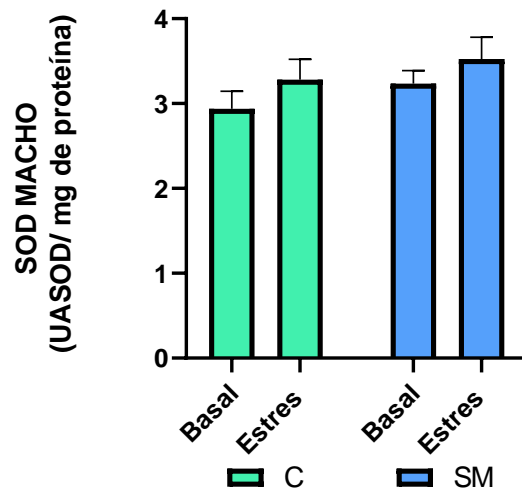


Figura 4. Comparación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en machos. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de SOD (UASOD/mg proteína), en homogenados de hipocampo de ratas macho control. C: control (CB: n=9, CE n=8), SM: Separación maternal (SMB n=10, SME n=10). No existen diferencias significativas entre los diferentes grupos en machos. $p = 0.3508$

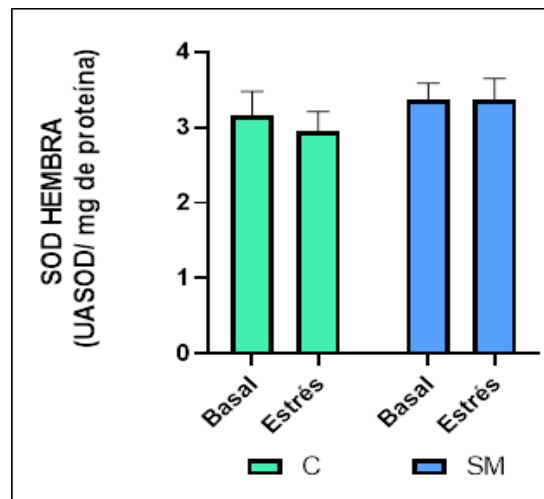


Figura 5. Comparación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en hembras. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de SOD (UASOD/mg proteína), en homogenados de hipocampo de ratas hembra control. C: control (CB: n=9, CE n=8), SM: Separación maternal (SMB n=10, SME n=10). No existen diferencias significativas entre los diferentes grupos en machos. $p = 0.3508$.

En la figura 10 se muestran los resultados de la comparación de SOD de estrés agudo y crónico entre machos y hembras. El primer factor que es Control basal (CB, CE) Vs Separación maternal no se encontró diferencia significativa,

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

(SMB, SME): $F(1,97) = 0.3507$, $p = 0.5551$. El segundo factor eutanasia en condiciones basales Vs estrés agudo, tampoco mostró diferencia significativa: (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1, 97) = 2.796$, $p = 0.977$. En el tercer factor que es el sexo no se encontraron diferencias significativas: $F(1,97) = 0.03095$, $p = 0.8607$. La interacción de los grupos resultó en (CB y CE Vs SMB y SME) $X(CB, SMB Vs CE, SME) = F(1, 97) = 0.05888$, $p = 0.8088$.

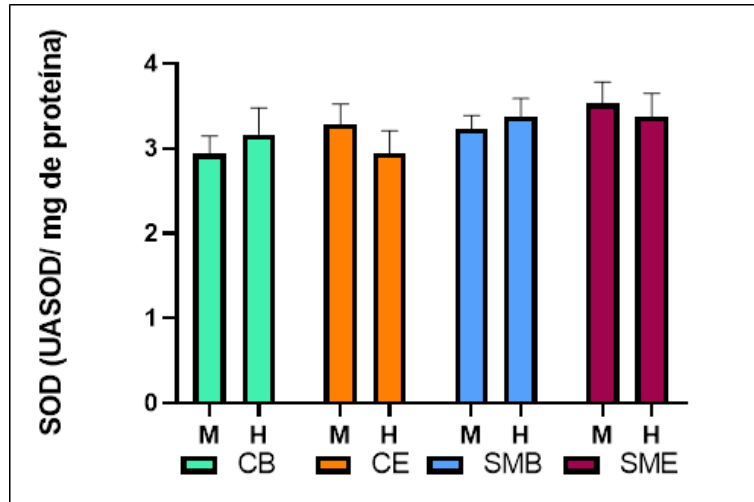


Figura 6. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en hipocampo. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de SOD (UASOD/mg proteína), en homogenados de hipocampo de ratas control. C: control (CB: $n=9$, CE $n=8$), SM: Separación maternal (SMB $n=10$, SME $n=10$). No existen diferencias entre el género. No se encontraron diferencias significativas entre el género, sexos, tratamientos ni condición de eutanasia.

- Actividad de la enzima Catalasa (CAT)

Para comparar los tratamientos en condiciones basales (Fig. 11 y Fig. 12) se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías, donde se obtuvieron diferencias significativas entre estos grupos (CB y SMB): $F(3, 90) = 8.224$, $p < 0.0001$ en machos y hembras. Al comparar los grupos de acuerdo con el factor de eutanasia (CE vs SME) no se obtuvieron diferencias significativas entre machos y hembras, $p = 0.0734$. Comparando los grupos controles (CB-CE) tampoco se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras, $p = 0.8252$. Al comparar los grupos de SM se encontraron diferencias significativas en hembras, $p = 0.0583$.

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

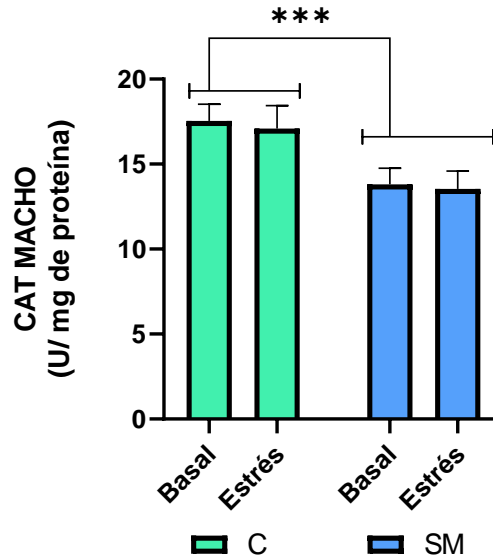


Figura 7. Comparación de la actividad de catalasa (CAT) en machos. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de CAT (U/mg proteína), en homogenados de hipocampo de ratas macho control. C: control (CB: n=9, CE n=8), SM: Separación maternal (SMB n=10, SME n=10). Existe diferencia significativa entre CB y SMB. (*Diferencia contra CB del mismo sexo, $p < 0.0001$.)

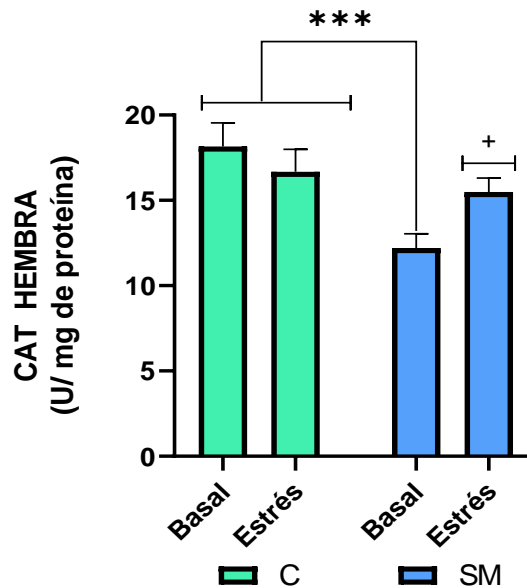


Figura 8. Comparación de la actividad de catalasa (CAT) en hembras. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de CAT (U/mg proteína), en homogenados de hipocampo de ratas hembra control. C: control (CB: n=9, CE n=8), SM: Separación maternal (SMB n=10, SME n=10). Existe diferencia significativa entre CB y SMB. (*Diferencia contra CB del mismo sexo, $p = 0.0001$). Existe diferencia significativa entre SMB y SME. (+ Diferencia entre grupos del mismo tratamiento, $p = 0.0583$).

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

Consecutivamente se realizó un análisis estadístico ANOVA de tres vías, en donde se muestran los resultados de la comparación de CAT de estrés agudo y crónico entre machos y hembras (Fig. 13).

El primer factor que es Control basal (CB, CE) Vs Separación maternal no se encontró diferencia significativa, (SMB, SME): $F(1,90) = 0.1224$, $P = 0.7272$. El segundo factor eutanasia en condiciones basales Vs estrés agudo, mostró diferencia significativa: (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1, 90) = 22.33$, $p < 0.0001$. En el tercer factor que es el sexo no se encontraron diferencias significativas: $F(1, 90) = 0.03230$, $p = 0.8578$. La interacción de los grupos resultó en (CB y CE Vs SMB y SME) X (CB, SMB Vs CE, SME) = $F(1, 90) = 2.632$, $p = 0.1082$.

El análisis post-hoc arrojó las siguientes diferencias CB machos y SMB hembras, $p = 0.0159$, CE machos y SMB hembras, $p = 0.0471$ y entre CB y SMB hembras, $p = 0.0081$.

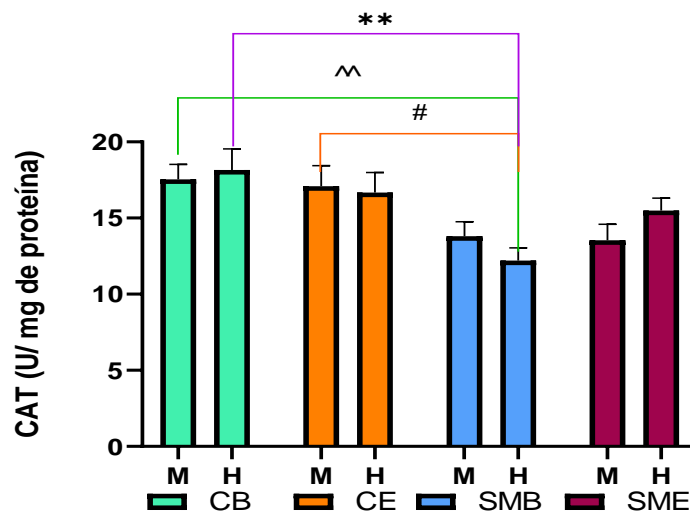


Figura 9. Actividad de catalasa (CAT) en hipocampo. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de CAT (U/mg proteína), en homogenados de hipocampo de ratas control. C: control (CB: $n=9$, CE $n=8$), SM: Separación maternal (SMB $n=10$, SME $n=10$). Existe diferencias entre CB machos y SMB hembras (^Diferencia entre tratamientos y CB de cualquier sexo, $p = 0.0159$); entre CE machos y SMB hembras (#Diferencia entre tratamientos y CE de cualquier sexo, $p = 0.0471$); entre CB y SMB hembras (**Diferencia entre tratamientos del mismo sexo, $p = 0.0081$). No existe diferencias significativas entre SME en comparación con ninguno de los grupos.

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

- Actividad de la enzima Glutación peroxidasa (GPX)

Para comprobar si existen diferencias significativas entre los grupos en condiciones basales (Fig. 14 y Fig. 15), se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías en el cual no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos CB vs SMB en machos, $p = 0.8639$ ni en hembras, $p = 0.6152$. Al comparar los grupos de acuerdo con el factor de eutanasia (CE vs SME) se obtuvieron diferencias significativas: $F(3, 82) = 8.867$, $p = 0.0001$ entre machos y hembras. Comparando los grupos controles (CB-CE) se encontraron diferencias significativas en machos y hembras, $p = 0.010$. Al comparar los grupos de SM no se encontraron diferencias significativas en machos, $p = 0.2012$ ni en hembras, $p = 0.3515$.

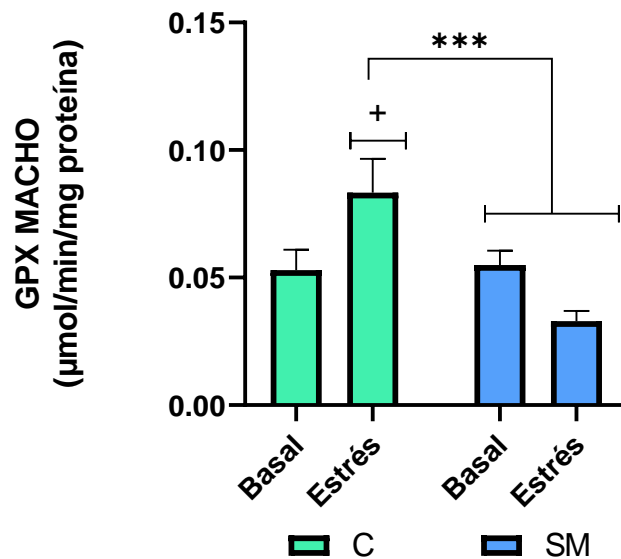


Figura 10. Comparación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX) en machos. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de GPX ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), en homogenados de hipocampo de ratas macho control. C: control (CB: $n=9$, CE $n=8$), SM: Separación maternal (SMB $n=10$, SME $n=10$). Existe diferencia significativa entre CE y CB (+Diferencia entre grupos del mismo tratamiento, $p = 0.0100$); entre CE y SME (***)Diferencia entre tratamientos, $p = 0.0001$).

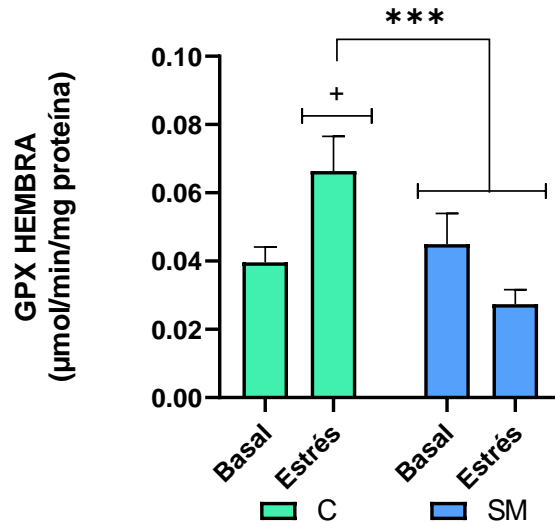


Figura 11. Comparación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX) en hembras. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de GPX ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), en homogenados de hipocampo de ratas hembra control. C: control (CB: $n=9$, CE $n=8$), SM: Separación maternal (SMB $n=10$, SME $n=10$). Existe diferencia significativa entre CE y CB (+Diferencia entre grupos del mismo tratamiento, $p = 0.010$); entre CE y SME (**Diferencia entre tratamientos, $p = 0.0076$).

A continuación, se realizó un análisis estadístico ANOVA de tres vías, en donde se recopilan los resultados de la comparación de GPX de estrés agudo y crónico en machos y hembras (Fig. 16).

El primer factor que es Control basal (CB, CE) Vs Separación maternal no se encontró diferencia significativa, (SMB, SME): $F(1,82) = 0.5193$, $p = 0.4732$. El segundo factor eutanasia en condiciones basales Vs estrés agudo, mostró diferencia significativa: (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1, 82) = 11.48$, $p = 0.0011$. En el tercer factor que es el sexo no se encontraron diferencias significativas: $F(1, 82) = 3.547$, $p = 0.0632$. La interacción de los grupos resultó en (CB y CE Vs SMB y SME) X (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1, 82) = 15.95$, $p = 0.0001$.

El análisis post-hoc arrojó las siguientes diferencias CE y SME machos, $p = 0.0025$, entre CE machos y CB hembras, $p = 0.0147$, entre CE macho y SMB hembra, $p = 0.0408$, entre CE macho y SME hembra, $p = 0.0005$ y entre CE y SME hembra, $p = 0.0524$.

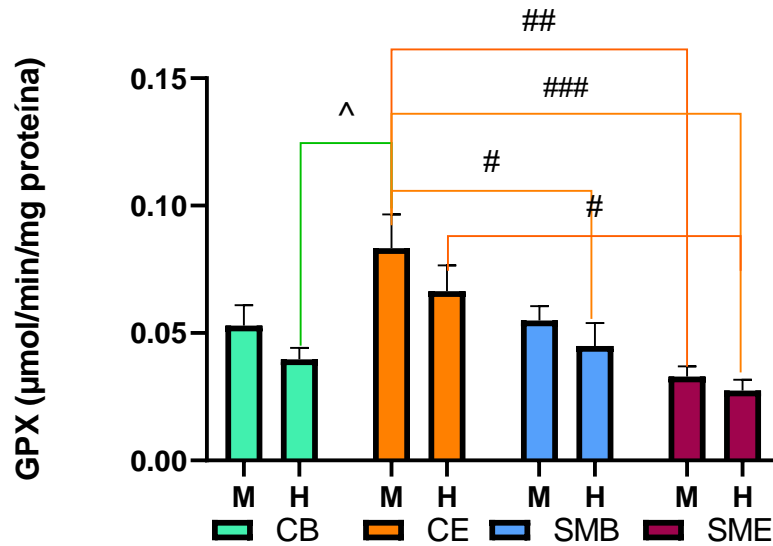


Figura 12. Actividad de glutatión peroxidasa (GPX) en hipocampo. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades GPX ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), en homogenados de hipocampo de ratas macho control. C: control (CB: $n=9$, $n=8$), SM: Separación maternal (SMB $n=10$, SME $n=10$). Existe diferencias entre CE y SME machos (##= 0.002 entre CE y SME hembra (# $p = 0.0524$, # Diferencia contra CE.); entre CE machos y CB hembras (^ Diferencia entre sexos contra CB, $p = 0.0147$); entre CE macho y SMB hembra (# $p = 0.0408$); entre CE macho y SME hembra (### $p = 0.0005$).

- Actividad de la enzima Glutatión Reductasa (GSH)

Los resultados obtenidos entre los grupos en condiciones basales (Fig. 17 y Fig. 18), se compararon mediante un análisis estadístico ANOVA de dos vías. Se obtuvo una diferencia significativa entre CB vs SMB: $F(3, 108) = 12.74$, $p = 0.001$ en hembras. Al comparar los grupos de acuerdo con el factor de eutanasia (CE vs SME) se obtuvieron diferencias significativas en hembras, $p < 0.0001$. Comparando los grupos controles (CB-CE) se encontraron diferencias significativas en hembras, $p = 0.0089$. Al comparar los grupos de SM no se encontraron diferencias significativas en machos, $p = 0.9981$ ni en hembras, $p = 0.7220$.

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

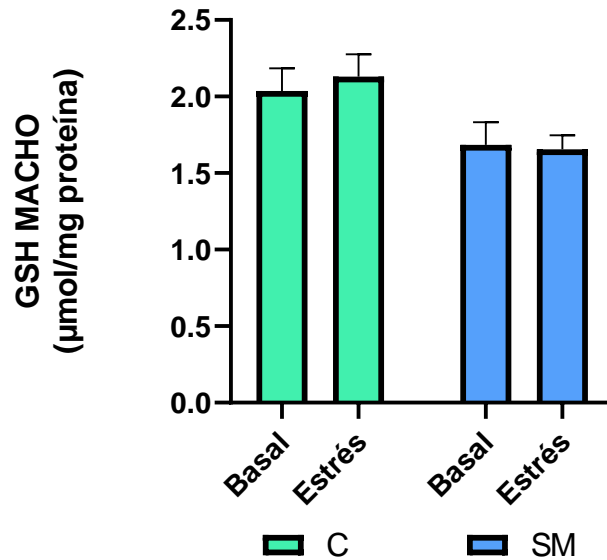


Figura 13. Comparación de la actividad de glutatión reductasa (GSH) en machos. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de GPX ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína), en homogenados de hipocampo de ratas macho control. C: control (CB: $n=9$, CE $n=8$), SM: Separación maternal (SMB $n=10$, SME $n=10$). No se encontró diferencia significativa entre los grupos controles en comparación con los grupos SM.

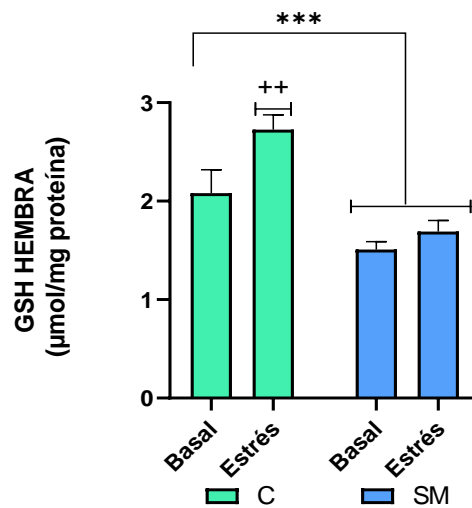


Figura 14. Comparación de la actividad de glutatión reductasa (GSH) en hembras. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína), en homogenados de hipocampo de ratas hembra control. C: control (CB: $n=9$, CE $n=8$), SM: Separación maternal (SMB $n=10$, SME $n=10$). Existe diferencia significativa en CB y SMB (***)Diferencia entre tratamientos, $p < 0.0001$); entre CB y CE (++)Diferencia entre grupos del mismo tratamiento, $p = 0.0089$).

Posteriormente se realizó un análisis estadístico ANOVA de tres vías, en donde se reúnen todos los resultados de la comparación de GSH de estrés agudo y crónico en machos y hembras (Fig. 19).

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

El primer factor que es Control basal (CB, CE) Vs Separación maternal se encontró diferencia significativa, (SMB, SME): $F(1, 108) = 4.416, p = 0.0379$. El segundo factor eutanasia en condiciones basales Vs estrés agudo, mostró diferencia significativa: (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1, 108) = 32.93, p < 0.0001$. En el tercer factor que es el sexo no se encontraron diferencias significativas: $F(1, 108) = 1.396, p = 0.2400$. La interacción de los grupos resultó en (CB y CE Vs SMB y SME) X (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1, 108) = 1.913, p = 0.1695$

El análisis post-hoc arrojó las siguientes diferencias entre CB macho y CE hembra, $p = 0.0069$, entre CE hembra y los grupos de SM de ambos sexos, < 0.0001 .

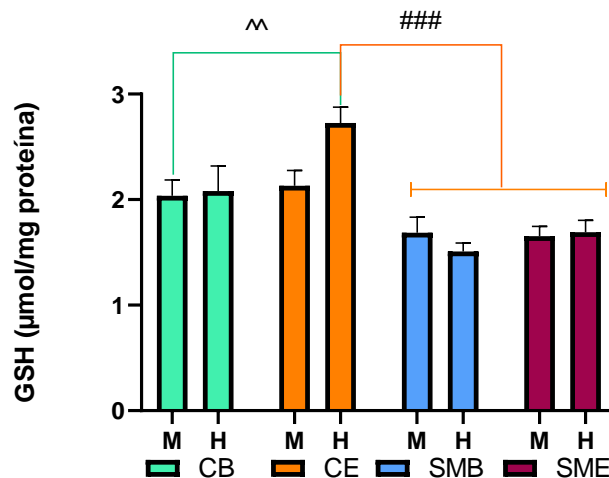


Figura 15. Actividad de glutatión reductasa (GSH) en hipocampus. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de GSH ($\mu\text{mol/mg}$ proteína), en homogenados de hipocampo de ratas control. C: control (CB: $n=9$, CE $n=8$), SM: Separación maternal (SMB $n=10$, SME $n=10$). Existe una diferencia significativa entre CB macho y CE hembra ($^{\wedge}$ Diferencia entre sexos con CB, $p = 0.0069$) y entre CE hembra contra los grupos de SM de ambos sexos ($###$ Diferencia contra CE, $p < 0.0001$).

- Actividad de la enzima Glutatión Transferasa (GST)

Al realizar el análisis estadístico ANOVA de dos vías para comparar los tratamientos en condiciones basales (Fig. 20 y Fig. 21), se obtuvo una diferencia significativa entre CB vs SMB en hembras, $p = 0.0597$. Al comparar los grupos de acuerdo con el factor de eutanasia (CE vs SME) se obtuvieron diferencias significativas en hembras, $p = 0.0200$. Comparando los grupos controles (CB-CE) se encontraron diferencias significativas en hembras, $p = 0.0225$. Al comparar los grupos

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

de SM no se encontraron diferencias significativas en machos, $p = 0.4757$ ni en hembras, $p = 0.6371$.

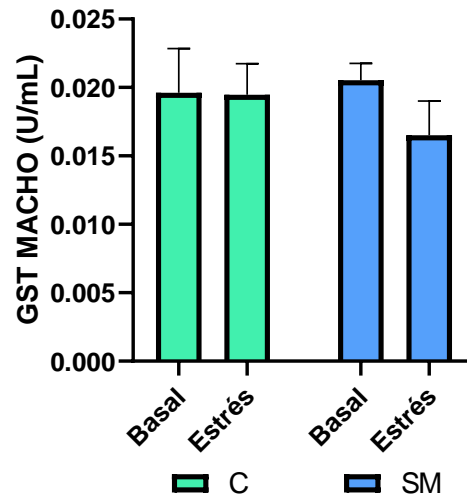
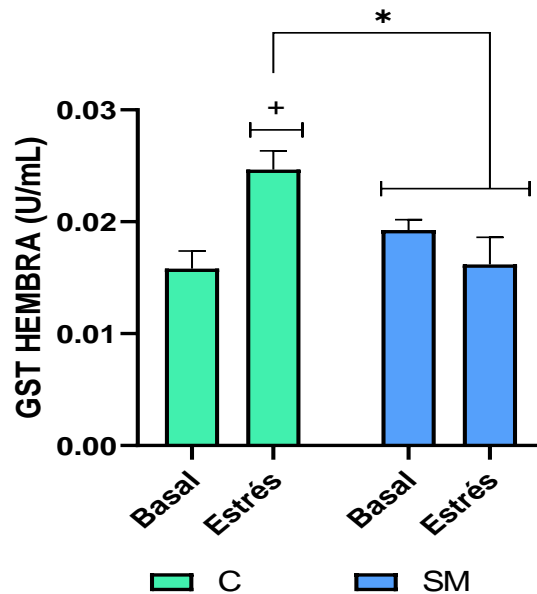


Figura 16. Comparación de la actividad de glutatión transferasa (GST) en machos. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de GST (U/mL), en homogenados de hipocampo de ratas macho control. C: control (CB: $n=9$, CE $n=8$), SM: Separación maternal (SMB $n=10$, SME $n=10$). No se encontró diferencia significativa entre los grupos controles en comparación con los grupos SM. $p = 0.7099$.



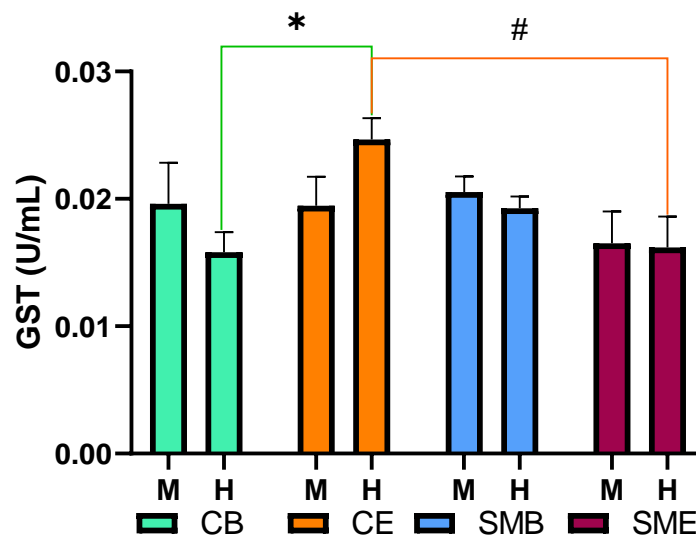
“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

Figura 17. Comparación de la actividad de glutatión transferasa (GST) en hembras. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de GST (U/mL), en homogenados de hipocampo de ratas hembra control. C: control (CB: n=9, CE n=8), SM: Separación maternal (SMB n=10, SME n=10). Existe diferencia significativa entre CE y CB (+Diferencia entre grupos del mismo tratamiento, $p = 0.0225$); entre SME y CE, (*Diferencia entre tratamientos, $p = 0.0200$).

Enseguida se realizó un análisis estadístico ANOVA de tres vías, en donde se recopilan todos los resultados de la comparación de GST de estrés agudo y crónico en machos y hembras (Fig. 22).

El primer factor que es Control basal (CB, CE) Vs Separación maternal se encontró diferencia significativa, (SMB, SME): $F(1, 108) = 4.416$, $p = 0.2756$. El segundo factor eutanasia en condiciones basales Vs estrés agudo, mostró diferencia significativa: (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1, 98) = 5.451$, $p = 0.8012$. En el tercer factor que es el sexo no se encontraron diferencias significativas: $F(1, 98) = 5.451$, $p = 0.9740$. La interacción de los grupos resultó en (CB y CE Vs SMB y SME) X (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1, 98) = 181.3$, $p < 0.0001$. La interacción de los grupos resultó en (CB y CE Vs SMB y SME) X (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1, 144) = 6.001$, $p = 0.0155$.

Al realizar el análisis post-hoc se encuentran diferencias significativas entre CE hembras y CB hembras, $p = 0.0225$ y entre CE hembras y SME hembras, $p = 0.0200$.



“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

Figura 18. Actividad de glutatión transferasa (GST) en hipocampo. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de GST (U/mL), en homogenados de hipocampo de ratas macho control. C: control (CB: n=9, CE n=8), SM: Separación maternal (SMB n=10, SME n=10). Existen diferencias significativas entre CE hembras y CB hembras (*Diferencia contra CB del mismo sexo, $p = 0.0225$) y entre CE hembras y SME hembras (#Diferencia contra CE, $p = 0.0200$).

- Actividad de la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP)

Al comparar si existen diferencias significativas entre los grupos en condiciones basales (Fig. 23 y Fig. 24), se obtuvo una diferencia significativa entre CB y SMB en machos, $p = 0.0078$ y en hembras, $p = 0.0002$. Al comparar los grupos de acuerdo con el factor de eutanasia (CE vs SME) no se obtuvieron diferencias significativas en ambos sexos. Comparando los grupos controles (CB-CE) tampoco se encontraron diferencias significativas en ambos sexos. Al comparar los grupos de SM no se encontraron diferencias significativas en ambos sexos $p = 0.3739$.

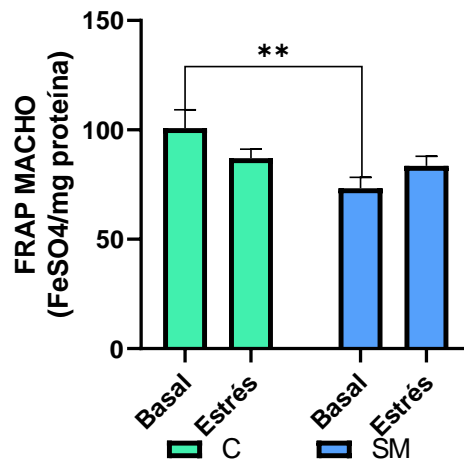


Figura 19. Comparación de la cuantificación de FRAP en machos. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de FRAP (FeSO4/mg proteína), en homogenados de hipocampo de ratas macho control. C: control (CB: n=9, CE n=8), SM: Separación maternal (SMB n=10, SME n=10). Existe diferencia significativa entre SMB y CB (**Diferencia entre tratamientos, $P = 0.0078$).

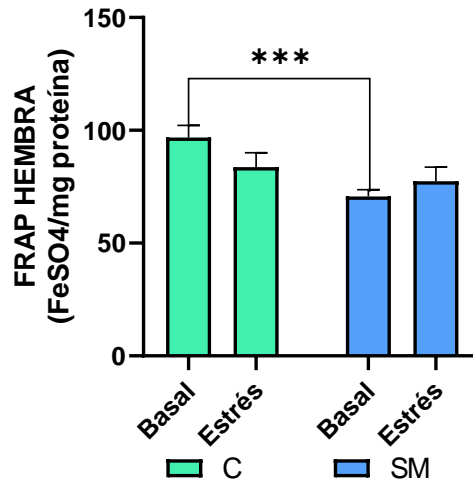


Figura 20. Comparación de la cuantificación de FRAP en hembras. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de FRAP (FeSO_4/mg proteína), en homogenados de hipocampo de ratas hembra control. C: control (CB: $n=9$, CE $n=8$), SM: Separación maternal (SMB $n=10$, SME $n=10$). Existe diferencia significativa entre SMB y CB (**Diferencia entre tratamientos, $p=0.0002$).

A continuación, se realizó un análisis estadístico ANOVA de tres vías, en donde se recopilan todos los resultados de la comparación de FRAP de estrés agudo y crónico en machos y hembras (Fig. 25).

El primer factor que es Control basal (CB, CE) Vs Separación maternal no se encontró diferencia significativa, (SMB, SME): $F(1, 87) = 0.4114$, $p = 0.5229$. El segundo factor eutanasia en condiciones basales Vs estrés agudo, mostró diferencia significativa: (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1, 87) = 17.18$, $p < 0.0001$. En el tercer factor que es el sexo no se encontraron diferencias significativas: $F(1, 87) = 1.094$, $p = 0.9985$. La interacción de los grupos resultó en (CB y CE Vs SMB y SME) X (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1,87) = 8.222$, $p = 0.0052$.

El análisis post-hoc arrojó las siguientes diferencias entre CB y SMB macho, $p = 0.0140$, entre CB macho y SMB hembra, $p = 0.0040$, entre SMB macho y CB hembra, $p = 0.0277$ y entre CB y SMB hembra, $p = 0.0075$.

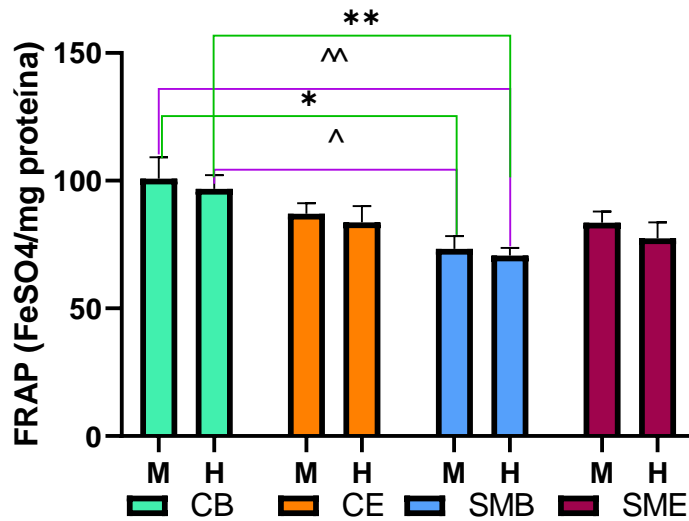


Figura 21. Actividad de la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP) en hipocampo. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de FRAP ($\text{FeSO}_4/\text{mg proteína}$), en homogenados de hipocampo de ratas control. C: control (CB: $n=9$, CE $n=8$), SM: Separación maternal (SMB $n=10$, SME $n=10$). Existe una diferencia entre CB y SMB macho (*Diferencia contra CB del mismo sexo, $p = 0.0140$). Entre CB macho y SMB hembra (^Diferencia entre sexos contra CB, $p = 0.0040$). Entre SMB macho y CB hembra (^ $p = 0.0277$) y entre CB y SMB hembra (* $p = 0.0075$).

- Actividad del Malondialdehído (MDA)

Se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías para observar si se encuentran diferencias entre los grupos en condiciones basales (Fig. 26 y Fig. 27). Los resultados arrojaron que existe una diferencia significativa entre los grupos (CB vs SMB): $F(3, 98) = 73.72$, $p < 0.0001$ en machos y hembras. Al comparar los grupos de acuerdo con el factor de eutanasia (CE vs SME) se obtuvieron diferencias significativas en ambos sexos, $p < 0.0001$. Al comparar los grupos de SM también se encontraron diferencias significativas en ambos sexos $p < 0.0001$.

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

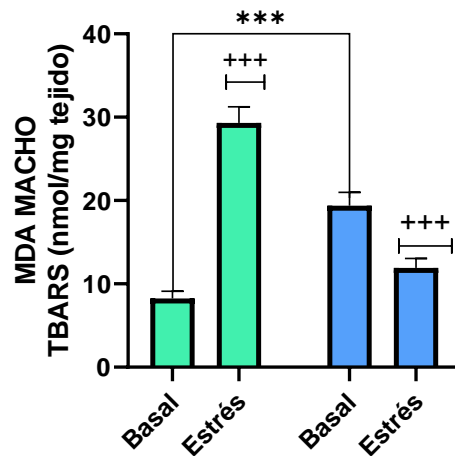
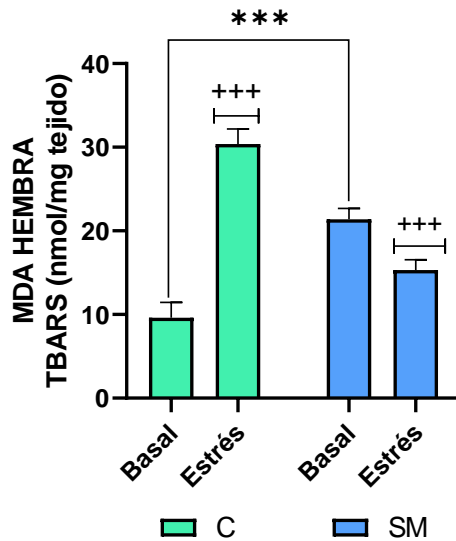


Figura 22. Comparación de la cuantificación de MDA en machos. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de MDA (nmol/mg tejido), en homogenados de hipocampo de ratas macho control. C: control (CB: n=9, CE n=8), SM: Separación maternal (SMB n=10, SME n=10). Existe diferencia significativa entre CE y CB (**Diferencia entre tratamiento, $p < 0.0001$); entre SME y SMB (+++Diferencia entre SME y SMB, $p = 0,0001$) y entre SMB y CB (+++p < 0.0001).



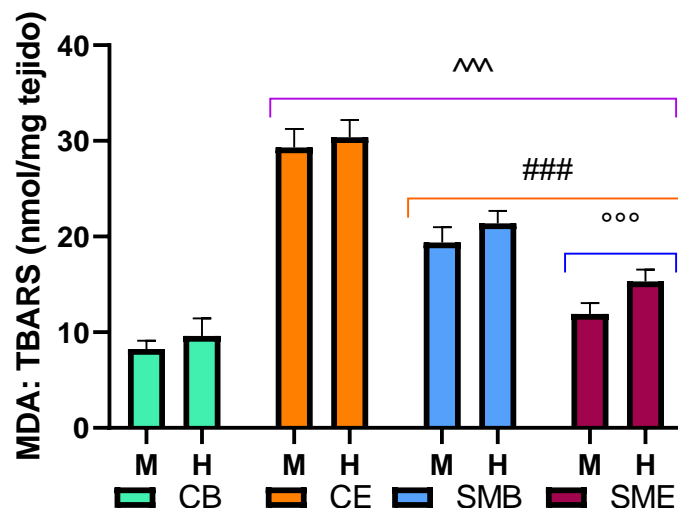
“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

Figura 23. Comparación de la cuantificación de MDA en hembras. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de MDA (nmol/mg tejido), en homogenados de hipocampo de ratas hembra control. C: control (CB: n=9, CE n=8), SM: Separación maternal (SMB n=10, SME n=10). Existe diferencia significativa entre SME y SMB (+Diferencia entre grupos del mismo tratamiento, $p = 0.011$); entre CE y CB (+++ $p < 0.0001$) y entre SMB y CB (***)Diferencia entre tratamientos $p < 0.0001$).

Para finalizar se realizó un análisis estadístico ANOVA de tres vías, en donde se recopilan todos los resultados de la comparación de MDA de estrés agudo y crónico en machos y hembras (Fig. 28).

El primer factor que es Control basal (CB, CE) Vs Separación maternal, encontró diferencia significativa, (SMB, SME): $F(1, 98) = 47.45$, $p < 0.0001$. El segundo factor eutanasia en condiciones basales Vs estrés agudo, mostró diferencia significativa: (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1, 98) = 5.451$, $p = 0.0216$. En el tercer factor que es el sexo se encontraron diferencias significativas: $F(1, 98) = 3.659$, $p = 0.0587$. La interacción de los grupos resultó en (CB y CE Vs SMB y SME) X (CB, SMB Vs CE, SME): $F(1,98) = 181.3$, $p < 0.0001$.

El análisis post-hoc arrojó las siguientes diferencias significativas: CB entre CE, SMB y SME en ambos sexos, $p < 0.0001$, entre CE comparado con SMB y SME en ambos sexos, $p < 0.0001$ y entre SME y SMB de ambos sexos, $p < 0.0001$.



“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

Figura 24. Actividad del malondialdehído (MDA) en hipocampo. La gráfica representa la $X \pm EE$. Unidades de MDA (nmol/mg tejido), en homogenados de hipocampo de ratas control. C: control (CB: n=9, CE n=8), SM: Separación maternal (SMB n=10, SME n=10). Existe diferencias significativas entre CB comparado con CE, SMB y SME en ambos sexos (^^^Diferencia entre sexos contra CB, $p < 0.0001$), entre CE comparado con SMB y SME en ambos sexos (###Diferencia contra CE, $p < 0.0001$) y entre SME y SMB de ambos sexos (°°°Diferencia entre los tratamientos de SM, $p < 0.0001$).

A continuación, se muestra en la Tabla 1 un resumen los resultados que arrojaron el ANOVA de 3 vías de las actividades de las enzimas antioxidantes y de los parámetros de estrés oxidativo, donde se compara el factor sexo, factor SM y factor eutanasia.

	Factor sexo Macho vs hembra	Factor SM CB - CE vs SMB - SME	Factor eutanasia CB - SMB vs CE- SME
SOD	0.8607	0.5551	0.977
CAT	0.8578	0.7272	< 0.0001***
GPX	0.0632	0.4732	0.0011**
GST	0.974	0.2756	0.8012
GSH	0.24	0.0379	<0.0001***
FRAP	0.9985	0.5229	<0.0001***
MDA	0.0587*	<0.0001***	0.0216*

Tabla 1. Resumen de resultados de las actividades de las enzimas antioxidantes

9 DISCUSIÓN

Los acontecimientos adversos en los primeros años de vida generan en la cría un estado de estrés postnatal, el cual altera la homeostasis del cerebro, causando un estado de estrés oxidativo, que lleva a la activación de diferentes vías que generan una respuesta específica en el cerebro, teniendo como consecuencia la vulnerabilidad a diversos trastornos mentales en la edad adulta, como pueden ser la ansiedad y la depresión. La separación maternal (SM) es un modelo de estrés en etapas tempranas de la vida (ELS), que consiste en separar a la cría de la madre y camada por periodos prolongados diariamente, durante los primeros 15PN, creando un entorno de riesgo para la cría, debido a la privación de estímulos que son fundamentales para el correcto desarrollo cerebral. El modelo de SM se considera un modelo útil para estudiar el abandono y el maltrato en la infancia, esto se encuentra relacionado con la tendencia a desarrollar enfermedades psiquiátricas a lo largo de su vida, las cuales se encuentran estrechamente relacionadas al estrés oxidativo.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes fisiológicas, en hipocampos de crías de ratas Sprague Dawley de ambos sexos sometidas a un modelo de SM, durante los primeros 15PN. Las crías se separaron en diferentes tratamientos con estrés agudo, estrés crónico y una combinación de ambos para poder observar la diferencia en la actividad de las enzimas SOD, CAT, GPX, GR, GST, MDA, FRAP en el hipocampo de crías de ratas.

En un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo (Saavedra LM, y col, 2018), utilizando este modelo, al inyectar vehículo y analizar las concentraciones de citocinas circulantes 90 min posteriores a la inyección se vio que la separación maternal incrementa los niveles circulantes de TNF α e IL-6 en las crías. Por otro lado, se sabe que estas dos citocinas son potentes mediadores de ROS (Stípek S y col, 1995), incrementando la inflamación, que a su vez aumenta el estrés oxidativo. En nuestro estudio, en el caso de SOD se vio un incremento aparente, aunque no tuvo diferencia significativa entre el control y la SM y SME lo que se puede observar en la Fig. 8 a la fig. 10. Estos resultados son similares a lo reportado por (Noschang et al., 2020), en condiciones basales, quienes no obtuvieron diferencia significativa al cuantificar la actividad de SOD en el modelo de SM en machos y hembras; una observación similar se realizó por (Diehl et al., 2012), quienes tampoco obtuvieron diferencia significativa al cuantificar la actividad de SOD, sin embargo solamente realizaron el experimento en machos y se eutanizaron el día 70 PN. (Rodrigues et al., 2020, (Djordjevic et al., 2010), obtuvieron resultados similares al no encontrar diferencias

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

significativas en la actividad de SOD, utilizando el modelo de destete temprano (eutanizadas el día 21PN) y el modelo de inmovilización – estrés crónico de aislamiento (eutanizadas a los 3 meses de edad), respectivamente y ambos modelos se realizaron únicamente en machos.

Por otra parte, Uysal et al., 2005 si reportan un aumento en la actividad de SOD en su modelo de privación materna, realizado en machos, eutanizados el día 21PN. También encontramos diferencias con lo reportado por (Réus et al., 2017), quienes obtuvieron una disminución en la actividad de SOD en ratas Wistar machos expuestas a un modelo de privación de cuidados maternos, eutanizados el día 20PN. Por último (Shao et al., 2015) reporto una disminución en la actividad de SOD en ratas Sprague Dawley expuestas a un modelo de aislamiento social, eutanizadas el día 82 PN. Nuestros resultados van acordes con algunos resultados encontrados en la bibliografía por lo que se puede argumentar que SOD no siempre debe sufrir cambios respecto a su actividad, debido a que al ser la primera enzima que se encuentra atacando a las EROs su sistema de defensa es mas robusto y por esto no hubo cambios en estos animales expuestos a SM. Por otro lado, los resultados que difieren con lo reportado en la bibliografía se deben principalmente a la metodología utilizada y sobre todo al tiempo en el que se eutanizaron a los animales, debido a que si estos fueron eutanizados de mayor edad pueden sufrir algún otro tipo de estrés que pueda afectar la actividad de esta enzima.

Los resultados obtenidos en la Fig. 11 a la Fig. 13 indican que la enzima catalasa (CAT) presenta una disminución significativa en los grupos de SM en comparación a los grupos controles. Estos resultados son similares a lo reportado por (Malcon et al., 2020), quienes obtuvieron una disminución significativa en ratones BalB/C machos expuestos a un protocolo de SM, sin embargo fueron eutanizadas a los 58 PN; una observación similar se realizó por (Réus et al., 2017), quienes obtuvieron una disminución significativa en ratas Wistar machos expuestos a un protocolo de privación de cuidados maternos, eutanizadas a los 20 PN.

Nuestros resultados difieren con lo reportado por (Noschang et al., 2020), quienes no obtuvieron diferencias significativas en la actividad de CAT en ratas Wistar machos y hembras expuestas a un modelo de manipulación neonatal, eutanizadas el 21 PN. Estos resultados son similares con lo reportado por (Rodrigues et al., 2020, Diehl et al., 2012) quienes no obtuvieron diferencia significativa en la actividad de CAT en ratas Wistar machos y hembras expuestas a un modelo de destete temprano, eutanizadas el día 21PN y en ratas Wistar machos expuestas a un modelo de SM,

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

eutanizadas el día 70 PN, respectivamente. Los resultados obtenidos de la actividad de CAT fueron los que esperábamos encontrar, debido a que al observar una disminución de la actividad de esta enzima se puede comprobar que existe un aumento en la producción y almacenaje de EROs, principalmente de H_2O_2 en los grupos que fueron expuestos a SM tanto en su forma basal como en su forma dinámica al estrés, por lo tanto, el organismo se encuentra afectado por un estado de estrés oxidativo. Estos resultados van de la mano con algunos reportes encontrados en la bibliografía pero también difieren de algunos otros trabajos esto se puede deber de igual forma, a las diferentes metodologías utilizadas, el tiempo de eutanasia y también es muy importante mencionar que nuestros resultados se realizaron en grupos tanto basales como en respuesta dinámica al estrés, y lo que se reporta en la bibliografía son resultados solamente en condiciones basales, es por esto que también podemos observar cambios en nuestros resultados respecto a lo que ya se encuentra reportado.

Los resultados obtenidos en la Fig. 14 a la Fig. 16 indican que la enzima glutatión peroxidasa (GPX) presenta un aumento significativo en el tratamiento CE en comparación con el CB, además se presenta una disminución entre el tratamiento SMB y SME en comparación con el grupo CE, entre los grupos de SM no hubo diferencia significativa y tampoco se obtuvo diferencia significativa entre género.

Nuestros resultados obtenidos en condiciones basales van acorde a lo reportado por (Diehl et al., 2012), quienes no obtuvieron diferencia significativa al cuantificar la actividad de GPX, utilizando el modelo de SM en ratas Wistar macho, eutanizadas el día 70 PN. (Noschang et al., 2020), tampoco obtuvieron diferencia significativa al cuantificar la actividad de GPX utilizando modelo de manipulación neonatal en machos, eutanizadas el día 21PN. Otro estudio que presenta resultados similares al nuestro es el de (Rodrigues et al., 2020), quienes no obtuvieron diferencia significativa en la actividad de GPX en machos, utilizando un modelo de destete temprano, eutanizando a los animales el día 21PN. Sin embargo, este mismo autor observó un aumento significativo al cuantificar la actividad de GPX en hembras, utilizando el mismo modelo de destete temprano.

Aunado a esto encontramos algunos trabajos que difieren con nuestros resultados como es el caso de (Uysal et al., 2005), quienes presentan un aumento significativo en la actividad de GPX, utilizando un modelo de privación maternal en ratas Wistar macho neonatales, eutanizadas el día 21PN. (Shao et al., 2015) obtuvieron una disminución significativa en la actividad de GPX en ratas

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

macho Sprague Dawley neonatales, utilizando el modelo de aislamiento social, siendo eutanizadas el día 82 PN y por ultimo (Noschang et al., 2020) obtuvieron una disminución en la actividad de GPX en ratas Wistar hembras expuestas a un modelo de manipulación neonatal, eutanizadas el día 21 PN. Cabe resaltar que en nuestros resultados si se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos SM y control estrés, pero al no encontrar información en la bibliografía que compararan entre condiciones basales y de estrés, se utilizaron los resultados en condiciones basales para poder realizar la comparación, esto es de gran importancia por que se observó cómo es que reacciona la actividad de la enzima GPX en diferentes condiciones, es decir se pudo evaluar la reacción del organismo durante el estrés agudo, estrés crónico y bajo una respuesta dinámica al estrés. En los grupos que fueron expuestos a un periodo de estrés agudo se ve aumentada la actividad de GPX con respecto al grupo control basal, sin embargo, vemos un descenso de esta actividad en los grupos de estrés agudo lo que indica que hay exceso de EROs, sobre todo de H_2O_2 por lo que el organismo se encuentra en un estado de estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos en la Fig. 17 a la Fig. 19 indican que la enzima glutatión reductasa (GSH) en hembras se presentan una disminución significativa entre los grupos de SM en comparación con los grupos controles y además se presenta un aumento significativo entre el grupo CE vs CB. Estos resultados en condiciones basales van acorde con lo reportado por (Malcon et al., 2020), quienes no obtuvieron diferencia significativa en la actividad de GSH en ratones BalB/C machos expuestos a un protocolo de SM, sin embargo una diferencia con nuestro proyecto fue el día de la eutanasia. Por otro lado nuestros resultados difieren con lo obtenido por (Khorjahani et al., 2020), quienes obtuvieron una disminución significativa en la actividad de GSH en ratas Wistar machos expuestos a un protocolo de SM, teniendo también como diferencia el día de la eutanasia. Es escasa la información que se encuentra en la bibliografía sobre la actividad de GSH, además de que solo se encuentran datos de machos.

Los resultados obtenidos en la Fig. 20 a la Fig. 22 indican que la enzima glutatión transferasa (GST) no presenta diferencias significativas entre los grupos controles, los grupos basales, ni entre los grupos de SM en machos ni en hembras, sin embargo, esta enzima presenta una disminución significativa en el grupo SME en comparación con los grupos CE en ambos sexos. No hay reportes en la literatura donde evalúen esta enzima antioxidante en algún protocolo de estrés postnatal.

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

El sistema glutatión del organismo esta expuesto principalmente por las tres enzimas mencionadas anteriormente, GPX, GST y GSH, en conjunto juegan un papel fundamental para la detoxificación del organismo de EROs y de compuestos xenobióticos. Con los resultados obtenidos de acuerdo con su actividad podemos argumentar que el mecanismo de retroalimentación de estas tres enzimas se encuentra disminuido en los grupos de SM (basal y estrés) con respecto al grupo control estresado, lo que indica que al momento en el que el animal esta siendo expuesto a un estado de estrés agudo este sistema de glutatión se encuentra aumentando su actividad para contrarrestar los efectos negativos de las EROs pero cuando el organismo se encuentra expuesto a un estado de estrés crónico y mas aun a un estado de respuesta dinámica al estrés este sistema se encuentra disminuido y por lo tanto habrá un aumento de EROs y no podrán cumplir con su actividad principal que es detoxificar al organismo.

También se obtuvieron resultados de los parámetros que miden el estrés oxidativo, de la Fig. 23 a la Fig. 26 se indica que la actividad de la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP) presenta una disminución significativa en el grupo SMB en comparación con el grupo CB en ambos sexos. Estos resultados obtenidos en condiciones basales van acorde con lo reportado por (Arabi et al., 2021; Lorigooini et al., 2020; Nouri et al., 2020), quienes obtuvieron una disminución significativa en la actividad de FRAP en ratones NMRI machos expuestos a un protocolo de SM, sin embargo, existen diferencias entre su metodología y la del presente proyecto, una de estas diferencias es el día de la eutanasia y los animales que se utilizaron.

Por otro lado nuestros resultados difieren de lo reportado por (Menezes et al., 2017), quienes no obtuvieron diferencia significativa en la actividad de FRAP en ratas Wistar machos, expuestas a un protocolo de privación materna, estas diferencias se pueden deber a variaciones en la metodología utilizada en los diferentes proyectos. Es escasa la información que se encuentra en la bibliografía sobre la actividad de FRAP, además de que solo se encuentran datos de machos.

De acuerdo con los resultados obtenidos y una vez realizada la comparación bibliográfica se puede argumentar que el poder antioxidante no enzimático que se encuentra en el organismo de las crías de ratas expuestas a SM, también se ve afectado mostrando una disminución en su actividad y por lo tanto se produce un aumento en la producción de EROs y la diferencia encontrada con nuestros resultados y los de la bibliografía se puede deber de igual forma que en los resultados de las enzimas antioxidantes a la diferente metodología utilizada, al tiempo de eutanasia y la diferencia en

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

condiciones de nuestros grupos, es decir que en nuestros resultados se observaron condiciones basales y de estrés.

Respecto al producto de lipoperoxidación, el MDA, se indica de la Fig. 27 a la Fig. 29, que la cantidad de TBARS aumenta en todos los grupos en comparación con el grupo control. Lo cual en condiciones basales va acorde con lo reportado por (Arabi et al., 2021; Lorigooini et al., 2020; Nouri et al., 2020), quienes obtuvieron un aumento significativo en la cantidad de MDA en ratones NMRI machos expuestos a un protocolo de SM. Otros estudios que presentan resultados similares a los nuestros, son los de (Menezes et al., 2017), quienes obtuvieron un aumento significativo en la cantidad de MDA en ratas Wistar macho expuestos a un protocolo de SM y (Réus et al., 2017) quien reporta resultados de ratas Wistar hembras, en donde también hubo un aumento significativo en la cantidad de MDA en un protocolo de SM. (Dallé et al., 2020), también reporta un aumento significativo en MDA utilizando ratas Sprague Dawley machos.

Por otro lado existen estudios que difieren con nuestros resultados, tal es el caso de (Drastichova et al., 2021; Malcon et al., 2020; Menezes et al., 2017), quienes no obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de MDA en animales expuestos a protocolo de SM..

Para concluir con lo encontrado en la bibliografía respecto a nuestros resultados se puede observar y afirmar nuestra postura la cual indica que la SM está produciendo estrés oxidativo en el hipocampo de ratas, ya que el malondialdehído es un producto de la peroxidación lipídica la cual es un indicador de estrés oxidativo y como se muestra en nuestros grupos se encuentra un aumento significativo en los animales expuestos a SM en comparación con el grupo control. Las diferencias encontradas en nuestros resultados con respecto al bibliografía se pueden deber a su metodología, cepa utilizada, tiempo de eutanasia y el sexo de los animales.

En condiciones basales existe un estado de homeóstasis en el organismo, que permite responder a cualquier estímulo de estrés en los animales, es decir el eje HPA se encuentra llevando a cabo una retroalimentación efectiva a nivel del hipocampo a través de los receptores GR (Baes et al., 2014). En el caso de las crías de ratas, los grupos en condiciones basales se encuentran en periodo de hiporrespuesta al estrés (SHRP), el cual se caracteriza por una respuesta adrenocortical notablemente reducida al estrés leve, por lo tanto, no habrá mayor aumento en la producción de ACTH y corticosterona. (Lajud et al., 2012). Cuando el animal se ve expuesto a un estado de estrés agudo el eje HPA aumenta su actividad produciendo mayor cantidad de ACTH y de GCs, esto

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

provoca mayor gasto de energía es decir de ATP, lo que conlleva a un aumento en la formación de EROs, para contrarrestar los efectos negativos de estas especies el sistema antioxidante aumenta su actividad, detoxificando al organismo y evitando así un daño oxidativo (Faravelli et al., 2012).

En condiciones de estrés crónico, es decir cuando la condición de estrés es repetida por un periodo prolongado de tiempo (Olf, 1999), se presenta una sobreactivación del eje HPA por lo que habrá un aumento descontrolado en la producción de ACTH y GCs; esto provoca una disminución en la producción de los receptores GR en el hipocampo, lo que tendrá como consecuencia una retroalimentación negativa atrofiada (Mario F. Juruena, 2014). Estos cambios en la homeostasis del SNC, la microglía y los astrocitos liberan citocinas para restablecer el equilibrio, pero si el organismo se encuentra en un estado de estrés crónico, estas citocinas estarán provocando un estado proinflamatorio por lo que el organismo sufrirá de estrés oxidativo, provocando daño en las neuronas del hipocampo disminuyendo la neurogénesis (X. Wang & Michaelis, 2010)

La enzima SOD se encuentra en primera línea en contra de las especies reactivas de oxígeno (EROs), se encarga de dismutar al anión O_2 en H_2O_2 y O_2 para evitar su acumulación a nivel tóxico (Bresciani et al., 2015). Aunque no hubo diferencia significativa en los resultados de la actividad de SOD en el presente proyecto, no quiere decir que la SM no esté causando estrés oxidativo, debido a como se explicó anteriormente, de lo que se encarga esta enzima es de generar H_2O_2 el cual es un radical libre altamente inestable. La falta de acoplamiento de SOD con la actividad de CAT puede dar lugar a una acumulación de H_2O_2 tóxico el cual se queda almacenado llevando al organismo a un estado de estrés crónico (Filipović et al., 2017).

La catalasa es una de las proteínas peroxisomales más abundantes en las células de los mamíferos (Fransen et al., 2012). Para llevar a cabo su reacción la enzima CAT utiliza su grupo hemo, el cual se reduce mediante reacciones redox para llevar a cabo la dismutación de H_2O_2 en H_2O y O_2 (Nandi et al., 2019), pero las altas concentraciones de aniones superóxido son capaces de inactivar a CAT al oxidar el grupo hemo del sitio activo impidiendo llevar a cabo su reacción de dismutación (Spiers et al., 2015). Por lo que CAT al estar disminuida en el hipocampo de crías de ratas no está llevando a cabo su función como enzima detoxificante de manera adecuada, provocando un aumento de H_2O_2 (X. Wang & Michaelis, 2010). Esta disminución en la actividad de CAT se asocia a un comportamiento de tipo depresivo en el hipocampo de ratas expuestas a la ELS según lo reportado por (Réus et al., 2017). El desequilibrio en la proporción de SOD, CAT y GPX está ocasionando

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

una acumulación del H_2O_2 lo cual puede generar radicales hidroxilo nocivos (Jamuna Rani & Mythili, 2014). Cabe resaltar que en el presente proyecto se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes en condiciones de estrés y en condiciones basales, lo cual es de gran importancia ya que en los resultados obtenidos de GPX se puede observar un incremento en el grupo CE, lo que está indicando un correcto funcionamiento de esta enzima al convertir el H_2O_2 en H_2O y O_2 (Lubos et al., 2011). Sin embargo, al momento de compararlo con los grupos de SM estos tienen un decremento significativo, lo que está indicando una disminución en el sistema, ya que GPX no se encuentra detoxificando de manera correcta, llevando al organismo a un estado de estrés oxidativo. Esto lo podemos reforzar con lo que ocurre con los resultados de GSH, ya que estas 2 enzimas trabajan en conjunto contra el aumento de EROs. De acuerdo con lo obtenido de los resultados de GSH, la SM causó una disminución significativa en la actividad de GSH en hembras lo que favorece el aumento de la producción de EROs en el organismo, además, la oxidación excesiva en las células que causa una reducción de GSH/GSSG podría afectar a otros eventos celulares, como son el crecimiento, diferenciación celular y disfunción mitocondrial (Khorjahani et al., 2020; Yang et al., 2006). La familia de enzimas GST también son muy importantes para la protección celular, participan en la desintoxicación de productos oxidados mediante la conjugación de GSH con centros electrofílicos en sustratos tóxicos para producir productos no tóxicos (Cui et al., 2007). De acuerdo con nuestros resultados acerca de GST se obtuvo una disminución en el grupo de hiperrespuesta al estrés, lo que puede significar que las crías que fueron expuestas a una respuesta dinámica al estrés, es decir, estrés crónico + estrés agudo, tienen menor capacidad para eliminar a los xenobióticos y radicales libres lo que se manifiesta como una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo (Gawryluk et al., 2011).

La exposición al estrés provoca una sobreproducción de peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radical hidroxilo, lo que conduce a la peroxidación lipídica (Saribal et al., 2021). En lo que respecta a los parámetros de estrés oxidativo, los niveles de MDA aumentaron significativamente y la actividad de FRAP disminuyó, lo que indica un estado de estrés oxidativo y peroxidación lipídica (Nouri et al., 2020) debido a un aumento en la ruptura de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas lo que conduce a una serie de mecanismos moleculares causados por la SM que pueden incluir un aumento de estrés oxidativo y muerte celular (F. Wang et al., 2020).

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

El estrés oxidativo juega un papel importante en la muerte de células neuronales y la neurodegeneración. Estudios anteriores demostraron que experimentar estrés por separación materna a través de un aumento de los niveles de oxidantes como el MDA y una disminución de la capacidad antioxidante provocaba comportamientos similares a la ansiedad en la edad adulta (Nouri et al., 2020); debido a esto se cree que la SM induce cambios epigenéticos y pueden tener implicaciones para los trastornos del desarrollo neurológico (Drastichova et al., 2021).

También es importante mencionar que existen diferencias entre los géneros y los diferentes grupos, la posible explicación a esto es que el sexo parece ser un modulador de la función neuroendocrina (Tower et al., 2020). En comparación con los machos, las hembras muestran una respuesta del eje HPA más robusta, esto debido a los niveles circulantes de estradiol que elevan los niveles de la corticosterona durante factores de estrés (Tower et al., 2020). La presencia de hormonas gonadales durante el desarrollo puede afectar el estrés oxidativo ya que se ha reportado que el estradiol posee propiedades neuroprotectoras (Prediger ME y col 2000; Behl C y col 2000). En el caso de hembras se ha reportado que GPX se encuentra relacionada positivamente con estrógenos de suero, los cuales regulan positivamente SOD y GPX, MAP y NF- κ B, de manera que cuando se ven expuestas al estrés se incrementan los niveles de estas enzimas (Díaz-Castro J et al 2016). Además, los esteroides gonadales en las hembras durante el ciclo estral son un factor importante que contribuye a las diferencias sexuales en la robustez de la actividad del eje HPA; estos esteroides gonadales también pueden contribuir a las influencias epigenéticas en las hembras incluso antes de la pubertad (Pevzner, 2017). Para machos se ha reportado que tienen una sobreexpresión de citocinas proinflamatorias y que los biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación son mayores, por lo que tienen menor capacidad de resolver el daño oxidativo en comparación de hembras (Díaz Castro J y col 2016). Lo cual se comprueba en nuestros resultados de la actividad de las enzimas GSH y GST en condiciones de estrés agudo, en donde las hembras se encuentran aumentando su actividad enzimática para poder contrarrestar los efectos negativos de las EROs.

Se ha comprobado que las hembras con estrés postnatal muestran un mayor pico de niveles plasmáticos de corticosterona en la edad adulta en comparación con los machos (Brunton y Russell, 2010). Las hembras son más vulnerables a presentar alteraciones emocionales relacionadas al estrés vital temprano; la exposición a adversidades tempranas se asocia con niveles más altos de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) basal en hembras, pero niveles más bajos en los

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

machos, mientras que los traumas graves están relacionados con una mayor respuesta a un desafío de CRH sólo en machos (DeSantis et al., 2011).

10 CONCLUSIONES

Las actividades de las enzimas antioxidantes CAT, GPX, GST Y GR y el parámetro de estrés oxidativo (FRAP) se ven disminuidas en el hipocampo de ratas al ser sometidas a estrés postnatal y la actividad de MDA aumenta en estas mismas condiciones.

El estrés en etapas tempranas de la vida, ejemplificado por el modelo de SM, es un reto suficientemente fuerte para alterar la cantidad producida de GR en el hipocampo, lo cual provoca una disminución en la producción de receptores para GR y una sobreactivación del eje HPA, generando un estado de estrés oxidativo en el cerebro. Esto se comprobó con la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, GPX, GR, GST) y con el parámetro de estrés oxidativo (FRAP), corroborando este estado de estrés oxidativo con el aumento en la cantidad de MDA, evaluadas en el hipocampo de ratas sometidas a un modelo de SM.

Cabe resaltar que en este proyecto además de comparar los resultados en condiciones basales, se evaluó una respuesta dinámica al estrés en las crías, en donde pudimos observar que la actividad de las enzimas GPX, GSH, GST se encuentra aún más comprometida en una respuesta de hiperreactividad al estrés, que, en condiciones basales, esto mismo se pudo observar con la cantidad de MDA. Con esto se puede comprobar que el reto es aún más fuerte cuando las crías se ven expuestas a una doble situación de estrés, trayendo como resultado una disminución en el sistema de defensa antioxidante y por lo tanto un mayor aumento de EROs provocando un estado de estrés oxidativo en las crías, lo cual se ha relacionado con la aparición de alteraciones emocionales en la edad adulta.

En la Fig. 29 se esquematiza los resultados obtenidos de las crías de ratas expuestas a SM como estresor agudo, crónico y como respuesta dinámica al estrés (estrés agudo + estrés agudo) de machos y hembras.

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

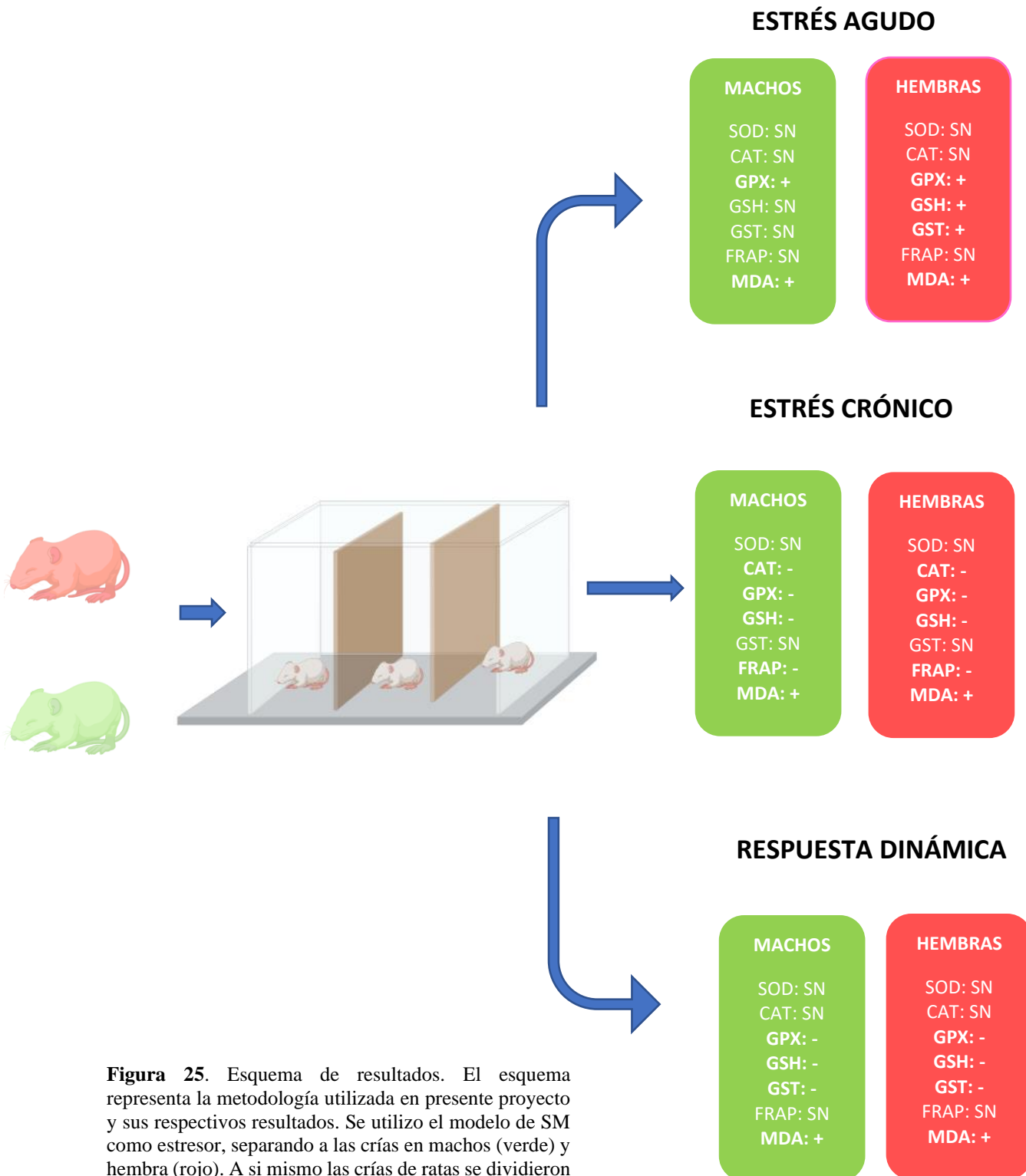


Figura 25. Esquema de resultados. El esquema representa la metodología utilizada en presente proyecto y sus respectivos resultados. Se utilizo el modelo de SM como estresor, separando a las crías en machos (verde) y hembra (rojo). A si mismo las crías de ratas se dividieron en 4 grupos (Control basal, control estrés, SM basal y SM estrés) que representan el grupo control, estrés agudo, estrés crónico y respuesta dinámica al estrés respectivamente.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aebi H. 1984, Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105(1),121-126. Ader, R. (2014). *Psychoneuroimmunology.* 10(3), 94–101.
2. Ader, R., Cohen, N., & Felte, D. (1995). Psychoneuroimmunology : interactions system and the immune system. *The Lancet*, 345(8942), 99–103.
3. Anand, K., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4), 239–246. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>
4. Arabi, M., Nasab, S. H., Lorigooini, Z., Boroujeni, S. N., Mortazavi, S. M., Anjomshoa, M., & Amini-Khoei, H. (2021). Auraptene exerts protective effects on maternal separation stress-induced changes in behavior, hippocampus, heart and serum of mice. *International Immunopharmacology*, 93(October 2020), 107436. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107436>
5. Arriza, J. L., Simerly, R. B., Swanson, L. W., & Evans, R. M. (1988). The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron*, 1(9), 887–900. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90136-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90136-5)
6. Baes, C. von W., Martins, C. M. S., de Carvalho Tofoli, S. M., & Juruena, M. F. (2014). Early life stress in depressive patients: HPA axis response to GR and MR agonist. *Frontiers in Psychiatry*, 5(JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2014.00002>
7. Behl C, Moosmann B, Manthey D, Heck S (2000) The female sex hormone oestrogen as neuroprotectant: activities at various levels. *Novartis Found Symp* 230:221–238
8. Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., & Heyden, Y. Vander. (2016). Determination of optimal extraction conditions for phenolic compounds from: *Pistacia atlantica* leaves using the response surface methodology. *Analytical Methods*, 8(31), 6107–6114. <https://doi.org/10.1039/c6ay01739h>
9. Benmhammed, H., El Hayek, S., Nassiri, A., Bousalham, R., Mesfioui, A., Ouichou, A., & El Hessni, A. (2019). Effects of lipopolysaccharide administration and maternal deprivation on anxiety and depressive symptoms in male and female Wistar rats: Neurobehavioral and biochemical assessments. *Behavioural Brain Research*, 362(November 2018), 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.005>
10. Benzie I.F.F. and Strain J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure

- of ‘Antioxidant Power’’: The FRAP Assay. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. 1996. 239, 70–76 ARTICLE NO. 0292
11. Berenzon, S., Lara, M. A., Robles, R., & Medina-Mora, M. E. (2013). Depresión: Estado del conocimiento y la necesidad de políticas públicas y planes de acción en México. *Salud Pública de México*, 55(1), 74–80. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342013000100011>
 12. Bresciani, G., da Cruz, I. B. M., & González-Gallego, J. (2015). Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Advances in Clinical Chemistry*, 68, 87–130. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.11.001>
 13. Brunton, P. J., and Russell, J. A. (2010). Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects. *J. Neuroendocrinol.* 22, 258–271. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.01969.x
 14. Capdevila, R. I. A. (2005). *Estrés*. 24.
 15. Carr, C. P., Martins, C. M. S., Stingel, A. M., Lemgruber, V. B., & Juruena, M. F. (2013). The role of early life stress in adult psychiatric disorders: A systematic review according to childhood trauma subtypes. *Journal of Nervous and Mental Disease*, 201(12), 1007–1020. <https://doi.org/10.1097/NMD.0000000000000049>
 16. Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). [136] Assay of catalases and peroxidases. {black small square}. *Methods in Enzymology*, 2(C), 764–775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
 17. Chen, Y., & Baram, T. Z. (2016). Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 197–206. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.181>
 18. Cirulli, F., Berry, A., & Alleva, E. (2003). Early disruption of the mother-infant relationship: Effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 73–82. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00010-1)
 19. Clarke, A. (2020). The First. *Phyllis*, 22, 76–76. <https://doi.org/10.2307/j.ctv18b5cjk.40>
 20. Corrales MSc, L. C., & Muñoz Ariza, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18), 213. <https://doi.org/10.22490/24629448.1010>
 21. Cui, J., Shao, L., Young, L. T., & Wang, J. F. (2007). Role of glutathione in neuroprotective

- effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. *Neuroscience*, 144(4), 1447–1453. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.010>
22. Dallé, E., Daniels, W. M. U., & Mabandla, M. V. (2020). Long-Term Treatment with Fluvoxamine Decreases Nonmotor Symptoms and Dopamine Depletion in a Postnatal Stress Rat Model of Parkinson’s Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 10–12. <https://doi.org/10.1155/2020/1941480>
23. Dallman, M. F., Akana, S. F., Cascio, C. S., Darlington, D. N., Jacobson, L., & Levin, N. (1987). Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. In *Recent progress in hormone research* (Vol. 43). ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571143-2.50010-1>
24. Delgado, S. C. (2017). Universidad Complutense de Madrid Un. *La Teisis Doctoral En Teorico y Empirico*, 1–55. <https://doi.org/ISBN: 978-84-693-1123-3>
25. DeSantis, S. M., Baker, N. L., Back, S. E., Spratt, E., Ciolino, J. D., Moran-Santa Maria, M., et al. (2011). Gender differences in the effect of early life trauma on hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning. *Depress. Anxiety* 28, 383–392. doi: 10.1002/da.20795
26. Diaz-Castro J, Pulido-Moran M, Moreno-Fernández J, Kajarabille N, de Paco C, Garrido-Sanchez M, Prados S, and Julio J. Ochoa JJ. 2016. Gender specific differences in oxidative stress and inflammatory signaling in healthy term neonates and their mothers. *Pediatric Res* 80(4): 595- 601. doi:[10.1038/pr.2016.112](https://doi.org/10.1038/pr.2016.112)
27. Diehl, L. A., Alvares, L. O., Noschang, C., Engelke, D., Andreazza, A. C., Gonçalves, C. A. S., Quillfeldt, J. A., & Dalmaz, C. (2012). Long-lasting effects of maternal separation on an animal model of post-traumatic stress disorder: Effects on memory and hippocampal oxidative stress. *Neurochemical Research*, 37(4), 700–707. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0660-6>
28. Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., & Radojicic, M. B. (2010). Chronic social isolation compromises the activity of both glutathione peroxidase and catalase in hippocampus of male Wistar rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(5), 693–700. <https://doi.org/10.1007/s10571-009-9493-0>
29. Dragoş, D., & Tănăsescu, M. D. (2010). The effect of stress on the defense systems. *Journal of Medicine and Life*, 3(1), 10–18.
30. Drastichova, Z., Rudajev, V., Pallag, G., & Novotny, J. (2021). Proteome profiling of different rat brain regions reveals the modulatory effect of prolonged maternal separation on proteins involved in cell death-related processes. *Biological Research*, 54(1), 1–32.

<https://doi.org/10.1186/s40659-021-00327-5>

31. Duval, Fabrice; González, Félix; Rabia, H. (2010). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331527722006>. *Revista Chilena de Neuropsiquiatría*, 48(4), 307–318.
32. Duvernoy, H., Cattin, F., & Risold, P. Y. (2013). Structure, functions, and connections. In *The human hippocampus* (pp. 5-38). Springer, Berlin, Heidelberg. 10.1007/978-3-642-33603-4_3
33. Esterbauer, H. (1996). Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathologie Biologie*, 44(1), 25–28.
34. Estr, E. L., Respuesta, C., Journal, I., Psychology, E., & Badajoz, M. (2006). El Estrés Como Respuesta. *International Journal of Developmental and Educational Psychology*, 1(1), 37–48.
35. Faravelli, C., Sauro, C. Lo, Lelli, L., Pietrini, F., Lazzeretti, L., Godini, L., Benni, L., Fioravanti, G., Talamba, G. A., Castellini, G., & Ricca, V. (2012). Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.org The Role of Life Events and HPA Axis in Anxiety Disorders: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 18, 5663–5674.
36. Filipović, D., Todorović, N., Bernardi, R. E., & Gass, P. (2017). Oxidative and nitrosative stress pathways in the brain of socially isolated adult male rats demonstrating depressive- and anxiety-like symptoms. *Brain Structure and Function*, 222(1). <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1218-9>
37. Fink, R. C., & Scandalios, J. G. (2002). Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399(1), 19–36. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2739>
38. Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., & Apanasets, O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1363–1373. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.001>
39. Gawryluk, J. W., Wang, J. F., Andreatza, A. C., Shao, L., Yatham, L. N., & Young, L. T. (2011). Prefrontal cortex glutathione S-transferase levels in patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*,

- 14(8), 1069–1074. <https://doi.org/10.1017/S1461145711000617>
40. González-torres, M. C., & Ortiz-muñiz, M. B. R. (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1), 3–9.
41. Green, J. G., McLaughlin, K. A., Berglund, P. A., Gruber, M. J., Sampson, N. A., Zaslavsky, A. M., & Kessler, R. C. (2010). Childhood adversities and adult psychiatric disorders in the national comorbidity survey replication I: Associations with first onset of DSM-IV disorders. *Archives of General Psychiatry*, 67(2), 113–123. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.186>
42. Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P., & Milgrom, E. (1996). Intracellular traffic of steroid hormone receptors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 56(1–6), 3–9. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00268-5](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00268-5)
43. Gunnar, M. R., & Quevedo, K. M. (2007). Early care experiences and HPA axis regulation in children: a mechanism for later trauma vulnerability. *Progress in Brain Research*, 167, 137–149. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)67010-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)67010-1)
44. Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (1990). *I Mol e ent colar l I rearranoe*. 129–135.
45. Hannula, D. E., & Duff, M. C. (2017). The Hippocampus from Cells to Systems: Structure, Connectivity, and Functional Contributions to Memory and Flexible Cognition. In *The Hippocampus from Cells to Systems: Structure, Connectivity, and Functional Contributions to Memory and Flexible Cognition* (Issue March). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50406-3>
46. Hernández-Saavedra, Daniel; McCord, J. (2008). Proliferación y apoptosis de linfocitos humanos cultivados inducidas por anión superóxido. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 46(5), 533–538. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457745523011>
47. Hill MN, McEwen BS. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Prog. Neuro-Psychopharm. & Biol. Psychiat.* 2009
48. Hofer, M. A. (1984). Relationships as regulators: a psychobiologic perspective on bereavement. *Psychosomatic Medicine*, 46(3), 183–197. <https://doi.org/10.1097/00006842-198405000-00001>
49. Hofer, Myron A., & Shair, H. (1978). Ultrasonic vocalization during social interaction and

- isolation in 2-week-old rats. *Developmental Psychobiology*, *11*(5), 495–504. <https://doi.org/10.1002/dev.420110513>
50. INEGI. (2015). Cifras de la *Encuesta Nacional de Los Hogares*, 38–41.
51. Jamuna Rani, A., & Mythili, S. V. (2014). Study on total antioxidant status in relation to oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *8*(3), 108–110. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7603.4121>
52. Julieta, C., Sandro, C., Reyes, P., Roel, P., & Javier, R. J. (2007). Actividad de la enzima glutatión S-transferasa T1 en floricultores expuestos a plaguicidas. *Bioquímica*, *32*(SuA), 138.
53. Juruena, Mario F. (2014). Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *Epilepsy and Behavior*, *38*, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.10.020>
54. Juruena, Mario Francisco. (2011). An integrative science approach: Neuroscience in the DSM-V and ICD-11. *Acta Neuropsychiatrica*, *23*(4), 143–144. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5215.2011.00584.x>
55. Kaufman, J., Plotsky, P. M., Nemeroff, C. B., & Charney, D. S. (2000). Effects of early adverse experiences on brain structure and function: Clinical implications. *Biological Psychiatry*, *48*(8), 778–790. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)00998-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)00998-7)
56. Kemeny, M. E. (2003). *Kemeny2003*. *12*(4), 124–129.
57. Khorjahani, A., Peeri, M., & Azarbayjani, M. A. (2020). The therapeutic effect of exercise on anxiety and bowel oxidative stress in the maternal separation animal model. *Basic and Clinical Neuroscience*, *11*(1), 69–78. <https://doi.org/10.32598/bcn.9.10.450>
58. Kloet, E. R. D. E., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., Pharmacology, M., & Amsterdam, L. (1998). Brain corticosterone receptor in health and disease*. *Endocrine Reviews*, *19*(3), 269–301.
59. Kuhn, C. M., Pauk, J., & Schanberg, S. M. (1990). Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Developmental Psychobiology*, *23*(5), 395–410. <https://doi.org/10.1002/dev.420230503>
60. Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G., & Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping

- behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 37(3), 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.07.011>
61. Liu J, Wang X, Shigenaga MK et al (1996) Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J* 10:1532–1538
62. Lorigooini, Z., Sadeghi Dehsahraei, K., Bijad, E., Habibian Dehkordi, S., & Amini-Khoei, H. (2020). Trigonelline through the Attenuation of Oxidative Stress Exerts Antidepressant- and Anxiolytic-Like Effects in a Mouse Model of Maternal Separation Stress. *Pharmacology*, 105(5–6), 289–299. <https://doi.org/10.1159/000503728>
63. Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(7), 1957–1997. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>
64. Lucca, G., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Vuolo, F., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Gavioli, E. C., & Quevedo, J. (2009). Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochemistry International*, 54(5–6), 358–362. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.01.001>
65. Maier, S. F., & Watkins, L. R. (1998). <*Cytokines for Psychologists Implications of Bidirectional Immune-to- brain communication re behavior mood and cogniiton.pdf*>. 105(I), 83–107.
66. Maklakov, A. A., & Lummaa, V. (2013). Evolution of sex differences in lifespan and aging: Causes and constraints. *BioEssays*, 35(8), 717–724. <https://doi.org/10.1002/bies.201300021>
67. Malcon, L. M. C., Wearick-Silva, L. E., Zaparte, A., Orso, R., Luft, C., Tractenberg, S. G., Donadio, M. V. F., de Oliveira, J. R., & Grassi-Oliveira, R. (2020). Maternal separation induces long-term oxidative stress alterations and increases anxiety-like behavior of male Balb/cJ mice. *Experimental Brain Research*, 238(9), 2097–2107. <https://doi.org/10.1007/s00221-020-05859-y>
68. Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family - An evolutionary overview. *FEBS Journal*, 275(15), 3959–3970. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x>
69. Marques, S. S., Magalhães, L. M., Tóth, I. V., & Segundo, M. A. (2014). Insights on antioxidant assays for biological samples based on the reduction of copper complexes-The

- importance of analytical conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 11387–11402. <https://doi.org/10.3390/ijms150711387>
70. Martins, C. M. S., Tofoli, S. M. de C., Baes, C. von W., & Juruena, M. (2011). Analysis of the occurrence of early life stress in adult psychiatric patients: A systematic review. *Psychology and Neuroscience*, 4(2), 219–227. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2011.2.007>
71. Mayor Oxilia, R. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Revista Del Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23–29.
72. McIntosh LJ, Cortopassi KM, Sapolsky RM (1998) Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. *Brain Res* 791:215–222
73. Medina, M., Sarti, E., & Real, T. (2015). La depresión y otros trastornos psiquiátricos. In *La depresión y otros trastornos psiquiátricos*. Documento de postura.
74. Menezes, J., Neves, B. H., Souza, M., & Mello-Carpes, P. B. (2017). Green tea protects against memory deficits related to maternal deprivation. *Physiology and Behavior*, 182(October), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.10.010>
75. Mercedes, M. (2015). *Consecuencias del estrés postnatal repetido y la exposición a etanol sobre la actividad del transportador de glutamato y la conducta en ratas*.
76. Mishra, P. K., Kutty, B. M., & Laxmi, T. R. (2019). The impact of maternal separation and isolation stress during stress hyporesponsive period on fear retention and extinction recall memory from 5-week- to 1-year-old rats. *Experimental Brain Research*, 237(1), 181–190. <https://doi.org/10.1007/s00221-018-5411-3>
77. Mogi, K., Nagasawa, M., & Kikusui, T. (2011). Developmental consequences and biological significance of mother-infant bonding. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(5), 1232–1241. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.08.024>
78. Murray, L. K., Nguyen, A., & Cohen, J. A. (2014). Child Sexual Abuse. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 23(2), 321–337. <https://doi.org/10.1016/j.chc.2014.01.003>
79. Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>
80. Nemeroff, B. (1984). *in Depressed*. February, 247–249.
81. Noschang, C., Krolow, R., Arcego, D. M., Marcolin, M., Ferreira, A. G., da Cunha, A. A.,

- Wyse, A. T. S., & Dalmaz, C. (2020). Early-life stress affects behavioral and neurochemical parameters differently in male and female juvenile Wistar rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 80(6), 547–557. <https://doi.org/10.1002/jdn.10050>
82. Nouri, A., Hashemzadeh, F., Soltani, A., Saghaei, E., & Amini-Khoei, H. (2020). Progesterone exerts antidepressant-like effect in a mouse model of maternal separation stress through mitigation of neuroinflammatory response and oxidative stress. *Pharmaceutical Biology*, 58(1), 64–71. <https://doi.org/10.1080/13880209.2019.1702704>
83. Nylander, I., & Roman, E. (2013). Is the rodent maternal separation model a valid and effective model for studies on the early-life impact on ethanol consumption? *Psychopharmacology*, 229(4), 555–569. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3217-3>
84. O’Mahony, S. M., Hyland, N. P., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2011). Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology*, 214(1), 71–88. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2010-9>
85. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95(2): 351-358
86. Olf, M. (1999). Stress, depression and immunity: The role of defense and coping styles. *Psychiatry Research*, 85(1), 7–15. [https://doi.org/10.1016/S0165-1781\(98\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0165-1781(98)00139-5)
87. P.M., P., & M.J., M. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*, 18(3), 195–200. [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L23130604%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/0169-328X\(93\)90189-V](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L23130604%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/0169-328X(93)90189-V)
88. Paredes Salido, F., & Roca Fernández, J. (2002). Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 21(7), 96–100.
89. Pevzner. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1369523>.Hypothalamic
90. Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular brain research*, 18(3), 195-200. Doi: [10.1016/0169-328X\(93\)90189-V](https://doi.org/10.1016/0169-328X(93)90189-V)
91. Prediger ME, Gamaro GD, Crema LM, Fontella FU, Dalmaz C (2004) Estradiol protects against oxidative stress induced by chronic variate stress. *Neurochem Res* 29:1923–1930

92. Pryce, C. R., Bettschen, D., & Feldon, J. (2001). Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Developmental Psychobiology*, 38(4), 239–251. <https://doi.org/10.1002/dev.1018>
93. Reiche, E. M., Odebrecht, S., Nunes, V., & Morimoto, H. K. (2004). For personal use. Only reproduce with permission from Elsevier Ltd 617 Stress, depression, the immune system, and cancer. *Oncology*, 5(October), 617–625. <http://oncology.thelancet.com>
94. Réus, G. Z., Fernandes, G. C., de Moura, A. B., Silva, R. H., Darabas, A. C., de Souza, T. G., Abelaira, H. M., Carneiro, C., Wendhausen, D., Michels, M., Pescador, B., Dal-Pizzol, F., Macêdo, D. S., & Quevedo, J. (2017). Early life experience contributes to the developmental programming of depressive-like behaviour, neuroinflammation and oxidative stress. *Journal of Psychiatric Research*, 95, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.08.020>
95. Riveros Barrera, I., & Dueñas, Z. (2014). Efecto de la alopregnanolona sobre la ansiedad en ratas con separación materna durante la lactancia. *Revista de La Facultad de Medicina*, 62(2), 229–236. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v62n2.45402>
96. Rodrigues, K. dos S., Klein, C. P., August, P. M., dos Santos, B. G., Hözer, R. M., Maurmann, R. M., Scortegagna, M. C., Hoppe, J. B., & Matté, C. (2020). Early weaning alters redox status in the hippocampus and hypothalamus of rat pups. In *International Journal of Developmental Neuroscience* (Vol. 80, Issue 6). <https://doi.org/10.1002/jdn.10047>
97. Rodríguez, D. A. L., & Gómez, Z. J. D. (2012). Efectos de la separación materna temprana sobre el desempeño en el laberinto en cruz elevado en ratas adultas. *Acta Biologica Colombiana*, 17(1), 129–142.
98. Rubin, R. D., Watson, P. D., Duff, M. C., & Cohen, N. J. (2014). The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8(SEP), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00742>
99. Saavedra P LM, Fenton-Navarro B and Torner L. 2018. Early life stress activates glial cells in the hippocampus but attenuates cytokine secretion in response to an immune challenge in rat pups. *Neuroimmunomodulation*. 2018 Jan 13; 1-14. doi: 10.1159/000485383
100. Salim, S. (2017). Oxidative stress and the central nervous system. *Journal of*

- Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 360(1), 201–205.
<https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503>
101. Saribal, D., Kireçtepe Aydın, A., Kılıç, M. A., Shakil, F., & Balkaya, M. (2021). Maternal neglect results in reduced telomerase activity and increased oxidative load in rats. *Stress*, 24(3), 348–352. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1777973>
102. Schmidt, M., Enthoven, L., Van Der Mark, M., Levine, S., De Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2003). The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 21(3), 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(03\)00030-3](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(03)00030-3)
103. Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent. *Analytical Biochemistry*, 25(C), 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
104. Shao, Y., Yan, G., Xuan, Y., Peng, H., Huang, Q. J., Wu, R., & Xu, H. (2015). Chronic social isolation decreases glutamate and glutamine levels and induces oxidative stress in the rat hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 282, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.01.005>
105. Spangenberg-Morelli, A. (2015). *Trabajo Final de Grado: Neurobiología del estrés*.
106. Spencer, R. L., Kim, P. J., Kalman, B. A., & Cole, M. A. (1998). Evidence for mineralocorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor-dependent regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Endocrinology*, 139(6), 2718–2726. <https://doi.org/10.1210/endo.139.6.6029>
107. Spiers, J. G., Chen, H. J. C., Sernia, C., & Lavidis, N. A. (2015). Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Frontiers in Neuroscience*, 9(JAN), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00456>
108. Stípek S, Měchurova A, Crkovská J, Zima T, Pláteník J. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in umbilical and maternal blood. *Biochem Mol Biol Int* 1995;35:705–11.
109. Stojanovich, L. (2010). Stress and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 9(5), A271–A276. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.11.014>
110. Tapia-Saavedra, A. (2005). Estrés oxidativo y depresión. ¿Un posible rol etiológico? *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria*, 43(4), 329–336. <https://doi.org/10.4067/s0717-92272005000400007>

111. Tower, J., Pomatto, L. C. D., & Davies, K. J. A. (2020). Sex differences in the response to oxidative and proteolytic stress. *Redox Biology*, 31(March). <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101488>
112. Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
113. Uysal, N., Gonenc, S., Acikgoz, O., Pekçetin, Ç., Kayatekin, B. M., Sonmez, A., & Semin, I. (2005). Age-dependent effects of maternal deprivation on oxidative stress in infant rat brain. *Neuroscience Letters*, 384(1–2), 98–101. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.04.052>
114. Van Bodegom, M., Homberg, J. R., & Henckens, M. J. A. G. (2017). Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(April), 1–33. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00087>
115. Wang, C. Y. (1995). Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology*, 5(1–2), 67–76. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(94\)00020-S](https://doi.org/10.1016/0925-5214(94)00020-S)
116. Wang, F., Huang, S., Xia, H., & Yao, S. (2020). Specialized pro-resolving mediators: It's anti-oxidant stress role in multiple disease models. *Molecular Immunology*, 126(1277), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.07.017>
117. Wang, X., & Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2(MAR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>
118. Weaver, I. C. G., Diorio, J., Seckl, J. R., Szyf, M., & Meaney, M. J. (2004). Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: Characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024, 182–212. <https://doi.org/10.1196/annals.1321.099>
119. Won, E., & Kim, Y.-K. (2016). Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Stress, the Autonomic Nervous System, and the Immune-kynurenine Pathway in the Etiology of Depression. *Current Neuropharmacology*, 14, 665–673. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666151208113>
120. Yang, M. S., Chan, H. W., & Yu, L. C. (2006). Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to

“EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS”

- oxidative stress. *Toxicology*, 226(2–3), 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.008>
121. Zalba, G., San José, G., Moreno, M. U., & Díez, J. (2003). Papel del anión superóxido en la fisiopatología de las enfermedades vasculares. *Nefrología*, 23(SUPPL.4), 13–20.
122. Zárate, S., Acevedo-Triana, C. A., Sarmiento-Bolaños, M., Cardenas P, L. F., & León, L. A. (2014). Efectos del estrés sobre los procesos de plasticidad y neurogénesis: una revisión. *Universitas Psychologica*, 13(3). <https://doi.org/10.11144/javeriana.upsy13-3.eepp>