

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

Efecto del tamaño de la camada sobre la vulnerabilidad y resiliencia

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

Maritza Montserrat Cervantes Palacios

Director: Dr. Emilio Domínguez Salazar †
Directora: Dra. Beatriz Gómez González

Asesor interno: Dr. Marcel Pérez Morales
Asesor externo: Dr. Kurt L. Hoffman

Enero del 2020

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 637712

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “Efecto del tamaño de la camada sobre la vulnerabilidad y resiliencia”, que presentó

Maritza Montserrat Cervantes Palacios

El día 29 de enero del año 2020

Presidente: Dr. Javier Velázquez Moctezuma. Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana.

Secretario: Dr. Óscar González Flores. Laboratorio de Neuroendocrinología Celular y Molecular, Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Vocal 1: Dr. Kurt Leroy Hoffman. Laboratorio de Neurobiología y Trastornos Psiquiátricos. Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Vocal 2: Dra. Gabriela Hurtado Alvarado. Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana.

Miembros del comité de tutores:

Director:

Dr. Emilio Domínguez Salazar †. Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

Asesores:

Dr. Kurt Hoffman. Laboratorio de Neurobiología y Trastornos Psiquiátricos. Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Dr. Marcel Pérez Morales. Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana - Lerma.

Al Doctor Emilio por enseñarme que la ciencia es el lugar perfecto para imaginar, para tener creatividad, pero también para ser una mejor persona y ayudar a los demás.

Agradecimientos

Gracias Mamá por apoyarme en éste y todos mis proyectos, por ser la inspiración para superarme en todos los ámbitos de mi vida y por estar a mi lado cada vez que te necesité, tomando mi mano para seguir caminando siempre.

Miguel, Joshua y Arantza, gracias por estar en los momentos más difíciles y también en el día a día sacandome siempre una sonrisa junto con José Miguel.

Eduardo, te agradezco todo el amor y el apoyo siempre constante, gracias por escucharme en mis crisis y en mis momentos de inspiración, gracias por dejar todo a un lado y estar junto a mí en mi momento más difícil.

Ady y Alejandro, gracias por brindarme un hogar cuando recién llegue a esta ciudad, por ayudarme a encontrar mi lugar y estar siempre pendiente de mí.

Agradezco a Diana y Laura por escuchar mis ideas y desventuras cada día, gracias por su amistad sincera y apoyo incondicional.

Iza y Dani, gracias por brindarme su amistad desde el momento en que llegue a esta gran ciudad, por apoyarme a veces con trámites y a veces con palabras de aliento.

Mariely, Fer, Ariel y mis compañeros de laboratorio, gracias sus enseñanzas y ayuda en el laboratorio, pero sobre todo, gracias por compartir un cachito de sus vidas conmigo y hacer ligera la carga de trabajo.

Doctora Jatziri, gracias por apoyarme y darme su opinión sobre detalles de este trabajo, gracias por sus consejos y sobre todo por su amistad.

Doctora Gaby, agradezco sus ideas sobre los resultados de este trabajo que me inspiraron a discutir, gracias porque en poco tiempo me enseñó a pensar creativamente.

Doctor Kurt y Doctor Marcel, gracias por todo su apoyo en la realización de este trabajo, por darme sus consejos y compartir sus ideas conmigo.

Doctor Javier, gracias por enseñarme que la investigación es un trabajo que se debe disfrutar cada día y que nos abre las puertas para ayudar a la sociedad.

Doctora Bety, le agradezco infinitamente todo el apoyo que me ha dado durante estos dos años, gracias por darme palabras de aliento cuando pensé que no podía seguir, gracias por inspirarme a aprender cada día más, por ser para mí, un ejemplo a seguir.

Resumen Español

Introducción. Algunos individuos presentan resistencia a ciertos desórdenes y enfermedades, incluso en condiciones adversas (resiliencia), mientras que otros son más susceptibles a éstas (vulnerabilidad). La modificación del tamaño de camada de la rata del laboratorio es un método a menudo utilizado para modelar y estudiar los procesos y efectos fisiológicos asociados con la obesidad y desnutrición. En nuestro laboratorio, estudios anteriores con este modelo daban indicios de que la disminución de tamaño de camada afecta de manera negativa el comportamiento sexual, la memoria y el aprendizaje, mientras que sucede lo contrario con las crías de camada grande. Por tanto, en el presente estudio analizamos los efectos del tamaño de camada sobre la vulnerabilidad. *Metodología.* Camadas grandes (CG) fueron formadas con 16 crías, camadas controles (CC) con 9 crías y camadas pequeñas (CP) con 3 crías. Se hicieron pruebas de reconocimiento de objetos y de laberinto elevado a los 2, 4 y 6 meses de edad. Además se restringió de sueño a los animales para evaluar la permeabilidad de la barrera en los diferentes grupos experimentales, esto se realizó a los 3 meses de edad. Por último se realizó una prueba de condicionamiento de preferencia de lugar con un agonista dopaminérgico (CPL) a los 4 meses de edad. *Resultados.* Observamos que los animales de CG presentaron mejor memoria declarativa que los de CP y menor ansiedad comparados con los de CC y CP. El efecto en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica presentó variabilidad dependiendo de la región cerebral; sin embargo, hubo un aumento en la permeabilidad en los animales de CP, especialmente en el hipotálamo, y hubo una recuperación de permeabilidad en animales de CG a los 10 días de restricción. La

prueba de CPL mostró que los animales criados en CP tienen tendencia a la aversión por el agonista, sin embargo, ninguna camada mostró efectos en preferencia de recompensa relacionados con el agonista dopaminérgico. *Conclusiones.* Los animales de CG mostraron mejor memoria, menores niveles de ansiedad y mejor respuesta a la restricción de sueño que lo de CC y CP. Estos resultados muestran que la CG y la CP pueden ser utilizados como modelos para estudiar e identificar mecanismos fisiológicos asociados con los fenotipos de resiliencia y vulnerabilidad, respectivamente.

Resumen (Abstract) en inglés

Some individuals show resistance to diseases and disorders even under adverse conditions (resilience), and others are more susceptible to them (vulnerability). Modifying litter size is a common method to study obesity and malnutrition, and its effects. Previous studies in our laboratory suggested that litter size negatively impacts sexual behavior, memory, and learning. Therefore, we analyzed if vulnerability and resilience depend on litter size, making this manipulation a suitable model to study them. Large litters (LL) were formed using 16 pups, control litters (CL) by 9 pups and small litters (SL) by 3 pups.

Object recognition and elevated plus maze tests were performed at 2, 4 and 6 months of age. Also, at 3 months of age, we put animals under sleep restriction to evaluate the brain-blood barrier permeability in the different experimental groups. Lastly, a conditioned place preference (CPL) to a dopamine agonist was performed at 4 months of age. We observed that LL animals had better declarative memory than SL and less anxiety than CL and SL. The effect on the brain-blood barrier permeability was dependent of brain region, however, there was a higher loss of permeability in SL, especially on the hypothalamus, and the recovery of permeability was faster in LL. The CPL test showed that animals raised in SL have a tendency to agonist aversion, however, none of the litters showed an effect on reward preference related to de dopamine agonist. LL animals showed better memory, lower anxiety levels, and best response to sleep restriction than CL and SL. These results show that LL can be used as a model of resiliency and SL as a model of vulnerability.

INTRODUCCIÓN	1
TRASTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS Y SU ASOCIACIÓN CON LA OBESIDAD	1
RESILIENCIA Y VULNERABILIDAD	3
MODELANDO SÍNTOMAS NEUROPSIQUIÁTRICOS EN ANIMALES DEL LABORATORIO.	4
MODELOS ANIMALES DE RESILIENCIA Y VULNERABILIDAD.	5
ANTECEDENTES.....	8
JUSTIFICACIÓN.....	13
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
ANIMALES	16
MANIPULACIÓN DE CAMADA.....	16
PRUEBA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS	17
PRUEBA DE LABERINTO ELEVADO.....	18
PRUEBA DE CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA DE LUGAR.....	19
RESTRICCIÓN DE SUEÑO	21
ENSAYOS DE PERMEABILIDAD DE LAS BARRERAS BIOLÓGICAS.....	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
RESULTADOS.....	25
RECONOCIMIENTO DE OBJETOS A LOS 2 MESES DE EDAD	25
RECONOCIMIENTO DE OBJETOS A LOS 4 MESES DE EDAD	27
RECONOCIMIENTO DE OBJETOS A LOS 6 MESES DE EDAD	28
LABERINTO ELEVADO A LOS 2 MESES DE EDAD.....	30
LABERINTO ELEVADO A LOS 4 MESES DE EDAD.....	31
LABERINTO ELEVADO A LOS 6 MESES DE EDAD.....	33
CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA DE LUGAR	35
ENSAYOS DE PERMEABILIDAD DE LAS BARRERAS BIOLÓGICAS A NA-FLUORESCÉINA Y AZUL DE EVANS	36
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	46
REFERENCIAS	47

Introducción

Algunos individuos presentan resistencia a ciertos desórdenes y enfermedades, incluso en condiciones adversas (resiliencia), mientras que otros son más susceptibles a éstas (vulnerabilidad). El estudio de los factores que median la resiliencia a las enfermedades relacionadas con el estrés es un área importante de investigación y los modelos animales representan beneficios potenciales para la salud humana, así como la oportunidad de aumentar nuestra comprensión de los mecanismos involucrados en los procesos de vulnerabilidad/resiliencia. Utilizando un modelo animal, el presente estudio se enfoca en la relación entre la nutrición durante el desarrollo temprano y la vulnerabilidad (y resiliencia) a alteraciones cognitivas-conductuales durante la etapa adulta.

Trastornos Neuropsiquiátricos y su asociación con la obesidad

Los trastornos neuropsiquiátricos son un grupo de síndromes que se caracterizan por presentar anormalidades en la cognición, conducta y/o emociones. En el 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que estos desórdenes afectan a millones de personas en todo el mundo, cada año, por ejemplo: depresión, 151.2 millones; desorden bipolar, 29.5 millones; esquizofrenia, 26.3 millones; Alzheimer y otros tipos de demencia, 24.2 millones. Tan sólo en México, la OMS reporta que uno de cada cuatro mexicanos entre 18 y 65 años de edad ha presentado algún trastorno mental (Rodríguez, 2009).

Según la OMS, en cualquier región del mundo, los trastornos neuropsiquiátricos son responsables de aproximadamente un tercio de la discapacidad adulta, medida por los años de vida saludable perdidos como consecuencia de haber vivido en un estado de salud inferior al óptimo. En el año 2000 el Banco Mundial calculó que los padecimientos neurológicos y psiquiátricos contribuyen con 12% del costo total de las enfermedades médicas y se estima que estas cifras van en aumento.

Asimismo, se ha observado que hay comorbilidad entre ciertos trastornos neuropsiquiátricos y la obesidad. Por ejemplo, las personas obesas tienen una probabilidad del 60% mayor de padecer depresión que las personas no obesas (Strine, 2008), la obesidad afecta el rendimiento cognitivo durante la adolescencia (Yau, 2012) y su presencia en una edad mediana puede facilitar la ocurrencia de demencia en una edad avanzada. Por otro lado, la pérdida de peso ya sea por dieta o por cirugía bariátrica, se ha asociado con mejoras en la cognición y en el estado de ánimo (Siervo, 2011).

De manera complementaria, se ha observado que, en comparación con personas sanas, quienes padecen trastornos del estado del ánimo exhiben más comportamientos poco saludables, asociados con la obesidad, tales como tabaquismo, consumo excesivo de alcohol e inactividad física (Strine et. al., 2006).

A pesar del impacto negativo que representan estos desordenes para la salud pública, el progreso en la comprensión de su fisiopatología ha sido lento y las opciones terapéuticas han avanzado poco con el paso de los años. Por lo tanto, en

años recientes, la comunidad científica se ha enfocado en el estudio de la resiliencia (Southwick et al., 2014), ya que una comprensión de los factores y procesos que promover la resiliencia puede llevar al descubrimiento de nuevos enfoques terapéuticos basados en la *prevención* del desarrollo de trastornos mentales, así como el tratamiento de trastornos ya existentes.

Resiliencia y Vulnerabilidad

Las enfermedades neuropsiquiátricas tienen una estrecha relación con el estrés y suelen desencadenarse después de que el individuo sufre periodos de adversidad o un evento traumático; sin embargo, esto sucede solo en ciertos individuos (vulnerables), mientras que la mayoría son resistentes al desarrollo de este tipo de enfermedades (resilientes). Estos fenotipos contrarios son nombrados vulnerabilidad y resiliencia (Karatsoreos & McEwen, 2011).

Aunque el término **resiliencia** ha sido empleado en diversas disciplinas y con distintas connotaciones, en este trabajo se definió como la capacidad y el proceso dinámico de superar de forma adaptativa la adversidad mientras se mantiene el funcionamiento psicológico y físico normal (Russo et al., 2012; Southwick and Charney, 2012). Por otro lado, la **vulnerabilidad** es la propensión de un organismo a sufrir cambios psicológicos o fisiológicos significativos como consecuencia de su interacción con eventos externos o internos (Wu et al., 2013). En las últimas dos décadas se han generado algunos modelos animales de resiliencia/vulnerabilidad. Sin embargo, antes de detallar en qué consisten estos modelos, es necesario

considerar brevemente cómo se miden y cuantifican en animales, fenotipos y conductas relevantes a los trastornos neuropsiquiátricos.

Modelando síntomas neuropsiquiátricos en animales del laboratorio.

En primer lugar, es necesario señalar que algunos aspectos de las enfermedades psiquiátricas son prácticamente imposibles de cuantificar y modelar en la mayoría de los animales, como el caso de depresión: sentimientos de culpa o tendencias suicidas. Por lo tanto, estudios que utilizan animales para modelar trastornos neuropsiquiátricos aplican pruebas validadas que replican procesos cognitivos-conductuales relevantes a un dado síntoma neuropsiquiátrico. Por ejemplo, pruebas relevantes a la depresión se centran en parámetros como la pérdida de disfrute (anhedonia), pérdida de motivación, trastornos del sueño, ansiedad o déficit cognitivo (Fernando & Robbins, 2011), las cuáles sí pueden ser cuantificadas en animales.

Al hacer modelos animales de enfermedades neuropsiquiátricas, también debe considerarse que los trastornos neuropsiquiátricos tienden a tener una superposición significativa en la sintomatología o los síntomas que caracterizan a un trastorno u otro cambian constantemente según la edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM) que se este consultando. Por ello, cuando se trata de modelos animales, en lugar de enfocarse en síndromes completos, es más válido centrarse en síntomas y/o signos bien comprendidos (Fernando & Robbins, 2011). Debido a estas consideraciones, en este trabajo se hacen pruebas para evaluar la vulnerabilidad y resiliencia en síntomas comunes de ciertas enfermedades

neuropsiquiátricas, de manera que se pueda probar la funcionalidad del modelo en general, en lugar de una o dos enfermedades neuropsiquiátricas determinadas.

Modelos animales de resiliencia y vulnerabilidad.

Existen tres enfoques principales que se han usado para hacer modelos de vulnerabilidad y resiliencia. Un enfoque es la modificación genética, resultando en animales *knock-out* (KO) o transgénicos (*knock-in*) para genes específicos seleccionados. Con este enfoque Wagner et al. (2011) hicieron un KO de receptores a glucocorticoides expresados selectivamente en la hipófisis y observaron mayores niveles de ansiedad en el *wild-type* (WT) pero no en el KO al ser expuestos a estresores. Resultados similares se encontraron en KO de Fkbp5 (Hartmann et al., 2012), pero para un KO de VGLUT1 se observó un fenotipo de vulnerabilidad en pruebas de preferencia por sacarosa y nado forzado a comparación del WT (Sanacora, 2012). Los animales KO pueden proporcionar información sobre la función general del gen investigado, pero en la mayoría de los casos, este enfoque ignora el hecho de que los genes a menudo tienen funciones diferentes y potencialmente opuestas en diferentes tejidos o tipos de células (Refojo et al., 2011). Además de ello este tipo de modelo es difícil de trasladar a humanos ya que la resiliencia y vulnerabilidad son resultado de varios factores y no producto de un solo gen.

Otra estrategia para estudiar la vulnerabilidad y la resiliencia consiste en recurrir a la selección de subpoblaciones, Ésta se basa en la heterogeneidad intrínseca de

poblaciones enteras, en la que se investigan una o más características y los animales se agrupan en subpoblaciones basadas, por ejemplo, en el rendimiento en una prueba de comportamiento. Por ejemplo, Bergström et al. (2008) utilizaron el estrés leve crónico (CMS, por sus siglas en inglés -también llamado estrés variable crónico) para provocar un fenotipo anhedónico en ratas. Es importante señalar que no todas las ratas desarrollaron este fenotipo y que la cohorte se dividió en animales resilientes a CMS y animales susceptibles a CMS. De este modo, los autores pudieron identificar cambios fisiológicos moleculares en estos subfenotipos. En contraste con los modelos transgénicos, este enfoque abre paso estudios de genoma completo. Pero también tiene sus desventajas, una de ellas es la dificultad para encontrar un criterio de selección, además, está el problema de que la caracterización de subpoblaciones se realiza después de la exposición al estrés, lo que evita establecer relaciones claras sobre la causalidad de las variaciones fenotípicas en la vulnerabilidad al estrés.

Otro ejemplo de selección de subpoblaciones es el estudio realizado por Hodes et al. (2015), en el cual mostraron que la resiliencia al desarrollo de fenotipos conductuales similares a la depresión después de la exposición a estrés por la prueba de derrota social se asocia con diferencias en el sistema inmune como una disminución de moléculas pro-inflamatorias circulantes. Aunque todavía no está completamente claro si la resiliencia es la causa o la consecuencia de estas diferencias en el sistema inmune, la evidencia reciente sugiere que debería ser posible revertir las consecuencias nocivas del estrés al reducir la inflamación que produce. Además, se

ha planteado la hipótesis de que las moléculas pro-inflamatorias circulantes, liberadas en respuesta a la exposición al estrés crónico, penetran la barrera hematoencefálica (BHE) y afectan los circuitos neuronales que median la vulnerabilidad al estrés y la depresión (Felger et al., 2015). Por lo tanto, es posible que la diferencia entre poseer resiliencia o vulnerabilidad dependa de la salud neurovascular y el mantenimiento de la integridad del BHE para evitar que las moléculas inflamatorias inducidas por el estrés entren en las estructuras cerebrales relacionadas con el estado de ánimo (Ménard et al., 2017).

Un último enfoque para evaluar vulnerabilidad y resiliencia sería la crianza selectiva, en la que la separación de subpoblación puede usarse como un factor para mejorar las diferencias en los subgrupos. Después de algunas generaciones, el fenotipo de las líneas de reproducción diverge y permite una mayor caracterización e investigación de los principios moleculares subyacentes o el uso como modelo de enfermedad. Empleando este modelo, han sido criadas ratas con altos o bajos niveles de comportamiento exploratorio (denominados de alta respuesta y de baja respuesta) y han sido evaluados tanto la anhedonia como la ansiedad (Stedenfeld et al., 2011). Otro ejemplo, es la línea de ratón reactivo a estrés. Este ratón exhibe patrones de sueño alterados y déficits cognitivos (Touma et al., 2008). Las mismas ventajas que se ven con la selección de subpoblaciones se aplican aquí también; sin embargo, ya que las diferencias fenotípicas están presentes antes de la exposición al estrés, el diseño cuidadoso del estudio permite la identificación de factores causales. Sin embargo, la cría selectiva es un enfoque costoso y lento. Además, la posibilidad

de una deriva genética, que podría causar un cambio en el fenotipo, se puede minimizar, pero nunca se puede prevenir por completo.

Antecedentes

Una de las aproximaciones empleadas para inducir obesidad en roedores, consiste en reducir el tamaño de la camada a tres crías, en el día postnatal 3 (Pérez-Morales et al., 2018, Plagemann et al., 1992; Rodrigues et al., 2011), mientras que para inducir la desnutrición se emplea un modelo que consiste en aumentar el tamaño de la camada (Patterson et al., 2010). En este sentido, se han reportado camadas de 12 crías, manipuladas en el día postnatal 1 (Sarmiento et al., 2012), ó camadas de 16, separados en el día postnatal 2 (Patterson et al., 2010).

Efectos metabólicos del tamaño de camada. Diversos estudios han mostrado que, cuando el tamaño de camada es modificado a uno extremadamente pequeño (3- 4 crías por camada) o extremadamente grande (15-18 crías por camada), producen cambios en las propiedades de la leche materna que generan cambios metabólicos que afectan permanentemente a las crías. Por ejemplo: la reducción del tamaño de la camada natural a la mitad del número de crías, promueve la sobrealimentación temprana y trae por consecuencia hiperglucemia, rápida acumulación de grasa y obesidad (Boullu-Ciocca et al., 2005). En la adultez los animales continúan mostrando alteraciones como sobrepeso, hiperfagia, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, dislipidemia (Plagemann et al., 1999), aumento de la presión arterial y glomeruloesclerosis (Boubred et al., 2009). Por el contrario, el aumento del

tamaño de camada genera desnutrición en las crías debido a una mayor competencia por el alimento, hipoinsulinemia y reducción del crecimiento del cuerpo después del periodo de lactancia (Vickers et al., 2000). En la etapa adulta, estos animales presentan menos grasa y peso corporal que las ratas de camada pequeña, independientemente de la dieta que consuman (Faust et al., 1980).

Efectos neurobiológicos y cognitivos del tamaño de camada. Las ratas pueden sufrir diversas modificaciones a nivel central derivadas de la dieta, tanto en el periodo neonatal como en la vida adulta. En 2008, Farr et al. hicieron estudios sobre los efectos de la dieta sobre la memoria y mostraron que los triglicéridos perjudican el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (dependiente de receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA)) del hipocampo; de igual manera los ratones con obesidad se desempeñaron peor que los controles en pruebas de aprendizaje de referencia del hipocampo y tareas de memoria (laberinto de agua y laberinto en T), memoria no hipocampal dependiente de respuesta (presión de palanca), episódica (laberinto en T y laberinto de agua), de procedimiento (presión de palanca), recompensa (presión de palanca) evitación de aversión (laberinto en T) indicando que la obesidad afecta varios aspectos de la cognición. En el mismo sentido, la obesidad inducida por reducción de tamaño de camada, deteriora la memoria espacial y los niveles de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) del hipocampo, y aumenta la IL-1 β del hipocampo en ratones de la línea NMRI a comparación de los controles (Salari, 2018). Dichos resultados podrían indicar que las ratas macho de camada pequeña tendrían también características para

establecerse como animales vulnerables en funciones cognitivas. Por otro lado, el aumento del tamaño de camada, provoca que las crías puedan experimentar un desarrollo generalmente más lento de varias funciones fisiológicas (Rödel et al., 2008), en particular, la respuesta al estrés adrenocortical, que se sabe, madura durante las primeras semanas postnatales (Sapolsky et al., 1986). En crías provenientes de camadas grandes se han observado tanto deficiencias en la capacidad de aprendizaje espacial (Jordan et al., 1981) como capacidades normales (Campbell et al., 1989). Aunque estos últimos resultados parecen contradictorios, podrían deberse a diferencias en el tipo y gravedad de la desnutrición provocada con el protocolo experimental (Laus et al., 2011). De hecho, otros estudios han mostrado que la restricción calórica y el ejercicio podrían ser eficaces para revertir el deterioro cognitivo (Nichol et al., 2009). En un modelo de desnutrición inducido por reducción de alimento (recibiendo 80% menos alimento que los controles), se vio una mejoría en la memoria en la prueba de reconocimiento de objetos en comparación con los controles (Molz et al., 2016). Por lo tanto, se sugiere que las ratas de camada grande podrían tener características de resiliencia.

Efectos conductuales del tamaño de camada. En la parte de antecedentes conductuales la información existente es menor, pero se sabe que el tamaño pequeño de camada resultó en un aumento significativo en los comportamientos similares a la ansiedad, asimismo, se observó un aumento en ciertos indicadores fisiológicos referentes al estrés, como la corticosterona (análoga al cortisol), en ratones de la línea NMRI (Salari et al., 2018). También se sabe que la obesidad está

relacionada con un aumento en los niveles de ansiedad. En un estudio reciente, se examinaron los efectos de la dieta y la obesidad en los comportamientos similares a la ansiedad en ratas Sprague-Dawley criadas de forma selectiva para ser propensas a la obesidad (PrO) o resistentes a la obesidad (ReO); se descubrió que, cuando las ratas PrO y ReO no presentan diferencias en peso o tejido graso, las medidas de comportamiento similar a la ansiedad en el laberinto elevado en cruz y en el campo abierto son similares entre los dos grupos. Sin embargo, una vez que el peso del tejido graso difiere, surgen diferencias significativas entre grupos, con una mayor ansiedad en las ratas propensas a la obesidad. Además, se observó una correlación positiva entre los comportamientos similares a la ansiedad y la adiposidad en ratas machos (Alonso-Caraballo et al., 2019). Del otro del lado, Bulfin et al. (2011) al investigar la respuesta del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal, observaron que el aumento de camada lleva a una disminución en indicadores endócrinos del estrés y la ansiedad en ratas macho Wistar. Estos datos sugieren que inducir obesidad por reducción de tamaño de camada, también podría modificar los niveles de ansiedad de ratas macho Wistar, así proporcionando un modelo posible de vulnerabilidad. Por otro lado, el aumento del tamaño de la camada podría propiciar un fenotipo resiliente al estrés y a la ansiedad.

Relación entre la obesidad, los procesos de recompensa, y la adicción. La alta ingesta de alimentos que se ve en la camada pequeña, es un efecto que también puede ser generado por condiciones adversas, se ha sugerido que está relacionada con el circuito de recompensa cerebral y la adicción (Adam & Epel, 2007). Tanto el

estrés como los alimentos apetitosos pueden estimular la liberación de opioides endógenos (Colantuoni et al., 2002). A su vez, la liberación de opioides parece ser parte del poderoso mecanismo de defensa de un organismo contra los efectos perjudiciales del estrés al disminuir la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) y atenuar así la respuesta al estrés (Drolet et al., 2001). La estimulación repetida de las vías de recompensa a través de la estimulación del eje HHA inducida por estrés y la ingesta de alimentos altamente apetecibles o ambos, puede conducir a adaptaciones neurobiológicas que promuevan la naturaleza compulsiva de comer en exceso. El cortisol puede influir en el valor de la recompensa de los alimentos a través de mediadores neuroendocrinos/peptídicos como la leptina, la insulina y el neuropéptido Y (NPY) (Adam & Epel, 2007). Mientras que los glucocorticoides son antagonizados por insulina y leptina de forma aguda, bajo estrés crónico, el equilibrio de ese sistema está desregulado, lo que posiblemente contribuye a una mayor ingesta de alimentos y acumulación de grasa visceral (Adam & Epel, 2007). Esta información sugiere que al modificar el tamaño de camada podría haber afectaciones en el sistema de recompensa debido al perfil nutricional.

Como contraparte, se ha probado que las ratas macho criadas en camada grande presentan una respuesta disminuida al estrés y son menos ansiosas que los controles, además de presentar una activación atenuada del núcleo paraventricular del hipotálamo en respuesta al estrés psicológico y respuestas de corticosterona que regresan más rápidamente al valor basal que los controles (Bulfin et al., 2011). Este

mismo grupo de investigadores comprobó posteriormente, que las ratas de camada grande parecen resistir al estrés inducido a edad temprana por separación de la madre, la separación se realizó durante una hora en el día postnatal 10, además observaron una reducción en los indicios de depresión en las ratas de camada grande en este modelo (Clarke et al., 2013).

Finalmente, en nuestro grupo de trabajo, resultados preliminares muestran que las ratas macho criadas en camada pequeña presentan nulo reconocimiento del objeto novedoso en una prueba de reconocimiento de objetos, (indicando alteraciones en la memoria declarativa), conducta sexual disminuida (Dorantes et la., 2019) y un aumento en la sensibilidad a la morfina en una prueba de condicionamiento de preferencia de lugar (Pérez-Morales et al., 2020, en preparación). Por el contrario, despliegan buen desempeño en la prueba de reconocimiento de objetos y un aumento en la conducta sexual comparado a los machos control (Dorantes, 2019).

Justificación

Los resultados preliminares obtenidos en el laboratorio con modelos experimentales de obesidad y de desnutrición inducidas por manipulación del tamaño de la camada, sugieren que su comportamiento en pruebas de conducta sexual y de memoria son opuestos entre sí: los animales de camada pequeño muestran pobre desempeño en estas pruebas mientras que los de camada grande muestran buen desempeño. Estos resultados sugieren que animales de camada pequeña y de camada grande podrían ser modelos útiles para la vulnerabilidad y resiliencia, respectivamente. Por

lo tanto, nuestro objetivo fue comprobar si estos modelos pudieran ser empleados como modelos de vulnerabilidad (camada pequeña) y de resiliencia (camada grande). Para llevar a cabo este propósito fue necesario demostrar que ambos modelos se comportan de manera antagónica en pruebas farmacológicas, conductuales y cognitivas. En este trabajo fueron empleadas cuatro pruebas: a) la respuesta a un estímulo reforzante para evaluar el sistema general de recompensa (utilizando el protocolo de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) con un agonista dopaminérgico) b) la función cognitiva por medio de la prueba de reconocimiento de objetos para evaluar la memoria declarativa c) la susceptibilidad a la ansiedad en la prueba de laberinto elevado d) la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica provocada por un estímulo nocivo (la restricción de sueño)

Encontrar modelos de animales resilientes o vulnerables es fundamental para la investigación de las respuestas del organismo a condiciones adversas y para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento para diversos trastornos mentales. Además, la identificación de estos perfiles podría servir como herramienta valiosa para investigar factores de riesgo para desarrollar trastornos psiquiátricos u otras enfermedades, así como para investigar factores de riesgo ambientales estrategias preventivas y tratamientos en los diferentes escenarios.

Hipótesis

La resiliencia o vulnerabilidad de las ratas macho depende de las condiciones de vida de los sujetos durante las primeras semanas de nacimiento, si las condiciones de vida son favorables se desarrollará un fenotipo vulnerable, mientras que si las condiciones son adversas se desarrollará un fenotipo resiliente.

Objetivo General

Determinar si los animales con obesidad o desnutrición inducidas por manipulación del tamaño de la camada exhiben fenotipos fisiológicos, conductuales y cognitivos opuestos, con la finalidad de sugerir un modelo animal de resiliencia y vulnerabilidad.

Objetivos Particulares

- Manipular camadas de ratas recién nacidas para obtener camadas de 3 (obesas), 9 (controles) y 16 (desnutridas) crías.
- Evaluar la función cognitiva (memoria declarativa) con la prueba de reconocimiento de objetos a los 2, 4 y 6 meses de edad en los tres grupos de camadas manipuladas.
- Evaluar los niveles de ansiedad utilizando la prueba de laberinto elevado a los 2, 4 y 6 meses de edad en los tres grupos de camadas manipuladas.
- Evaluar sistema general de recompensa por medio de la prueba de condicionamiento de preferencia de lugar inducido por diferentes dosis de un agonista dopaminérgico D1-like (SKF38393) en los diferentes grupos a los 4 meses de edad.

- Evaluar el efecto de la restricción de sueño sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica utilizando tres trazadores de diferente peso molecular en ratas macho desnutridas, obesas y controles de 3 meses de edad.

Material y Métodos

Animales

Para obtener ratas gestantes, se colocaron en una caja dos hembras adultas con un macho de la cepa Wistar durante 14 días, posteriormente las hembras se separaron en cajas individuales. Todos los sujetos experimentales, se mantuvieron en un ciclo invertido de 12 horas de luz/oscuridad (luz de 12am-12pm / oscuridad 12pm-12am) con acceso libre a agua filtrada y comida.

Manipulación de camada

En el día postnatal 2 (PN2), se separaron las crías de sus madres y fueron colocadas para formar nuevas camadas de 9 (control; CC) ó 16 (camada grande; CG) crías (Rodrigues et al., 2011; Plagemann et al., 1992). En el día postnatal 3 (PN3), las camadas pequeñas se formaron de manera similar: las crías se separaron de sus madres y fueron colocadas para formar nuevas camadas de 9 (control; CC) ó 3 (camada pequeña; CP) crías (Sarmiento et al., 2012; Patterson et al., 2010). Las CP estaban conformadas por crías macho exclusivamente siguiendo la metodología de Pérez-Morales et al., 2018 y en el caso de las CC y CG se procuró generar camadas con el mayor número de machos posible. Los cachorros excedentes fueron

sacrificados.

Posterior al reacomodo de camadas, las crías fueron pesadas cada 2 días hasta el destete, y al día PN21 (las camadas pequeñas y sus controles) y al día PN25 (las camadas grandes y sus controles). Además de estas manipulaciones y de las pertinentes al cuidado necesario de los animales (limpieza de cajas habitación), las ratas no fueron perturbadas sino hasta la fecha de los experimentos.

Prueba de reconocimiento de objetos

Se utilizó una caja de arena de campo abierto (60 x 40 x 50 cm) colocada en una habitación tenuemente iluminada. Se utilizaron 3 objetos a discriminar. Estos objetos tuvieron el mismo tamaño, pero variaron en forma, textura y material. Asimismo, los objetos empleados fueron diferentes para las pruebas realizadas a los 2, 4 y 6 meses de edad. La arena de campo abierto y los objetos estímulo se limpiaron con etanol al 70% antes de cada prueba para garantizar la ausencia de señales olfativas.

La prueba de reconocimiento de objetos consta de 2 sesiones y 3 habituaciones. Los animales se habituaron a la arena de campo abierto, durante 5 min cada día los primeros 3 días de la prueba. Ningún objeto de estímulo se colocó dentro de la arena durante la habituación. Para la primera sesión, los animales se colocaron individualmente en el campo abierto con dos objetos diferentes (A y B) y se les dejó explorar libremente durante 10 min. La exploración se definió como acercar la nariz a menos de 1 cm del objeto. Al día siguiente, los animales se colocaron de nuevo en el

mismo campo abierto para una segunda sesión (sesión de prueba) de 10 min, con un objeto familiar presentado en la sesión anterior y un objeto nuevo (A o B y C). Los objetos familiares (A y B) y objeto nuevo (C) se rotaron al cambiar de animal para eliminar cualquier tipo de sesgo inducido por la preferencia intrínseca por algún objeto. El estudio se llevó a cabo con iluminación de luz blanca, en un horario de 10 a.m. a 12 p.m. durante las últimas dos horas de la fase luz. Esta prueba se basa en la preferencia innata del roedor para explorar el objeto nuevo en lugar del objeto familiar. Por lo tanto, un roedor que recuerda el objeto familiar pasará más tiempo explorando el nuevo objeto. Se calculó el Índice de reconocimiento de cada animal. El Índice de reconocimiento se calcula mediante la ecuación $TN / (TF + TN)$ donde: TN= Tiempo de exploración del objeto nuevo, y TF= Tiempo de exploración del objeto familiar (Lueptow, 2017).

Prueba de laberinto elevado

Se utilizó un laberinto con cuatro brazos (dos abiertos y dos cerrados) en forma de cruz. Los animales se situaron en la intersección de los cuatro brazos del laberinto elevado y se midió su comportamiento por 10 min. Se registró el tiempo permanecido en los brazos cerrados, brazos abiertos y en los extremos de los brazos abiertos, así como el número de levantamientos (exploración vertical) en los brazos abiertos (Rodgers and Dalvi, 1997). La prueba se llevó a cabo con iluminación de luz blanca, en un horario de 2 p.m. a 6 p.m. durante la fase de oscuridad. El estudio se realizó a los 2, 4 y 6 meses de edad.

Esta prueba es usada para medir respuestas de ansiedad en roedores, se usa la proporción de tiempo pasado en los brazos abiertos comparada con el tiempo en los brazos cerrados. El comportamiento en esta tarea refleja el conflicto entre la preferencia de los roedores por los espacios cerrados y su motivación innata de explorar ambientes nuevos (Pellow et al., 1985).

Prueba de condicionamiento de preferencia de lugar

Para el condicionamiento de preferencia de lugar se usó una caja de plástico rectangular (96cm de largo x 28cm de ancho x 32cm de alto) dividida en tres compartimentos. Los compartimentos de los extremos (38 cm de largo x 28 cm de ancho x 32 cm de alto) están conectados a través de puertas corredizas por un compartimento neutral central (20cm de largo x 28cm de ancho x 32cm de alto), que a su vez, está compuesto por una pared acrílica transparente y tres paredes grises. Ambos compartimentos de los extremos son diferentes entre sí, uno de ellos es negro (paredes y piso) y una pared está ligeramente humedecida con ácido acético al 2% antes de las pruebas, el otro compartimiento es blanco (paredes y piso) con el piso rugoso.

Las pruebas se realizaron con iluminación de luz blanca, en un horario de 2 p.m. a 6 p.m. Durante la pre-prueba, la rata se colocó en el compartimento central durante un minuto, acto seguido se removieron las puertas para que la rata se pudiera mover libremente entre los tres compartimentos. Durante 10 min se registró el tiempo total pasado en cada compartimiento. El compartimento donde el animal pasó más tiempo

se denominó *compartimento preferido*, mientras que el compartimento donde el macho pasó menos tiempo se denominó *compartimento no preferido* o *reforzado*. Se utilizó un criterio de selección durante la prueba previa: los sujetos debían permanecer en cada compartimento al menos 45 s, de lo contrario no se usaban para el ensayo. Un día después de la pre-prueba (día 2 del condicionamiento), los animales se colocaron en el compartimento preferido directamente desde su caja-hogar durante 30 min. Al día siguiente (día 3 de condicionamiento), 1 min después de la administración i.p. de 20 µg/kg del agonista dopaminérgico SKF38393 (Domínguez-Salazar et al., 2014), los animales se introdujeron en el compartimento no preferido durante 30 min. En los días 4 y 6, los sujetos se colocaron en el compartimento preferido durante 30 min directamente desde su caja-hogar. En los días 5 y 7, los machos se colocaron en el compartimento no preferido en condiciones idénticas a las del día 3. En los días 4, 6 y 8 del condicionamiento (pruebas), el tiempo que permanecieron en ambos compartimentos se evaluó de manera similar a la de la pre-prueba. Para poder considerar que se indujo un estado afectivo positivo es necesario observar dos aumentos significativos: el tiempo en el compartimento no preferido y el índice de preferencia (tiempo en el compartimento no preferido dividido por el tiempo en ambos compartimentos). Ambos parámetros deben ser significativamente más altos en la prueba en comparación con la pre-prueba (Brabant et al., 2005; Domínguez-Salazar et al., 2014). El estudio se realizó a los 4 meses de edad.

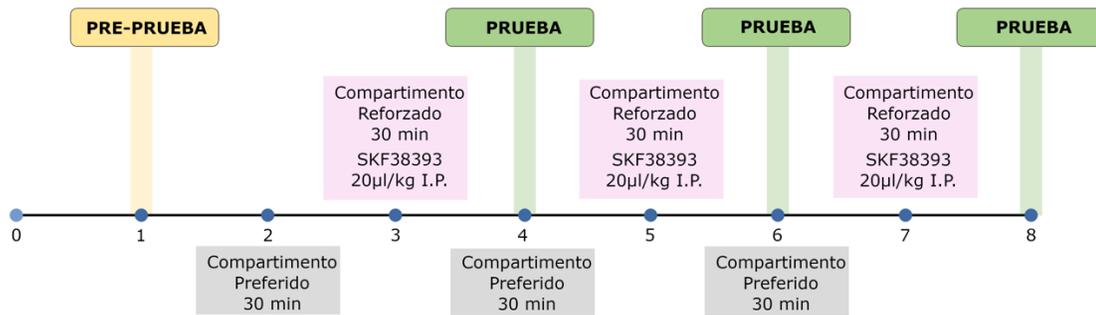


Figura 1. Mapa de diseño experimental del Condicionamiento de Preferencia de Lugar.

Restricción de sueño

Los animales se restringieron de sueño mediante la técnica de plataformas múltiples, que suprime el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y disminuye el 30% el sueño no-MOR (Gómez-González et al., 2013).

A los 3 meses de edad, los machos de los tres grupos se colocaron en tanques de acrílico (82 cm x 59 cm x 48 cm) con 3 cm de agua y con plataformas pequeñas (7 cm de diámetro x 8cm de altura). Las ratas se mantuvieron en estas condiciones 20 horas al día (de 12:00 p.m. a 8:00 a.m.), las restantes 4 horas se les dejó dormir en sus cajas-hogar (de 8:00 a.m. a 12:00 p.m.). Este procedimiento se realizó durante 8, 10 y 12 días consecutivos para todos los grupos experimentales.

Ensayos de permeabilidad de las barreras biológicas

Después de terminado el periodo de restricción de sueño (a las 8:00 AM), se realizó un ensayo de permeabilidad de las barreras biológicas en ratas de las camadas pequeñas, controles y grandes restringidas de sueño por 8, 10 ó 12 días (n = 5 por

grupo). Para evaluar la permeabilidad de la BHE y de la barrera hemato-testicular se usaron dos marcadores de diferente peso molecular que no atraviesan las barreras biológicas en condiciones normales:

- Na-fluoresceína, se preparó suspendiéndolo en buffer fosfato salino (PBS) para lograr una concentración de 50 mg/mL y se administró 0.2mL/100g de peso corporal.
- Azul de Evans, Se disolvió al 2% en PBS y la dosis de azul de Evans fue 0,2ml /100g de peso corporal.

Los animales se sacaron directamente de la caja de restricción en los días 8, 10 ó 12 de manera individual conforme se realizaban los ensayos de permeabilidad. Para anestesiarse se usaron 0.5 mL de pentobarbital sódico ip. por animal, posteriormente se realizó una incisión de 5 mm en el lado izquierdo del tórax del animal y se administró intraventricularmente un cóctel de los dos compuestos mencionados (volumen total de 0.2mL/100g peso corporal). El coctel de trazadores se dejó circular durante 5 min. Las ratas se perfundieron durante 7 min con solución salina al 0.9%. Posteriormente se obtuvieron muestras de los testículos y de las regiones cerebrales: hipocampo, hipotálamo, amígdala, corteza, vermis y ganglios basales. Las muestras se pusieron en microtubos y se pesaron, se les agregó PBS 1X para hacer su homogeneización y metanol, se centrifugaron a 13500 rpm por 10 min. Se tomó el sobrenadante y se obtuvo la absorbancia en un lector de microplacas Urit 660 para Sodio Fluoresceína a 485nm de excitación y 435nm de emisión y para Azul de Evans a 535nm de excitación y 595nm de emisión. Se obtuvo la concentración de cada

compuesto por peso de tejido cerebral húmedo usando una curva estándar y se calculó el coeficiente de permeabilidad normalizado teniendo en cuenta la concentración plasmática de cada compuesto (Hurtado-Alvarado, 2017).

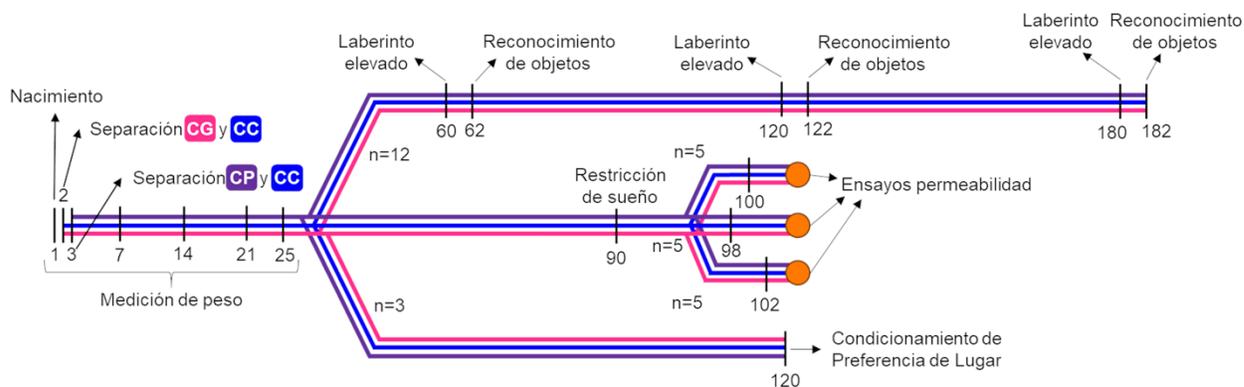


Figura 2. Mapa del diseño experimental. CC: Camada control, CP: Camada pequeña, CG: Camada grande. La n indica el numero de muestra por grupo.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media de los valores \pm S.E.M. Para la comparación de peso el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de medidas repetidas y como posthoc Tukey. Para analizar los datos de reconocimiento de objetos se usaron dos pruebas; ANOVA con posthoc Bonferroni para las comparaciones entre grupos, y t de student para la comparación del tiempo de exploración de objetos. En el caso laberinto elevado los resultados no cumplieron los supuestos de normalidad por lo que el análisis estadístico se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis y Dunn como posthoc. Los datos de condicionamiento de preferencia de lugar se analizaron por medio de ANOVA de medidas repetidas y una posthoc Dunnett. Por último, todos los datos obtenidos de la permeabilidad de barreras

biológicas de analizó mediante ANOVA de dos vías. Los análisis se realizaron usando el programa PRISMA 6, excepto en el caso de barreras biológicas en el que se utilizó R (Version 3.6.1; R Core Team, 2019) y los paquetes de R *afex* (Version 0.25.1; Singmann, Bolker, Westfall, Aust, & Ben-Shachar, 2019), y *emmeans* (Version 1.4.1; Lenth, 2019). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

Resultados

La reducción del tamaño de camada produjo un mayor aumento de peso en comparación con las ratas de la camada control, mientras al aumentar el tamaño de camada el aumento de peso fue menor en comparación con los controles (Fig. 3).

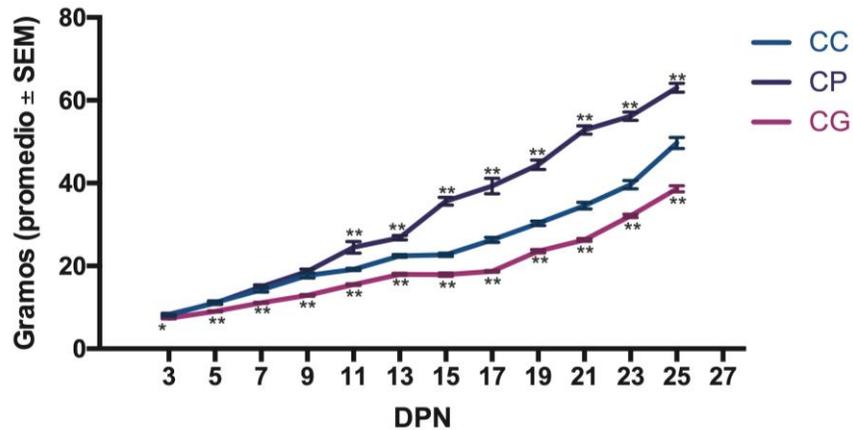


Figura 3. Aumento de peso de las diferentes camadas en los primeros 25 días postnatales. Los datos muestran la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs C (ANOVA medidas repetidas, Bonferroni)

Reconocimiento de objetos a los 2 meses de edad

La disminución o aumento de número de crías en la camada no modificó significativamente el tiempo que pasaron los animales explorando los objetos en la pre-prueba a los 2 meses de edad (Fig. 4).

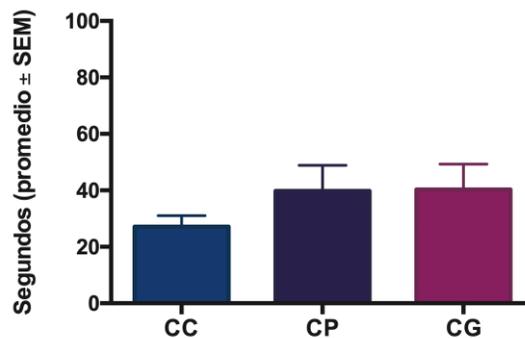


Figura 4. Tiempo de exploración en la pre-prueba a los dos meses de edad. Los datos muestran la media \pm SEM. NS; (ANOVA, Bonferroni multicomparativa)

En la prueba de reconocimiento de objetos se observó que los animales de la camada control (CC) mostraron una exploración significativamente mayor del objeto nuevo (C) que del objeto familiar (A2) (Fig. 5A). Por el contrario, las ratas de camada pequeña (CP) mostraron un tiempo de exploración muy similar entre todos los objetos (Fig. 5B).

Por su parte, los animales de la camada grande (CG) al igual que los de la CC pasaron significativamente mayor tiempo reconociendo el objeto nuevo (presentaron buena memoria declarativa) (Fig. 5C).

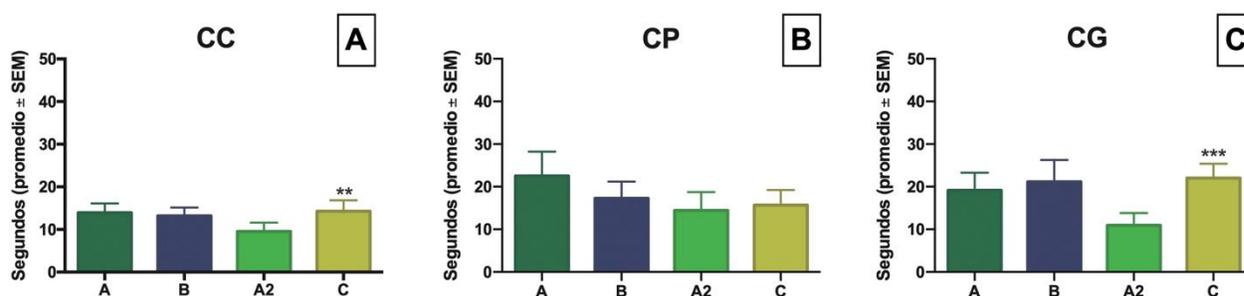


Figura 5. Tiempo de exploración por objeto en las camadas control, pequeña y grande a los dos meses de edad. A) Promedio de tiempo de exploración por objeto en la camada control. B) Promedio de tiempo de exploración por objeto en la camada pequeña. C) Promedio de tiempo de exploración por objeto en la camada grande. Los datos muestran la media \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; A2 vs C (t-student pareada).

En la CG, los animales pasaron un tiempo de exploración significativamente mayor del objeto nuevo (C) que del objeto familiar (A2).

Al hacer un análisis considerando el Índice de Discriminación $[(T_N - T_F) / (T_N + T_F)]$, se observó que los individuos de la CG pasaron mayor proporción de tiempo explorando el objeto nuevo, mostrando diferencias significativas en comparación con el grupo control; mientras los de la CP no exhiben preferencia por ningún objeto, ya que su

índice es muy cercano a 0 (Fig. 6).

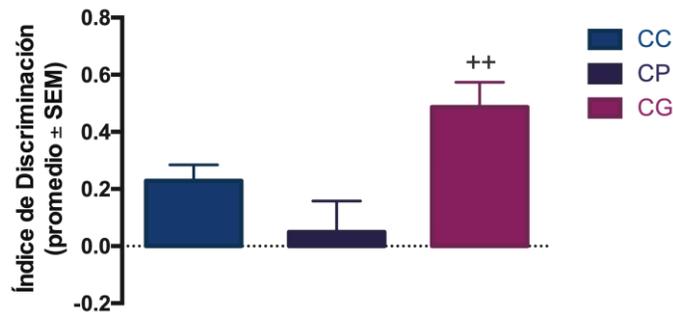


Figura 6. Índice de discriminación a los dos meses de edad. Los datos muestran la media ± SEM. ** $p < 0.01$; Control vs Grande (ANOVA, Bonferroni multicomparativa).

Reconocimiento de objetos a los 4 meses de edad

Al igual que a los dos meses de edad, el tiempo de exploración de objetos en la pre-prueba no se modificó significativamente entre los grupos (Fig. 7).

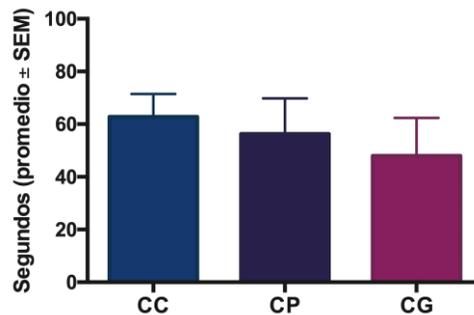


Figura 7. Tiempo de exploración en la pre-prueba a los cuatro meses de edad. Los datos muestran la media ± SEM. NS; (ANOVA, Bonferroni multicomparativa)

Los animales de la CC (Fig. 8A), al igual que los de la CG mostraron una exploración significativamente mayor del objeto nuevo que del objeto familiar (Fig. 8C). Mientras que las ratas de la CP, al igual que a los dos meses de edad, mostraron un tiempo de exploración muy similar entre todos los objetos (Fig. 8B).

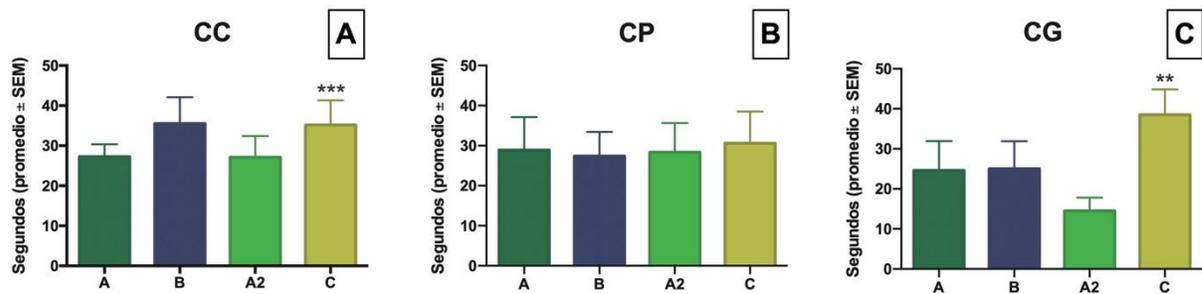


Figura 8. Tiempo de exploración por objeto en camada control, camada pequeña y camada grande a los cuatro meses de edad. A) Promedio de tiempo de exploración por objeto, camada control. B) Promedio de tiempo de exploración por objeto, camada pequeña. C) Promedio de tiempo de exploración por objeto, camada grande. Los datos muestran la media \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; A2 vs C (t-student pareada)

Al considerar el Índice de Discriminación, se observa que los animales de la CG pasan mayor proporción de tiempo reconociendo el objeto nuevo, en comparación con los de las CP y CC (Fig. 9).

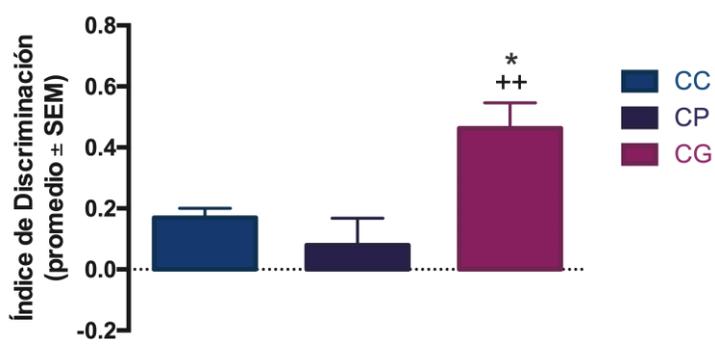


Figura 9. Tiempo de exploración en la pre-prueba a los seis meses de edad. Los datos muestran la media \pm SEM. NS; (ANOVA, Bonferroni multicomparativa)

Reconocimiento de objetos a los 6 meses de edad

A los 6 meses de edad la modificación del número de crías en la camada no afectó significativamente el tiempo que pasaron los animales explorando los objetos en la pre-prueba (Fig. 10).

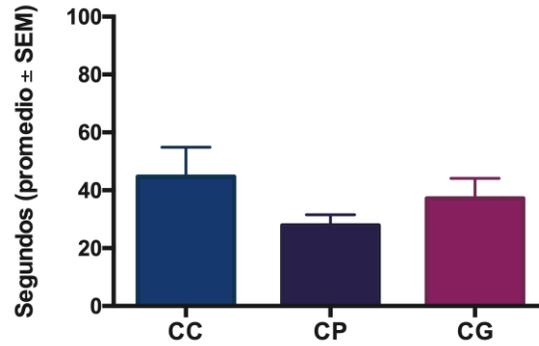


Figura 10. Tiempo de exploración en la pre-prueba a los seis meses de edad. Los datos muestran la media \pm SEM. NS; (ANOVA, Bonferroni multicomparativa).

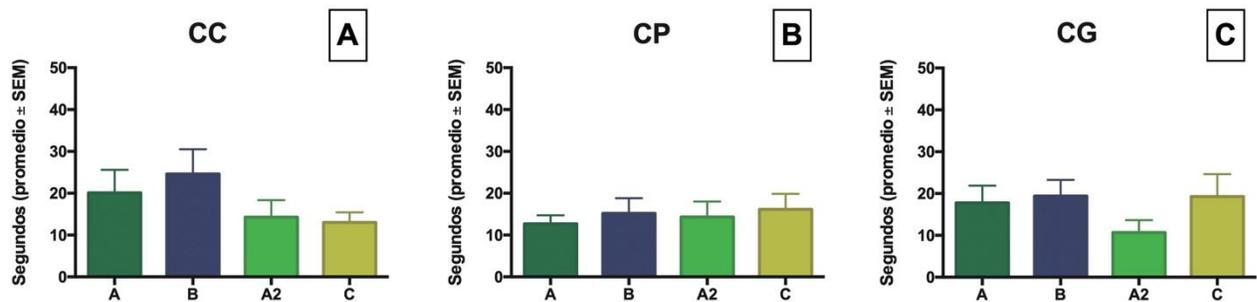


Figura 11. Tiempo de exploración por objeto en camada control, camada pequeña y camada grande a los seis meses de edad. A) Promedio de tiempo de exploración por objeto, camada control. B) Promedio de tiempo de exploración por objeto, camada pequeña. C) Promedio de tiempo de exploración por objeto, camada grande. Los datos muestran la media \pm SEM. NS; (t-student pareada).

Los tres grupos experimentales mostraron un tiempo de exploración similar entre todos los objetos, sin diferencias significativas (Fig. 11A-C). De manera similar, no se observaron diferencias entre grupos en el Índice de reconocimiento de objeto [TN/(TF+TN)] (Fig. 12).

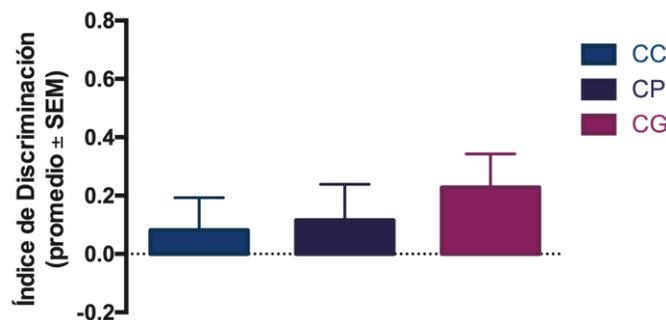


Figura 12. Índice de reconocimiento del objeto nuevo a los seis meses de edad. Los datos muestran la media \pm SEM. NS; (ANOVA, Bonferroni multicomparativa).

Laberinto elevado a los 2 meses de edad

En la prueba de laberinto elevado, se observaron diferencias significativas entre los controles y los machos de CG en el tiempo pasado en el brazo abierto del laberinto (Fig. 13A). De manera similar, en el brazo cerrado, se observó una disminución significativa en el tiempo pasado en este brazo al comparar los animales de la CG con la CC y la CP (Fig. 13C). En el centro del laberinto se observó un aumento significativo en el tiempo que pasaron los animales de CG comparado con los controles (Fig. 13B). No hubo diferencias significativas entre grupos, en el tiempo pasado en el extremo del brazo abierto (Fig. 13D).

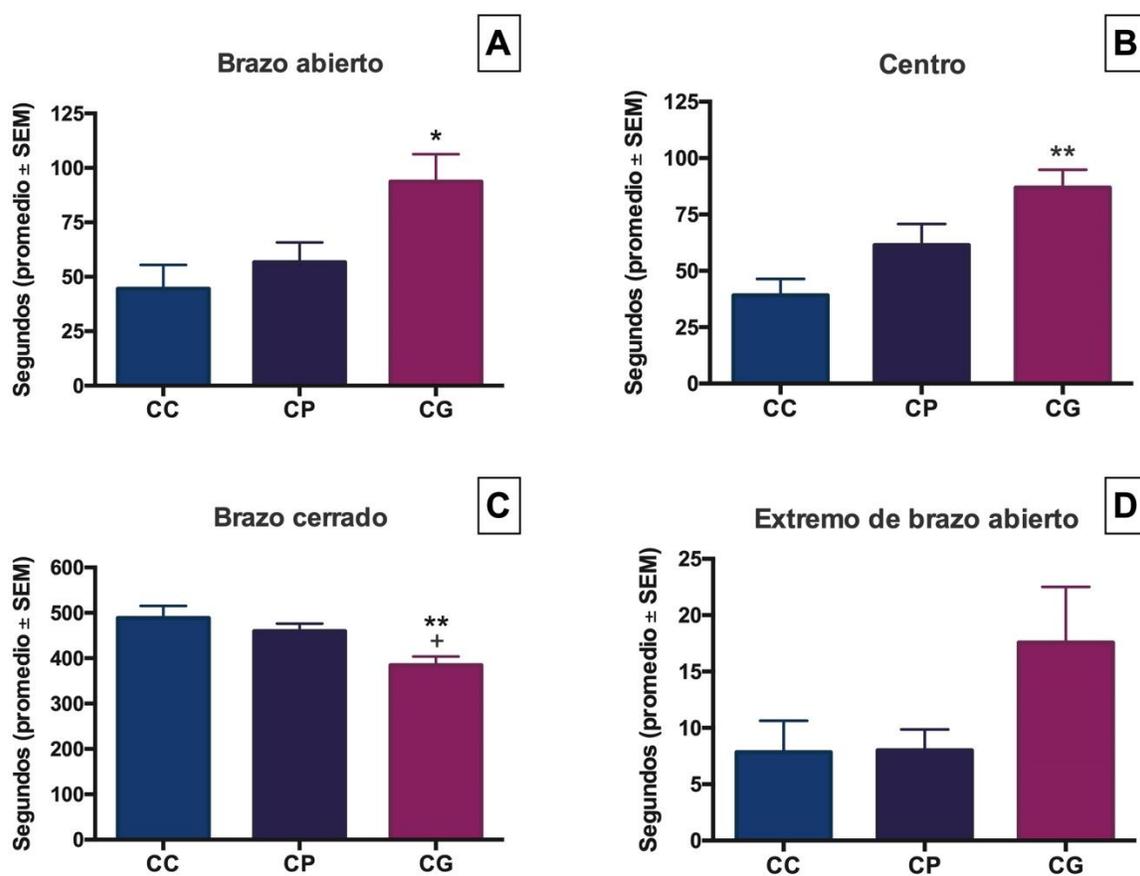


Figura 13. Tiempo pasado en los brazos del laberinto elevado a los dos meses de edad. A) Promedio de tiempo pasado en el brazo abierto. B) Promedio de tiempo pasado en el centro. C) Promedio de tiempo pasado en el brazo cerrado. D) Promedio de tiempo pasado en el extremo del brazo abierto. Los datos muestran la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Grande vs Control, + $p < 0.05$; Grande vs Pequeña (Kruskal Wallis, Dunn multicomparativa).

No hubo diferencias significativas entre grupos, en el tiempo pasado en el extremo del brazo abierto (Fig. 13D).

Se calculó el índice de tiempo en el brazo abierto [TAb/TCer+Tab] y se encontró que los animales de la CG pasan un tiempo significativamente mayor en comparación con la CC explorando el brazo abierto (Fig. 14).

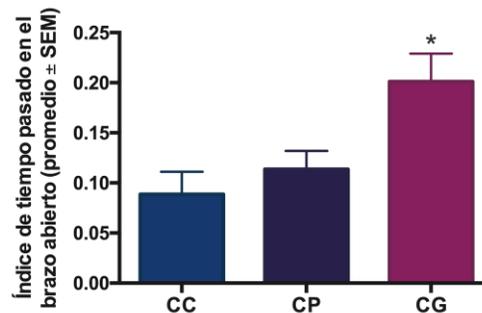


Figura 14. Índice de tiempo pasado en el brazo abierto a los dos meses de edad. Los datos muestran la media \pm SEM. * $p < 0.05$; Control vs Grande (Kruskal Wallis, Dunn multicomparativa)

Laberinto elevado a los 4 meses de edad

A los 4 meses de edad, a diferencia de lo que ocurrió a los 2 meses de edad, se observaron diferencias significativas en comparación entre la CP y la CC en el tiempo de exploración en el brazo abierto (Fig. 15A) y en el extremo del brazo abierto (Fig.15D), donde los animales de la CP pasaron menos tiempo; sin embargo, no se observan diferencias significativas en el tiempo que pasaron los animales en el brazo cerrado (Fig. 15C), y en el centro del laberinto (Fig. 15B).

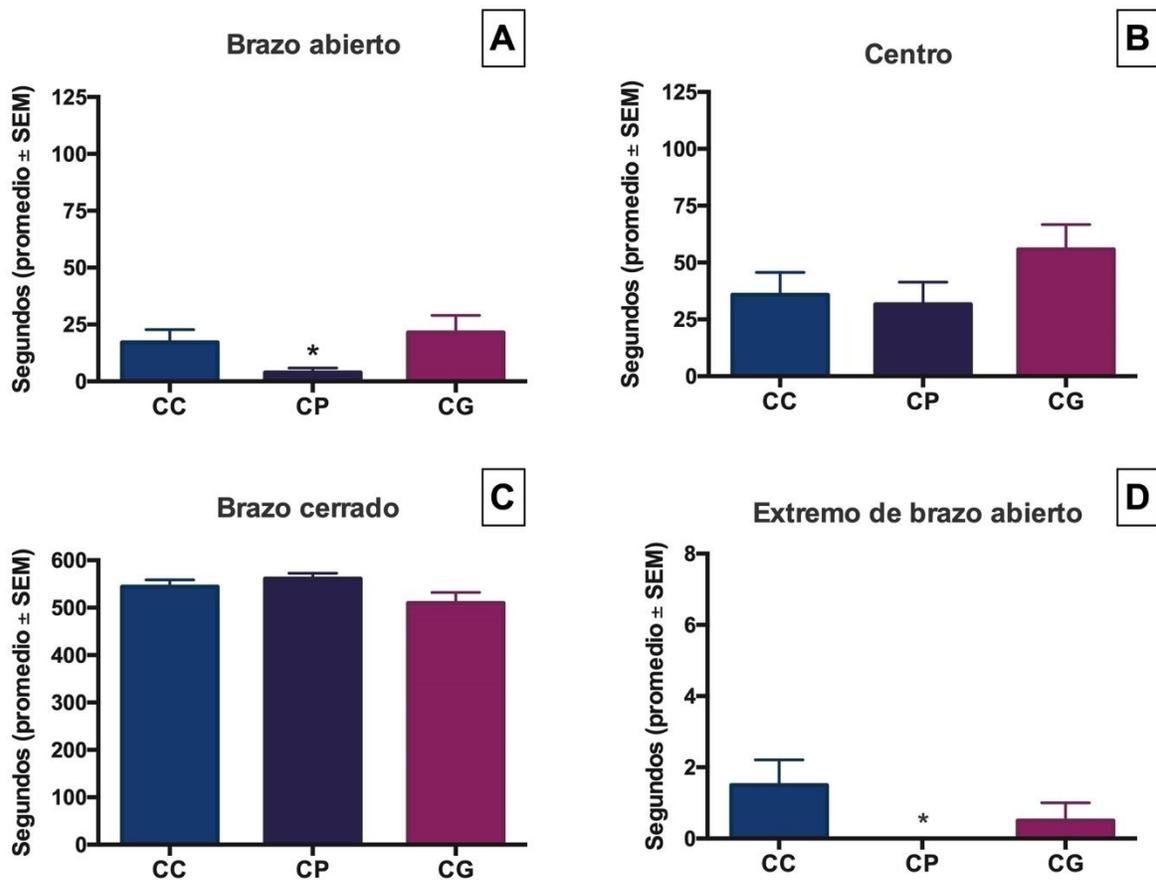


Figura 15. Tiempo pasado en los brazos del laberinto elevado a los cuatro meses de edad. A) Promedio de tiempo pasado en el brazo abierto. B) Promedio de tiempo pasado en el centro. C) Promedio de tiempo pasado en el brazo cerrado. D) Promedio de tiempo pasado en el extremo del brazo abierto. Los datos muestran la media ± SEM. * $p < 0.05$; Grande vs Control (Kruskal Wallis, Dunn multicomparativa)

Al calcular el índice de tiempo pasado en el brazo abierto $[TAb/TCer+Tab]$ se observó que, de manera consistente con los resultados anteriores, hubo una disminución significativa en el tiempo de exploración de los machos de la CP en el brazo abierto (Fig.16), es decir presentan mayor ansiedad.

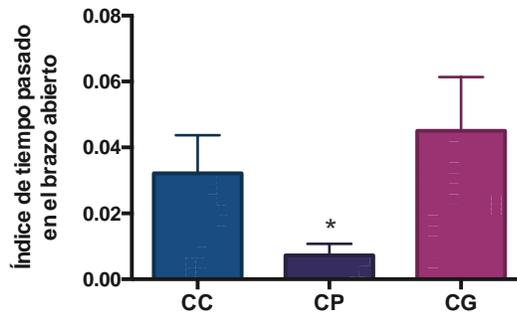


Figura 16. Índice de tiempo pasado en el brazo abierto a los cuatro meses de edad. Los datos muestran la media \pm SEM. * $p < 0.05$; Pequeña vs Control (Kruskal Wallis, Dunn multicomparativa)

Laberinto elevado a los 6 meses de edad

Los animales de CG pasaron un mayor tiempo explorando el brazo abierto en comparación con los de CP, estos últimos, a su vez, pasaron menor tiempo explorando el brazo abierto en comparación con los de CC (Fig. 17A). En el centro del laberinto no se observaron diferencias significativas en el tiempo pasado entre grupos (Fig. 17B).

Mientras que, en el brazo cerrado fueron las ratas de la CP quienes pasaron mayor tiempo explorando (Fig. 17C). De igual manera, los animales de CP pasaron significativamente menor tiempo en el extremo del brazo abierto en comparación con los de la CC (Fig. 17D).

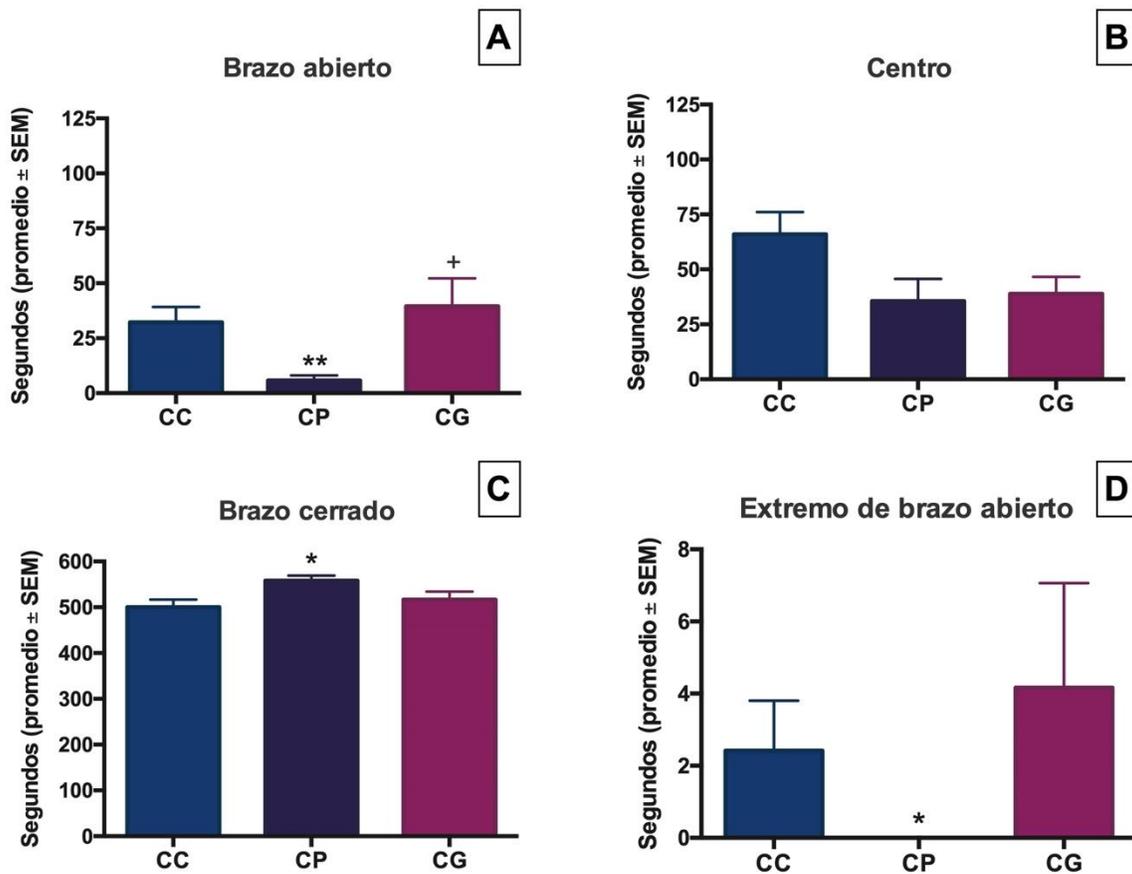


Figura 17. Tiempo pasado en los brazos del laberinto elevado a los seis meses de edad. A) Promedio de tiempo pasado en el brazo abierto. B) Promedio de tiempo pasado en el centro. C) Promedio de tiempo pasado en el brazo cerrado. D) Promedio de tiempo pasado en el extremo del brazo abierto. Los datos muestran la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Grande vs Control, + $p < 0.05$; Grande vs Pequeña (Kruskal Wallis, Dunn multicomparativa)

Midiendo el índice de tiempo en el brazo abierto [TAb/TCer+Tab], se encontró que los animales de la CG pasaron un tiempo significativamente mayor explorando el brazo abierto en comparación con los de la CP, por su parte los animales de la CP pasaron significativamente menor tiempo explorando esa parte del laberinto en comparación con los de la CC (Fig. 18).

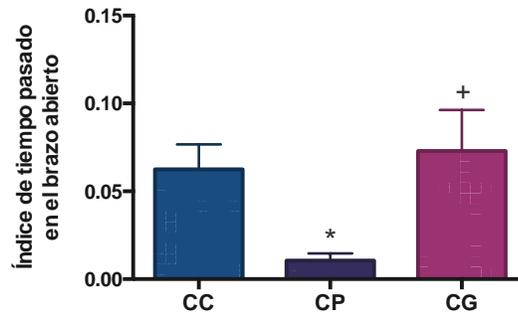


Figura 18. Índice de tiempo pasado en el brazo abierto a los seis meses de edad. Los datos muestran la media \pm SEM. * $p < 0.05$; Control vs Pequeña, + $p < 0.05$; Grande vs Pequeña (Kruskal Wallis, Dunn multicomparativa)

Condicionamiento de preferencia de lugar

El SKF-38393, un agonista dopaminérgico, no indujo cambio de preferencia de lugar, aunque si se observó una tendencia de aversión en los animales de CP hacía el compartimento reforzado y una tendencia de cambio de preferencia hacia el compartimento reforzado por parte de los controles (Fig. 19).

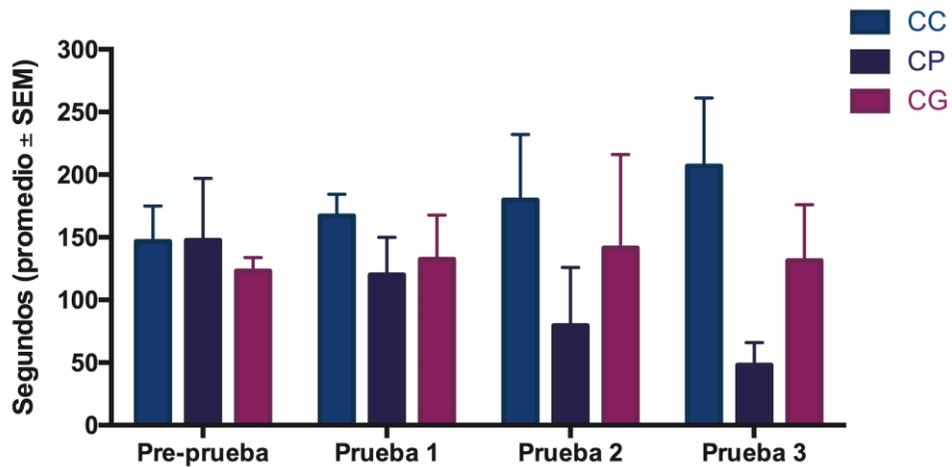


Figura 19. Tiempo pasado en el compartimento reforzado. Los datos muestran la media \pm SEM. NS; (ANOVA Medidas repetivas: Dunnet multicomparativa)

Ensayos de permeabilidad de las barreras biológicas a Na-fluoresceína y Azul de Evans

En animales de CG parece haber una recuperación de la barrera a los 10 días de restricción de sueño en comparación con los 8 días en casi todas las regiones, mientras que los animales de CP tienen una permeabilidad que permanece similar a los 8, 10 y 12 días en la mayoría de las regiones (Fig. 20 y Fig. 21). Sin embargo, se requieren más análisis y controles sin restricción de sueño para un análisis de resultados más completo. Otra observación importante es el gran aumento de permeabilidad en los animales de CP en hipotálamo (Fig. 21E).

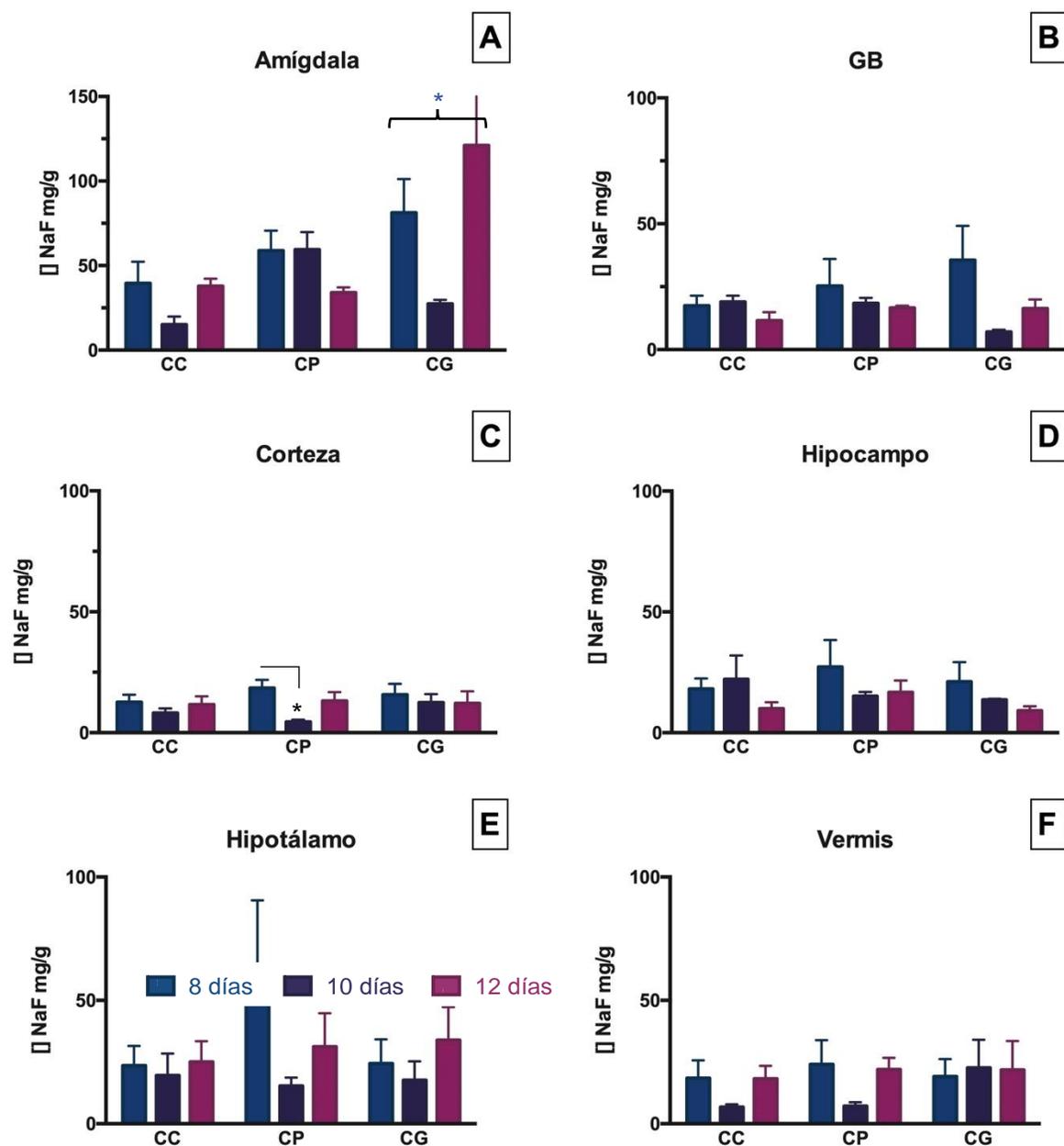


Figura 20. Concentración de Na-fluoresceína en mg/g de muestra de tejido. Nótese el gran aumento en la permeabilidad de la BHE en amígdala. Los datos muestran la media \pm SEM. * $p < 0.05$; 8 días vs 10 días, * $p < 0.05$; CC vs CG (ANOVA 2 vías).

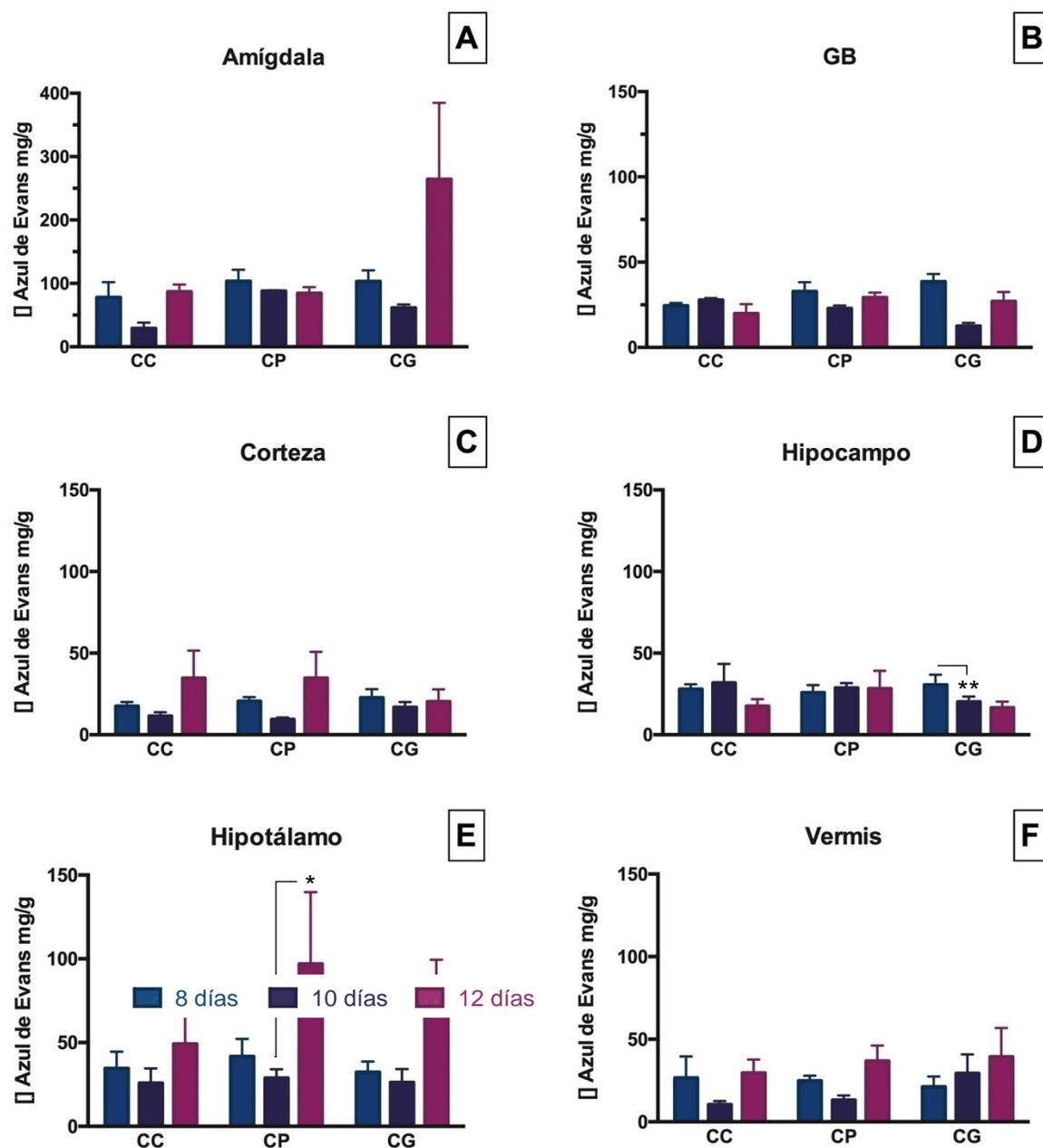


Figura 21. Concentración de Azul de Evans en mg/g de muestra de tejido. . Nótese el gran aumento en la permeabilidad de la BHE en amígdala. Los datos muestran la media \pm SEM. * $p < 0.05$; 10 días vs 12 días, ** $p < 0.01$; 8 días vs 10 días (ANOVA 2 vías)

La barrera hematotesticular de los animales de CG muestra lo que parece ser una recuperación en la permeabilidad en el día 10, mientras que la permeabilidad de los animales de CP aumenta progresivamente (Fig. 22).

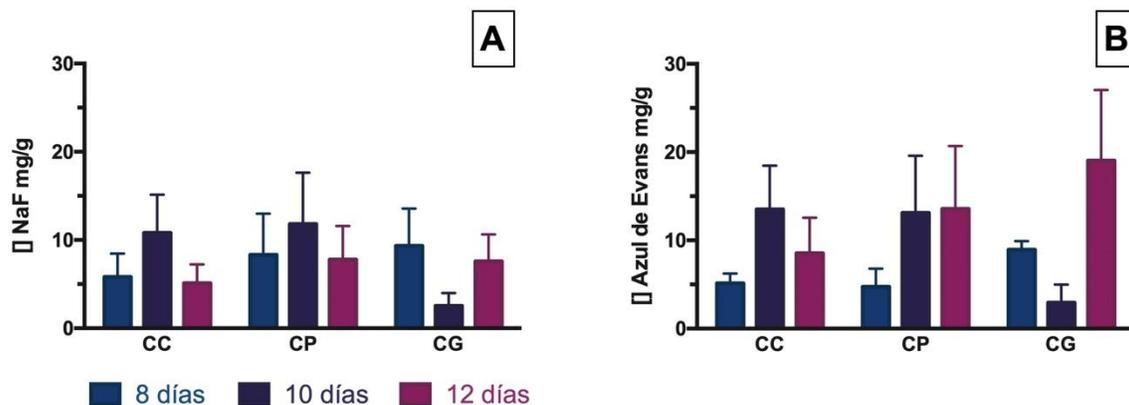


Figura 22. Concentración de Na-fluoresceína y Azul de Evans en mg/g por muestra de testículo. Los datos muestran la media \pm SEM. NS (ANOVA 2 vías).

Discusión

Los modelos animales de vulnerabilidad/resiliencia, con sus respectivas limitaciones, han sido útiles en la búsqueda de herramientas para el tratamiento de enfermedades neuropsiquiátricas. Los resultados de este trabajo muestran que, en la rata, la modificación del tamaño de camada puede ser usado como un modelo de vulnerabilidad/resiliencia, con efectos marcados sobre la memoria y la ansiedad. A diferencia de otros modelos, el nuestro es uno que puede crearse de manera rápida y económica, además de que podría ser usado para estudios de comorbilidad, ya que las enfermedades neuropsiquiátricas han sido consistentemente asociadas con trastornos alimenticios y metabólicos (Strine et al., 2008).

Los resultados del presente estudio confirman que la crianza por disminución del tamaño de camada induce obesidad y alteraciones en la cognición; efectos parecidos a éstos se habían observado en un modelo de obesidad inducida por modificación de la dieta (Farr et al., 2008). Con las pruebas realizadas observamos que existe una falta de memoria declarativa en animales provenientes de la CP, lo cual empata con los resultados obtenidos por Salari (2018). Estos investigadores observaron que, en ratones de CP, disminuyó la memoria espacial en comparación con los controles. En el presente trabajo, observamos que había diferencias entre grupos de crianza con respecto al desempeño en la prueba de reconocimiento de objetos: los animales provenientes de CG mostraron una mejor memoria declarativa que los controles. Consistente con este resultado, en otro estudio se ha realizado la misma prueba en ratas a las que se induce desnutrición por modificación de dieta, y se observaron

resultados similares (Molz, 2016). No obstante, en nuestro estudio los efectos se perdieron a los 6 meses de edad, esto podría deberse a cambios en la conducta de exploración asociados con la edad (Reger et al., 2009). Los efectos cognitivos de la crianza en CG o CP observados en el presente estudio, junto con los resultados obtenidos en varios otros estudios sugieren que la manipulación experimental del tamaño de camada puede usarse como modelo de vulnerabilidad y resiliencia para enfermedades de la memoria.

En la prueba de laberinto elevado, al igual que en reconocimiento de objetos, se obtuvieron resultados opuestos para la CP y para la CG. Las ratas de la CP presentaron mayores niveles de ansiedad que los controles, resultados parecidos se han visto con el mismo modelo en ratones de la línea NMRI, en el trabajo de Salari et al. (2018), quienes también obtuvieron un aumento significativo en los comportamientos similares a la ansiedad. En cambio, en nuestro estudio, observamos que la crianza en CG disminuye los niveles de ansiedad en comparación con los controles, lo que confirma el estudio de Bulfin et al. (2011) en el que observaron un patrón similar pero la prueba se hizo cuando las ratas tenían uno y dos meses de edad. Nuestro estudio muestra que las diferencias se mantienen hasta los 6 meses de edad, por lo que la modificación del tamaño de camada se podría emplear como un modelo de resiliencia vulnerabilidad para estudiar ansiedad en edades avanzadas de la rata.

Por medio de la prueba de Condicionamiento de Preferencia de Lugar se analizó la sensibilidad de los animales de diferentes camadas al agonista dopaminérgico SKF38393 (D1-like). Aunque los resultados no fueron del todo claros y es recomendable aumentar el número de muestra y explorar la posibilidad de que haya diferencias significativas, parece que los animales de CP presentan aversión al agonista y pasan menos tiempo en el compartimento no preferido conforme se hacen más asociaciones entre el agonista y dicho compartimento, mientras que ni los machos de CG ni los de CC cambian su preferencia de lugar de manera significativa. El comportamiento observado podría deberse a la dosis empleada ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$ i. p.). En estudios en los que se utiliza el SKF38393 para realizar diversas pruebas, la dosis comúnmente empleada es mucho más alta que nuestra dosis, independientemente de que se aplique por vía intraperitoneal de $6 \text{ mg}/\text{kg}$ (Amico et al., 2007) o por vía subcutánea que va de $1\text{-}10 \text{ mg}/\text{kg}$ (Beck et al., 2002; Cooper & Al-Naser, 2006). Una posibilidad es la siguiente: si la dosis no fue suficiente para estimular el sistema de recompensa cerebral, entonces la rata pudo haber asociado solamente el estímulo provocado por la inyección (un estímulo doloroso) con el compartimento reforzado y, de este modo, exhibir aversión por este compartimento, en lugar de preferencia (Tzschentke, 2007). Adicionalmente, los niveles elevados de ansiedad exhibidos por los animales de CP, pudieron contribuir a este efecto aversivo. Por otro lado, los controles y los animales de CG, podrían tener una respuesta menos exagerada a la inyección y simplemente no hacer ninguna asociación al compartimento reforzado.

Con la restricción de sueño y los posteriores ensayos de permeabilidad de las barreras biológicas se obtuvieron algunos resultados interesantes. Respecto a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a moléculas pequeñas en los animales de CP, en las regiones de hipocampo, hipotálamo y ganglios basales se observó una tendencia de aumento de la permeabilidad conforme aumentaron los días de restricción de sueño. Estos efectos podrían deberse en parte al perfil inflamatorio que se ha observado en la obesidad (Gregor & Hotamisligil, 2011) más la inflamación que ocurre durante la restricción de sueño (Hurtado-Alvarado, 2013); por otro lado, en los animales de CG parece haber una recuperación de la barrera hematoencefálica (BHE) a los 10 días de restricción, esto podría deberse a otros mecanismos protectores que se cree están presentes en los fenotipos resilientes y protegen la BHE de daño (Dantzer, 2019).

Con el marcador azul de Evans se hace evidente la recuperación de la BHE para los animales de CG en los ganglios basales, donde hay diferencias significativas entre 8 y 10 días de restricción de sueño, lo que podría indicar cierta resiliencia en esta camada. Por otro lado, los animales de CP tienen un aumento de permeabilidad en el hipotálamo en el día 12, lo cual es muy interesante ya que esta región está implicada en la regulación de la alimentación y gasto energético (Timper & Brüning, 2017) y forma parte importante en la función del sistema límbico (Herman et al., 2005). Si el hipotálamo tiene una permeabilidad afectada, puede que se estén filtrando hormonas y otras moléculas que afecten su función en los animales de CP y estén propiciando

el fenotipo vulnerable. Por su puesto, estos resultados tienen sus limitaciones ya que se requieren comparaciones con controles de cada camada sin restricción de sueño.

Los mecanismos que confieren la resiliencia a los animales de CG y la vulnerabilidad a los de CP en este estudio, no son del todo claros. El modelo induce, como ya mencionamos, estados nutricionales opuestos, pero el fenotipo de vulnerabilidad/resiliencia no es enteramente atribuible a ello, existen también diferencias en la conducta materna (Enes-Marques & Giusti-Paiva, 2018). Enes-Marques & Giusti-Paiva (2018) observaron que la reducción de camada a dos crías aumenta la conducta materna (postura arqueada hacia atrás y acicalamiento de los cachorros). Aunque no existen estudios similares en el modelo de CG en la rata Wistar, es probable que la conducta materna se vea afectada por el aumento de crías al igual que en otros roedores (Guerra & Nunes, 2001). Además, también influye el amamantamiento, ya que activa diferentes áreas del cerebro que pueden participar en la señalización de saciedad, percepción del gusto y recompensa (Barna et al., 2017), lo que implica que tendrán distintos patrones de activación dependiendo el tamaño de camada, ya que tendrán diferente disponibilidad al alimento según el número de crías, las de CG tendrán que competir por el alimento mientras que las de CP tendrán acceso a él todo el tiempo. Por último, el perfil inflamatorio podría estar influyendo en la vulnerabilidad o resiliencia en este modelo, se sabe que en la obesidad hay un perfil pro-inflamatorio (Gregor & Hotamisligil, 2011) que a su vez se relaciona con el desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas (Capuron & Castanon, 2016), mientras que en los animales de CP sería interesante evaluar como

esta funcionando su sistema inmune, dado que este podría conferirles resiliencia (Dantzer, 2019).

Todas las pruebas realizadas nos indican que es posible estandarizar el modelo de modificación de tamaño de camada como un modelo de vulnerabilidad y resiliencia para enfermedades neuropsiquiátricas con síntomas en ansiedad y en memoria. Además, entre las fortalezas de este estudio está el factor de la realización de las pruebas a diferentes edades por lo que sabemos que el efecto que vemos es un efecto que permanece en la edad adulta.

Futuras investigaciones podrían enfocarse en los mecanismos por los cuales se están dando estos fenotipos para comprender mejor la resiliencia y vulnerabilidad en este modelo, ya que como se ha mencionado, el entender cómo se da uno u otro perfil nos puede llevar a la prevención de enfermedades neuropsiquiátricas o al desarrollo de nuevos tratamientos para enfrentarlas.

Definitivamente, el presente modelo tiene un nuevo enfoque y dado que presenta extremos opuestos (animales resilientes o vulnerables) y controles, será de gran ayuda para probar diversos medicamentos y crear modelos de enfermedades neuropsiquiátricas. Gracias a que se trata de un modelo de creación fácil y económica, muchos laboratorios podrán tener acceso a él.

Conclusión

Los animales del modelo de CG muestran un desempeño mejor en pruebas de la memoria y muestran menor conducta de ansiedad comparado a los controles. Por el contrario, la reducción de tamaño de camada produce en las ratas alteraciones negativas en una prueba de memoria declarativa y promueve la conducta de ansiedad. Estos resultados concuerdan con la hipótesis, por lo que se concluye que ésta manipulación experimental puede establecerse como modelos animales de vulnerabilidad y resiliencia.

Referencias

- Adam, T. C. & Epel, E. S. (2007) Stress, eating and the reward system. *Physiology & Behavior*, 91(4): 449–58. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.04.011.
- Alonso-Caraballo, Y., Hodgson, K. J., Morgan, S. A., Ferrario, C. R., & Vollbrecht, P. J. (2019). Enhanced anxiety-like behavior emerges with weight gain in male and female obesity-susceptible rats. *Behavioural Brain Research*, 360: 81–93. doi: 10.1016/j.bbr.2018.12.002
- Amico, F., Spowart-Manning, L., Anwyl, R., & Rowan, M. J. (2007). Performance- and task-dependent effects of the dopamine D1/D5 receptor agonist SKF 38393 on learning and memory in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 577(1-3): 71–77. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.08.039
- Barna, J., Renner, E., Arszovszki, A., Cservenák, M., Kovács, Z., Palkovits, M., & Dobolyi, A. (2017). Suckling induced activation pattern in the brain of rat pups. *Nutritional Neuroscience*, 21(5): 317–327. doi: 10.1080/1028415x.2017.1286446
- Beck, J., Biały, M., & Kostowski, W. (2002). Effects of D1 receptor agonist SKF 38393 on male rat sexual behavior and postcopulatory departure in the goal compartment–runway paradigm. *Physiology & Behavior*, 76(1): 91–97. doi: 10.1016/s0031-9384(02)00678-9
- Bergström, A., Jayatissa, M. N., Mork, A., Wiborg, O. (2008) Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression; an in situ hybridization study. *Brain Res*, 1196: 41–52. doi: 10.1016/j.brainres.2007.12.025

- Boubred, F., Daniel, L., Buffat, C., Feuerstein, J.M., Tsimaratos, M., Oliver, C., (2009). Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 297: F943–51. doi: 10.1152/ajprenal.90704.2008.
- Boullu-Ciocca, S., Dutour, A., Guillaume, V., Achard, V., Oliver, C., Grino, M. (2005). Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes.* 54: 197–203. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.197>.
- Brabant, C., Quertemont, E., & Tirelli, E. (2005) Influence of the dose and the number of drug–context pairings on the magnitude and the long-lasting retention of cocaine-induced conditioned place preference in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 180: 33–40. doi: 10.1007/s00213-004-2138-6
- Bulfin, L.J., Clarke, M.A., Buller, K.M., Spencer, S.J. 2011. Anxiety and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychological stress are attenuated in male rats made lean by large litter rearing. *Psychoneuroendocrinology.* 36: 1080–1091. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.01.006.
- Campbell, L. F. & Bedi, K. S. (1989). The effects of undernutrition during early life on spatial learning. *Physiology & Behavior.* 45, 883–890. doi: 10.1016/0031-9384(89)90210-2.
- Capuron, L., & Castanon, N. (2016). Role of Inflammation in the Development of Neuropsychiatric Symptom Domains: Evidence and Mechanisms. *Current*

Topics in Behavioral Neurosciences, 31–44.doi:10.1007/7854_2016_14

- Clarke, M., Cai, G., Saleh, S., Buller, K.M., Spencer, S.J. (2013). Being suckled in a large litter mitigates the effects of early-life stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the male rat. *Journal of Neuroendocrinology*. 25: 792–802. doi: 10.1111/jne.12056.
- Colantuoni, C., Rada, P., McCarthy, J., Patten, C., Avena, N. M., Chadeayne, A. (2002) Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. *Obesity Research*. 10: 478–88. doi: 10.1038/oby.2002.66
- Cooper, S., & Al-Naser, H. (2006). Dopaminergic control of food choice: Contrasting effects of SKF 38393 and quinpirole on high-palatability food preference in the rat. *Neuropharmacology*, 50(8): 953–963. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.01.006
- Dantzer, R., Cohen, S., Russo, S. J., & Dinan, T. G. (2018). Resilience and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 74: 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.08.010>
- Dorantes Barrios, J. (2019). *Evaluación Del Enriquecimiento Ambiental En Ratas Adultas, Expuestas A Desnutrición Postnatal Por Aumento De Camada*. Maestría. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Domínguez-Salazar, E., Naser, H.F., Velázquez-Moctezuma, J. (2014) D1-like antagonist blocks conditioned place preference induced by ejaculation in male rats. *Behavior & Brain Research*. 269: 15-19. doi:10.1016/j.bbr.2014.04.026.
- Drolet, G., Dumont, E.C., Gosselin, I., Kinkead, R., Laforest, S., Trottier, J.F. (2001) Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response.

Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 25: 729–41. doi : 10.1016/s0278-5846(01)00161-0

Enes-Marques, S., & Giusti-Paiva, A. (2018). Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. *The Journal of Physiological Sciences*, 68(6): 789–798. doi: 10.1007/s12576-018-0594-8

Farr, S. A., Yamada, K.A., Butterfield, D.A., Abdul, H.M., Xu, L., Miller, N.E. (2008) Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology*. 149(5): 2628–36.

Faust, I. M., Johnson, P. R., & Hirsch, J. (1980). Long-Term Effects of Early Nutritional Experience on the Development of Obesity in the Rat. *The Journal of Nutrition*, 110(10): 2027–2034. <https://doi.org/10.1093/jn/110.10.2027>

Felger, J. C., Li Z, Haroon, E., Woolwine, B. J., Jung, M. Y., Hu, X. Miller, A. H. (2015). Inflammation is associated with decreased functional connectivity within corticostriatal reward circuitry in depression. *Mol Psychiatry*, 21(10): 1358–1365. doi: 10.1038/mp.2015.168

Gomez-Gonzalez, B., Hurtado-Alvarado, G., Esqueda-Leon, E., Miranda, R. S.-, Rojas-Zamorano, J., & Velazquez-Moctezuma, J. (2013). REM Sleep Loss and Recovery Regulates Blood-Brain Barrier Function. *Current Neurovascular Research*, 10(3): 197–207. doi: 10.2174/15672026113109990002

Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*, 29(1)Ñ 415–445. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322

- Guerra, R. F., & Nunes, C. R. O. (2001). Effects of litter size on maternal care, body weight and infant development in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Behavioural Processes*, 55(3): 127–142. doi: 10.1016/s0376-6357(01)00174-7
- Hartmann, J., Wagner, K. V., Liebl, C., Scharf, S. H., Wang, X.-D., Wolf, M., ... Schmidt, M. V. (2012). The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. *Neuropharmacology*, 62(1): 332–339. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.041
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K., & Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(8): 1201–1213. doi: 10.1016/j.pnpbp.2005.08.006
- Hodes, G.E., Kana, V., Menard, C., Merad, M., Russo, S.J., (2015). Neuroimmune mechanisms of depression. *Nat Neurosci*, 18, 1386 – 1393. doi: 10.1038/nn.4113
- Hurtado-Alvarado, G., Velázquez-Moctezuma, J., & Gómez-González, B. (2017). Chronic sleep restriction disrupts interendothelial junctions in the hippocampus and increases blood-brain barrier permeability: CHRONIC SLEEP RESTRICTION DISRUPTS INTERENDOTHELIAL JUNCTIONS. *Journal of Microscopy*, 268(1), 28–38. <https://doi.org/10.1111/jmi.12583>
- Jordan, T.C., Cane, S.E., Howells, K.F. (1981). Deficits in spatial memory performance induced by early undernutrition. *Develop Psychobiolog.* 14: 317–325. <https://doi.org/10.1002/dev.420140404>.
- Karatsoreos, I. N., & McEwen, B. S. (2011). Psychobiological allostasis: resistance,

- resilience and vulnerability. *Trends in Cognitive Sciences*, 15(12): 1364-6613.
doi: 10.1016/j.tics.2011.10.005
- Laus, M.F., Ferreira, V.D.L., Braga, C.T., Sousa, A.S. (2011). Early Postnatal Protein-Calorie Malnutrition and Cognition: A Review of Human and Animal Studies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8, 590–612. doi:10.3390/ijerph8020590.
- Lenth, R. (2019). *Emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means*. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Lueptow, L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, (126) 55718. doi: 10.3791/55718
- Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM) DSM-5 (Visitado el 5 de noviembre de 2019) https://dsm.psychiatryonline.org/pb-assets/dsm/update/Spanish_DSM5Update2016.pdf
- Ménard, C., Pfau, M. L., Hodes, G. E. and Russo, S. J. (2017). Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience. *Neuropsychopharmacology Reviews*. 42, 62–80; doi:10.1038/npp.2016.90
- Molz, P., Ellwanger, J.H., Zenkner, F.F., De campos, D., Prá, D., Putzke, M.T., Franke, S.I.R. (2016). Recognition memory and DNA damage in undernourished young rats. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 88: 1863-1873.
- Nichol, K., Deeny, S.P., Seif, J., Camaclang, K., Cotman, C.W. (2009) Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE epsilon4 mice.

Alzheimer's Dement. 5(4): 287–94.

Patterson, C.M., Bouret, S.G., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E. (2009). Three weeks of postweaning exercise in DIO rats produces prolonged increases in central leptin sensitivity and signaling. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 296: R537–R548. doi: 10.1152/ajpregu.90859.2008.

Patterson, C. M., Bouret, S. G., Park, S., Irani, B. G., Dunn-Meynell, A. A., Levin, B. E. (2010). Large Litter Rearing Enhances Leptin Sensitivity and Protects Selectively Bred Diet-Induced Obese Rats from Becoming Obese. *Endocrinolo.* 151(9): 4270–4279. doi: 10.1210/en.2010-0401.

Pérez-Morales, M., Hurtado-Alvarado, G., Morales-Hernández, I., Gómez-González, B., Domínguez-Salazar, E., & Velázquez-Moctezuma, J. (2018). Postnatal overnutrition alters the orexigenic effects of melanin-concentrating hormone (MCH) and reduces MCHR1 hypothalamic expression on spontaneous feeding and fasting. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 175, 53–61. doi: 10.1016/j.pbb.2018.09.002

Plagemann, A., Heidrich, I., Gotz, F., Rohde, W., Dorner, G. (1992). Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Experimental and Clinical Endocrinology.* 99:154–8. doi: 10.1055/s-0029-1211159.

Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Voits, M., Fink, H., Rohde, W. (1999). Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of

- neonatally overfed rats. *Brain Research*. 836:146–55. doi: 10.1016/S0006-8993(99)01662-5.
- R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.R-project.org/>
- Refojo, D., Schweizer, M., Kuehne, C., Ehrenberg, S., Thoeringer, C., Vogl, A. M., ... Deussing, J. M. (2011). Glutamatergic and Dopaminergic Neurons Mediate Anxiogenic and Anxiolytic Effects of CRHR1. *Science*, 333(6051): 1903–1907. doi: 10.1126/science.1202107
- Reger, M. L., Hovda, D. A., & Giza, C. C. (2009). Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task. *Developmental Psychobiology*, 51(8): 672–678. doi: 10.1002/dev.20402
- Rödel, H. G., Meyer, S., Prager, G., Stefanski, V., & Hudson, R. (2010). Litter size is negatively correlated with corticosterone levels in weanling and juvenile laboratory rats. *Physiology & Behavior*, 99(5): 644–650. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.01.032
- Rodgers, R., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *McEwen*, 21(6): 801–810. doi: 10.1016/s0149-7634(96)00058-9
- Rodrigues, A.L., de Moura, E.G., Passos, M.C., Trevenzoli, I.H., da Conceicao, E.P., Bonono, I.T., Nogueira, J.F., Lisboa, P.C. (2011). Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 22(2):109–17. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.11.013.

- Rodríguez, J., Kohn, R. y Aguilar, S. (2009). Reseña: Epidemiología de los trastornos mentales en América Latina y el Caribe. *Revista de la Facultad Nacional de Salud Pública*. 28(2). Bogotá. pp. 132 – 144. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v28n2/v28n2a11.pdf>
- Russo, S. J., Murrough, J. W., Han, M.-H., Charney, D. S., & Nestler, E. J. (2012). Neurobiology of resilience. *Nature Neuroscience*, 15(11): 1475–1484. doi: 10.1038/nn.3234
- Salari, Ali-Akbar., Samadi, H., Homberg J.R., Kosari-Nasab, M. (2018). Small litter size impairs spatial memory and increases anxiety-like behavior in a strain-dependent manner in male mice. *SCIENTIFIC REPORTS*. 8:11281. doi: 10.1038/s41598-018-29595-0.
- Sanacora, G., Treccani, G., & Popoli, M. (2012). Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology*, 62:63–77. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.036
- Sapolsky, R.M. & Meaney, M.J. (1986). Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Behavior Review*. 11: 65–76. doi: 10.1016/0165-0173(86)90010-X
- Sarmiento, de V. V., Salgueiro, M. S., Araújo, G. R., Carneiro, B. B., Ximenes-da-Silva, A. (2012). Large litters rearing changes brain expression of GLUT3 and acetylcholinesterase activity in adult rats. *Neuroscience Letters*. 525: 34-38. doi: 10.1016/j.neulet.2012.07.054.

- Siervo, M., Arnold, R., Wells, J. C., Tagliabue, A., Colantuoni, A., Albanese, E., Stephan B. C. (2011) Intentional weight loss in overweight and obese individuals and cognitive function: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*, 12: 968–83. doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00903.x
- Singmann, H., Bolker, B., Westfall, J., Aust, F., & Ben-Shachar, M. S. (2019). *Afex: Analysis of factorial experiments*. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=afex>
- Stedenfeld, K. A., Clinton, S. M., Kerman, I. A., Akil, H., Watson, S. J., & Sved, A. F. (2011). Novelty-seeking behavior predicts vulnerability in a rodent model of depression. *Physiology & Behavior*, 103(2): 210–216. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.02.001
- Strine, T. W., Mokdad, A. H., Balluz, L. S., Gonzalez, O., Crider, R., Berry, J. T., Kroenke, K. (2008) Depression and anxiety in the United States: findings from the 2006 Behavioral Risk Factor Surveillance System. *Psychiatr Serv*, 59: 1383–90. doi: 10.1176/ps.2008.59.12.1383
- Timper, K., & Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Disease Models & Mechanisms*, 10(6): 679–689. doi: 10.1242/dmm.026609
- Touma, C., Bunck, M., Stein, H., Zeh, R., & Landgraf, R. (2006). Mice selected for high or low stress reactivity: A new animal model for affective disorders. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 27(1): 56. doi: 10.1016/j.yfrne.2006.03.114
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. *Addiction Biology*, 12(3-4): 227–

462. doi: 10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x

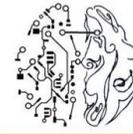
Vickers, M. H., Breier, B. H., Cutfield, W. S., Hofman, P. L., Gluckman, P. D. (2000) Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E83–E87. doi: 10.1152/ajpendo.2000.279.1.E83.

Wagner, K. V., Wang, X.-D., Liebl, C., Scharf, S. H., Müller, M. B., & Schmidt, M. V. (2011). Pituitary glucocorticoid receptor deletion reduces vulnerability to chronic stress. *Psychoneuroendocrinology*, 36(4): 579–587. doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.09.007

World Health Organization Global Burden of Disease. 2004. [(visitado el 1 de noviembre 2019)]. Disponible online: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_part3.pdf.

World Health Organization. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems; 10th revision for 2015; WHO: Geneva, Switzerland, 2015; Disponible online: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2015/en> (visitado el 1 de noviembre 2019).

Yau, P. L., Castro, M. G., Tagani, A., Tsui, W. H., Convit, A. (2012) Obesity and metabolic syndrome and functional and structural brain impairments in adolescence. *Pediatrics*, 130: e856–64. doi: 10.1542/peds.2012-0324



Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

Maritza Montserrat Cervantes Palacios

Quien asistió y presentó el trabajo:

Litter size effect on vulnerability and resilience

Por:

Maritza Montserrat Cervantes Palacios, Marcel Pérez Morales,
Kurt Hoffman, Beatriz Gómez González, Emilio Domínguez Salazar

En la modalidad de presentación cartel durante el
III Congreso de Neurobiología, 22 -26 de septiembre 2019, Guanajuato, Gto.

**Atentamente
Comité Organizador**

Dra. Susana Castro Obregón

Dra. Aliesha González Arenas

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dr. Octavio García

Dr. Hugo Merchant Nancy



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00212

Matrícula: 2173801264

Efecto del tamaño de la camada sobre la vulnerabilidad y resiliencia.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 29 del mes de enero del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JAVIER VELAZQUEZ MOCTEZUMA
- DRA. GABRIELA HURTADO ALVARADO
- DR. KURT LEROY HOFFMAN
- DR. OSCAR GONZALEZ FLORES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: MARITZA MONTSERRAT CERVANTES PALACIOS



MARITZA MONTSERRAT CERVANTES PALACIOS ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

MTRA. ROSANA SERRANO DE LA PAZ DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JAVIER VELAZQUEZ MOCTEZUMA

VOCAL

DRA. GABRIELA HURTADO ALVARADO

VOCAL

DR. KURT LEROY HOFFMAN

SECRETARIO

DR. OSCAR GONZALEZ FLORES