



**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**EFFECTOS DE LAS EXPERIENCIAS ADVERSAS TEMPRANA Y
TARDÍA EN LA CONDUCTA DE INGESTA Y CARACTERÍSTICAS
MORFOMÉTRICAS Y ESTEREOLÓGICAS DE LA GLÁNDULA
SUPRARRENAL DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY SOMETIDAS A
ESTRÉS DURANTE SU VIDA ADULTA.**

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la Universidad de La Frontera, para obtener el Grado de Licenciado en Tecnología Médica, con Mención en Laboratorio Clínico, Hematología y Banco de Sangre.

**Autores : Cristian Sandoval Vásquez
Carla Sanhueza Catalán**

**TEMUCO, CHILE
2012**



**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**EFFECTOS DE LAS EXPERIENCIAS ADVERSAS TEMPRANA Y
TARDÍA EN LA CONDUCTA DE INGESTA Y CARACTERÍSTICAS
MORFOMÉTRICAS Y ESTEREOLÓGICAS DE LA GLÁNDULA
SUPRARRENAL DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY SOMETIDAS A
ESTRÉS DURANTE SU VIDA ADULTA.**

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la Universidad de La Frontera, para obtener el Grado de Licenciado en Tecnología Médica, con Mención en Laboratorio Clínico, Hematología y Banco de Sangre.

**Autores : Cristian Sandoval Vásquez
Carla Sanhueza Catalán**

Tutor : Dr. Mariano del Sol Calderón

**TEMUCO, CHILE
2012**

PROFESOR GUIA: DR. MARIANO DEL SOL CALDERÓN

TECNÓLOGO MÉDICO, MAGÍSTER EN ANATOMÍA, DOCTOR EN CIENCIAS.
PROFESOR TITULAR, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS,
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA.
TEMUCO, CHILE.

Dedicamos esta tesis:

A nuestros padres, por darnos todo su amor incondicional, por creer en nosotros, por guiarnos y darnos día a día el apoyo para alcanzar nuestras metas.

A nuestros hermanos por la amistad, la comprensión y el apoyo absoluto que nos han entregado.

A Dios por darnos la vida y la fuerza necesaria para concretar todo esto.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Mariano del Sol Calderón, por aceptarnos como alumnos tesistas, confiar en nuestra capacidad de trabajo y permitirnos ser partícipes de un extraordinario proyecto de investigación. Agradecemos también todo el apoyo, los conocimientos y experiencias compartidas durante cada etapa de nuestro trabajo.

A Mg. Bélgica Vásquez Pastene le agradecemos su infinita generosidad al compartir con nosotros su tiempo y entregarnos no sólo los conocimientos teóricos y prácticos del trabajo científico, sino también su gran amistad, confianza, y apoyo sobre todo durante aquellos momentos más difíciles. Sin duda, recordaremos con inmensa alegría todas las anécdotas que compartimos.

A Don Pedro Seguel Cartez le agradecemos por entregarnos su experiencia en la manipulación de animales de laboratorio y su buena voluntad para ayudarnos en toda la etapa experimental.

A la Sra. Sandra Villa Baier, secretaria de Morfología por recibirnos siempre con una amable sonrisa y buena disposición para con nosotros. A los auxiliares de Morfología por toda la amabilidad.

A la Universidad de La Frontera, a nuestros profesores, investigadores y a todas aquellas personas que sientan hicieron posible la realización de esta Tesis.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
Marco Teórico	5
Material y Métodos	15
Resultados	23
Discusión	32
Conclusiones	40
Referencias Bibliográficas	42

RESUMEN

La ruptura temprana del vínculo materno y el aislamiento social son variables que están involucradas con los comportamientos social y emocional y también con el aumento de la ansiedad, especialmente en situaciones estresantes. Sin embargo, no se dispone de investigaciones que expliquen el fenómeno de sobrealimentación por ansiedad asociado a estos factores en un modelo animal y los aspectos morfológicos de la glándula suprarrenal (GSR). Utilizamos 35 ratas hembras recién nacidas, en grupos de 7 en condiciones de lactancia y alimentación estandarizadas. Los grupos experimentales fueron expuestos a experiencias adversas temprana y tardía, y sometidas a estrés crónico intermitente en la adultez. Se evaluó la conducta de ingesta de los grupos, y se aisló la GSR izquierda de cada animal determinando características morfométricas y parámetros estereológicos. El consumo de alimento para los grupos fue mayor en el período de anticipación. El peso absoluto fue mayor en los grupos control C2 y experimental EA y el número de células por mm^3 , el porcentaje de tejido glandular y la densidad de superficie en la zona fascicular de la GSR fue menor en el grupo EC.

Palabras clave: Rata, estrés, alimentación, experiencia adversa, glándula suprarrenal.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas han sido estudiadas en ratas múltiples variables que interactúan con la situación de estrés para generar distintos tipos de respuestas alimenticias, tales como, el uso de alimentos palatables, el aislamiento social, el hacinamiento, el periodo de privación de alimento, el uso de ratas dominantes y subordinadas y, la interrupción temprana del vínculo social. Sin embargo, existen discrepancias en los resultados obtenidos, ya que estos varían según la variable en estudio y las características del agente estresor utilizado. Por otra parte, la literatura señala una relación entre el estrés y la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA), que genera diversas alteraciones en las características morfológicas de la corteza de la glándula suprarrenal (GSR), lo cual también estaría en estrecha relación con la síntesis y secreción de glucocorticoides que median la respuesta fisiológica al estrés.

Si bien es cierto, se han realizado estudios como se altera con el estrés la conducta de ingesta en la vida adulta y la morfología de la GSR de ratas, no existen estudios que nos entreguen información sobre el efecto de las experiencias adversas temprana y/o tardía en la conducta de ingesta y características morfológicas de la GSR de ratas cuando éstas son sometidas a estrés durante su vida adulta.

Por lo anterior, nuestro objetivo fue conocer experimentalmente, a través del modelo de alteración del vínculo social temprano madre – cría e interrupción por aislamiento tardío del vínculo social, el efecto sobre la conducta alimenticia y las características morfológicas de la GSR en ratas de la cepa Sprague – Dawley sometidas a estrés crónico intermitente.

MARCO TEÓRICO

El concepto de estrés hace referencia a una respuesta no específica del cuerpo a cualquier amenaza o fuerza externa, real o percibida, que gatilla el “Síndrome de Adaptación General” en el organismo, (Ziegler & Herman, 2002; Goldstein & Kopin, 2007), siendo el eje HHA uno de los principales elementos participantes. Las neuronas del núcleo hipofisiotrópico en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPH), secretan hormona liberadora de corticotropina (CRH) y vasopresina a la circulación portal de la eminencia media. Estas hormonas de liberación actúan sobre la hipófisis anterior para promover la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la circulación sistémica. ACTH actúa sobre la corteza suprarrenal interior (es decir, la zona fasciculada) para producir hormonas glucocorticoides (corticosterona en ratas y cortisol en humanos) (Herman *et al.*, 1996; Ulrich–Lai *et al.*, 2006).

Chrousos (2009) señaló que en respuesta al estrés se activan distintas funciones del sistema nervioso central, entre ellas, la facilitación de la excitación, el estado de alerta, la vigilancia, la cognición, la atención y la agresión. Por otro lado, genera la inhibición de las funciones vegetativas (por ejemplo: la reproducción, alimentación o crecimiento), y activación de los circuitos de retroalimentación negativa. A nivel periférico habría un aumento de la oxigenación y nutrición de los huesos, músculos, cerebro y corazón; aumento del tono cardiovascular y la respiración; aumento del metabolismo, la desintoxicación de los productos metabólicos y sustancias extrañas. Dado la amplia gama de funciones, también se ha asociado a la aparición de trastornos psiquiátricos y/o somáticos complejos tales como ansiedad, depresión, insomnio, dolor crónico y síndromes de fatiga, la obesidad, el síndrome

metabólico, hipertensión esencial, diabetes tipo 2, aterosclerosis con sus secuelas cardiovasculares y osteoporosis, así como la respuesta inflamatoria autoinmune y trastornos alérgicos (Chrousos & Kino, 2007).

Nadal & Armario (2010) señalaron que los efectos del estrés se encuentran relacionados con las características del estímulo estresor utilizado, es decir, la naturaleza del estímulo (físico o psicosocial), así como su intensidad y duración. Dependiendo del período de tiempo que dure el estrés, se podrá clasificar como agudo o crónico. Otro aspecto importante a considerar es la imprevisibilidad (imposibilidad de anticipación) y la ausencia del control sobre el estímulo (es decir, poner fin o disminuir su intensidad, duración o frecuencia).

Durante las últimas décadas, diversos autores han estudiado el efecto de distintos tipos de agentes en relación a la conducta alimenticia.

En primer lugar, la conducta alimenticia se define como un conjunto de acciones que lleva a cabo un individuo en respuesta a una motivación biológica, endocrina, fisiológica, psicológica y socio – cultural vinculadas a la ingestión de alimentos (Osorio *et al.*, 2002; Saucedo-Molina & Pérez-Mitré, 2004 y Santacoloma & Quiroga, 2009).

Al respecto, Torres-González *et al.* (2010) demostraron experimentalmente en modelos realizados en ratas, que habría un aumento en el consumo de alimento y de agua endulzada con glucosa durante el período de estrés crónico, en donde las ratas hembras presentaron un mayor consumo que los machos. Habhab *et al.* (2009), encontraron que mujeres sometidas a un alto nivel de estrés consumían alimentos más dulces en comparación a mujeres sometidas a un bajo nivel de estrés. Además, en las mujeres sometidas a un

alto nivel de estrés hubo un consumo de alimentos dulces significativamente mayor al consumo de alimentos salados. Marti *et al.* (1994), observaron que la magnitud de los cambios en la ingesta de alimentos después de la exposición crónica a factores de estrés está estrechamente relacionada con su intensidad y no con la duración del factor estresor. Además concluyen que un factor estresor severo como la inmovilización, reduce la ingesta de alimentos a un cierto nivel que es independiente de su duración diaria.

Por otra parte, Bartolomucci *et al.* (2009), señalaron una tendencia a la hipofagia con una consiguiente reducción del peso corporal en ratas socialmente aisladas. Sin embargo, aquellas ratas bajo estrés social crónico que mostraban un comportamiento dominante, desarrollaron un aumento de la concentración de norepinefrina en el tejido graso, menor peso perigonadal de grasa y menor diámetro de los adipocitos, y por lo tanto una menor vulnerabilidad hacia la obesidad aún cuando mostraban hiperfagia frente a una dieta sabrosa y alta en grasas.

Cárdenas – Villalvazo *et al.* (2010) señalaron que no existe una relación directa del estrés por aislamiento y/o hacinamiento, con el aumento del consumo de alimento ni con la obesidad. Por el contrario, observaron reducción temporal del consumo y retraso pasajero de la tasa de crecimiento. Lo anterior es consecuente con investigaciones realizadas por Adzic *et al.* (2009), quienes establecieron que el estrés social crónico puede deprimir por retroacción al eje HHA con la consecuente disminución en la ingesta de alimentos.

Díaz & Bruner (2007) estudiaron los hábitos alimenticios en ratas, observando en éstas un mayor consumo de comida y agua durante el período

de oscuridad, percibiendo también que los episodios de beber ocurren más cercanos en tiempo a la comida precedente que la comida subsecuente. Además, establecieron que en condiciones irrestrictas de alimento y agua, éstas se alternarían naturalmente entre comer y beber.

Otros autores han estudiado los efectos al variar el tiempo de acceso al alimento. López-Espinoza *et al.* (2001) experimentaron con dos programas de privación parcial de alimento en ratas (12 y 17 horas), seguidos de un período de libre acceso a comida y agua. Al término de los períodos de restricción se observó, una alteración del patrón alimenticio caracterizado por una reducción en el consumo total de alimento y un aumento sustancial en el peso corporal durante el período de post-privación. Lo anterior concuerda con el trabajo realizado por Díaz *et al.* (2009), donde se demostró que el peso de las ratas expuestas a intervalos largos entre accesos al alimento disminuyó conforme el período de privación aumentó. Por otro lado, las ratas expuestas a intervalos de tiempo cada vez más cortos entre los accesos a la comida no modificaron su velocidad de consumo.

El sabor del alimento también es un factor determinante en la ingesta de comida. Se ha comprobado experimentalmente que un sabor aversivo genera una severa autoprivación, lo que a su vez desencadena grandes comilonas y aumento en el consumo de agua luego del periodo de privación (Galindo & López-Espinoza, 2006).

Otros autores, han experimentado con los efectos estresantes de una experiencia adversa temprana relacionándolos con la conducta que se adoptará durante la vida adulta. Ruetti *et al.* (2010) utilizando un modelo de estrés

aleatorio neonatal, estudiaron sus efectos en las respuestas hacia la frustración empleando distintos estresores físicos aleatorios durante 5 ó 10 minutos, tales como la exposición a superficies frías, la manipulación, estrés por calor, sacudías, privación de la madre, suspensión de la cola, entre otras. Los resultados indican que los animales expuestos a estrés neonatal presentaron una respuesta atenuada a la frustración durante la vida adulta, es decir, en este caso recuperan mas rápidamente los niveles de ingesta luego de recibir una solución azucarada que disminuye del 32% al 4% de azúcar, lo que sugiere un ajuste más rápido a los cambios negativos del medio ambiente.

Ojea *et al.* (2010), establecieron que la ruptura del vínculo primario en ratas produce disrupción del mecanismo de escape. Toth *et al.* (2008), demostraron que una interrupción de la interacción madre – cría o de otros tipos de estrés en ratas, altera el comportamiento social así como la emotividad en la edad adulta, pero no necesariamente la función cognitiva. Pascual (2002), señaló que existe una relación directa entre el vínculo social madre – cría y la sensibilización frente a situaciones de estrés moderado en ratas. La interrupción temprana de este vínculo, produce reducción significativa de la conducta exploratoria y cambios morfológicos neuronales a nivel frontal asociados a disminución del árbol dendrítico y aumento en la actividad del eje HHA. El aumento de los corticoides, producto de la hiperactividad de este eje ocasionaría atrofia dendrítica y muerte neuronal en algunas regiones del hipocampo (Magariños *et al.*, 1996).

Así mismo, se ha señalado que la interrupción temprana del vínculo social madre – cría y un posterior aislamiento social en ratas, induciría a un

mayor perfil ansiogénico durante estados de estrés en la vida adulta; además, luego de un período posterior de resocialización no se lograría recuperar el deterioro neuronal generado por el aislamiento, ni normalizar los niveles de ansiedad con respecto al grupo control (Pascual *et al.*, 2003). Este aumento de la ansiedad estaría mediada por un incremento de los receptores tipo 2 del factor liberador de corticotropina en el núcleo dorsal del rafe (Bledsoe *et al.*, 2011).

Kwak *et al.* (2009), demostraron que en ratas separadas tempranamente de la madre se ve aumentado el número y alteradas las características astrogiales de la corteza prefrontal. Probablemente, la ruptura temprana del vínculo madre – cría en ratas puede interferir con el proceso normal de proliferación y muerte celular, así como también en la sinaptogénesis durante el desarrollo de los sistemas de neurotransmisores y/o neuromoduladores, lo que puede conducir finalmente a la aparición de un comportamiento ansiogénico acentuado e hiperactividad por déficit atencional.

Por otro lado, en un estudio realizado por Alario *et al.* (1987), ratas Wistar fueron tratadas de forma crónica durante 30 días para investigar el efecto de la activación del eje HHA mediante el sometimiento a estrés por ruido, sobre la ganancia de peso corporal, la conducta de ingesta y desarrollo de la glándula suprarrenal. Los resultados del experimento indicaron una disminución en la ingesta de alimento y del peso corporal en aquellas ratas estresadas. Se observó también una reducción del peso absoluto (mg), pero no del peso relativo (mg/g de peso corporal) de las GSR con respecto a los controles. Por otra parte, tampoco se observaron diferencias en el contenido de ADN adrenal

absoluto (μg), lo que sugiere que el número de células no se ve afectado por estrés por ruido. Sin embargo, el alto contenido relativo de ADN adrenal ($\mu\text{g}/\text{mg}$ gland.) en el grupo estresado indica un tamaño más pequeño en dichas células. A partir de lo anterior, se propone que el bajo peso suprarrenal y el pequeño tamaño de las células en las GSR en las ratas estresadas por ruido, podría ser debido a un menor tamaño de los animales mediante la reducción de ganancia de peso corporal en comparación con las ratas control.

Pellegrini *et al.* (1998), señalaron la existencia de un vínculo funcional entre las GSR y el estrés inducido por inmovilización en ratas. El peso promedio de las GSR de las ratas intervenidas con estrés fue sólo ligeramente mayor que la del grupo control, sin embargo, histológicamente a nivel de corteza suprarrenal se evidenció un aumento en el espesor de la zona fasciculada y una reducción del contenido lipídico en las ratas estresadas, especialmente el colesterol.

Ulrich-Lai *et al.* (2006), establecieron que el estrés crónico aleatorio en ratas provoca una reducción de la ganancia de peso corporal y propicia el aumento del peso de la GSR. Demostraron además, que el estrés crónico variable se asocia a un aumento en los niveles plasmáticos de corticosterona, lo que induce un estado de hiperplasia en la zona glomerular y en la parte externa de la zona fasciculada e hipertrofia en la parte interna de la zona fasciculada y zona medular.

Koko *et al.* (2004) indicaron los efectos del estrés por exposición al calor sobre las GSR. Las masas absolutas y relativas de la GSR de ratas expuestas a estrés disminuyeron significativamente, así como la masa absoluta de la

corteza suprarrenal en comparación con los controles, probablemente como consecuencia de la reducción de todas las zonas corticales (zona glomerular, zona fasciculada y zona reticular), especialmente la zona fasciculada. Así mismo, la investigación histológica de la GSR reveló la existencia de regiones claras y oscuras en la corteza suprarrenal de las ratas estresadas. Las células de las regiones claras estaban llenas de grandes gotas de lípidos, lo que no ocurría en las zonas corticales oscuras. Se observó además, condensación de los núcleos en células de la zona reticular. La fibrosis intersticial estaba presente en todas las partes de las zonas corticales, así como en la médula. La zona glomerular de las ratas control era abundante en núcleos, en comparación con las ratas estresadas, y se presentaban muchas figuras mitóticas en las zonas corticales exteriores. La densidad del volumen de la médula aumentó significativamente, y la de la corteza disminuyó. La zona glomerular disminuyó significativamente, y el de la zona reticular aumentó en las ratas expuestas a estrés por calor. No hubo diferencias en la densidad de volumen de la zona fasciculada entre los dos grupos de ratas.

Penney & Brown (2005), estudiaron la morfología estructural de las células de la corteza suprarrenal de mono ardilla debido a que éstos se caracterizan por secretar grandes cantidades de cortisol y mantener los niveles plasmáticos durante períodos prolongados de tiempo. Producto de lo anterior, utilizaron un modelo de estrés agudo por restricción de movimiento durante 1 hora. En el estudio morfológico de las GSR, los animales estresados mostraron en la zona glomerular un aspecto celular comprimido y más sudanofílicas que células de la zona glomerular de los animales de control. Las células de la zona

fasciculada exterior se mantuvieron relativamente sin cambios. En la zona fasciculada interna, los animales experimentales exhibieron una pérdida parcial de lípido intracelular, una vacuolización disminuida, y aumento de la eosinofilia. Las células de la zona reticular mostraron una disminución marcada en los lípidos, incluso algunas células aparecen prácticamente libres de lípidos.

Milosevic *et al.* (2005), utilizaron un modelo de estrés crónico en ratas hembras sometidas a luz constante de 600 lux, durante 95 días. Los resultados obtenidos demostraron que la exposición crónica provoca una disminución tanto del peso corporal, como del peso relativo y absoluto de la GSR. También observaron un incremento significativo del volumen absoluto y relativo de la zona fasciculada, citoplasmas con zonas más claras, junto con un aumento del volumen celular y núcleos en dicha zona, comparado con ratas controles que mantuvieron con ciclo día – noche de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Como conclusión, los autores proponen que la exposición prolongada a la luz activaría los sistemas de estrés y consecuentemente aparecería hipertrofia en las células de la zona fasciculada, junto con un aumento en los niveles de corticosterona.

Recientemente, Petrovic – Kosanovic *et al.* (2012), a pesar de utilizar exactamente el mismo modelo experimental anterior, en sus resultados señalaron una disminución en la densidad de volumen de la cápsula y de la zona glomerulosa; aumento del volumen de células, disminución de la densidad de número y disminución del diámetro de los vasos sanguíneos en la zona fasciculada.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 35 ratas hembras albinas de la cepa Sprague-Dawley, provenientes de la Unidad de Cirugía Experimental del Doctorado en Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Frontera. Las ratas recién nacidas fueron separadas en 5 grupos, cada uno con siete ratas asignadas aleatoriamente. Durante toda la experiencia las condiciones ambientales fueron controladas respecto a temperatura, ruido ambiental y ciclo día – noche de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Las jaulas contaron con un bebedero graduado para el agua y un recipiente metálico para el alimento en su interior.

Los grupos fueron distribuidos de la siguiente forma:

Grupo control 1 (C1) Grupo sin experiencias adversas temprana ni tardía, sin exposición a estrés crónico intermitente (utilizado como control morfológico normal de la GSR): Ratas recién nacidas con 23 días de lactancia, fueron separadas de su madre y mantenidas en jaula bajo condiciones de interacción social normal, agua y alimento (pellet) *ad libitum* durante toda la experiencia (116 días).

Grupo control 2 (C2) Grupo sin experiencias adversas temprana ni tardía, expuesto a estrés crónico intermitente: Ratas recién nacidas con 23 días de lactancia, fueron separadas de su madre y mantenidas en jaula bajo condiciones de interacción social normal, agua y alimento (pellet) *ad libitum* por un período de 110 días.

Grupo experimental A (EA) Experiencia adversa temprana, expuesto a estrés crónico intermitente: Ratas recién nacidas con 18 días de lactancia, fueron separadas de su madre y mantenidas en jaula bajo condiciones de

interacción social normal, agua y alimento (pellet) *ad libitum* por un período de 110 días.

Grupo experimental B (EB) Experiencia adversa tardía, expuesto a estrés crónico intermitente: Ratas recién nacidas con 23 días de lactancia, fueron separadas de su madre y mantenidas en jaula bajo condiciones de interacción social normal, agua y alimento (pellet) *ad libitum* por un periodo de 80 días. Posteriormente, fueron colocadas en jaulas individuales impidiendo todo tipo de interacción social hasta completar los 110 días. En este período se les ofreció agua y alimento (pellet) *ad libitum*.

Grupo experimental C (EC) Experiencia adversa temprana y tardía, expuesto a estrés crónico intermitente: Ratas recién nacidas con 18 días de lactancia, fueron separadas de su madre y mantenidas en jaula bajo condiciones de interacción social normal, agua y alimento (pellet) *ad libitum* por un periodo de 80 días. Posteriormente, fueron colocadas en jaulas individuales impidiendo todo tipo de interacción social hasta completar los 110 días. En este período también tuvieron acceso a agua y alimento (pellet) *ad libitum*.

Los integrantes de los grupos **C2, EA, EB y EC** fueron mantenidos individualmente por un período de 6 días con la finalidad de someterlos a estrés crónico intermitente.

Para la aplicación del estrés crónico intermitente los integrantes de cada grupo fueron privados de alimento durante 20 horas, y posteriormente se les suministró en presencia de un estímulo (luz roja) en la primera fase experimental, “*Fase de anticipación*”, 50 g de *pellet* y 50 g de *Quaker Quadritos®*, junto a 200 ml de agua; al término de este período se les retiró el

alimento para ser medido. Posteriormente, durante la “Fase de estrés”, se les suministró por dos horas más, nuevamente 50 g de *pellet* y 50 g de *Quaker Quadritos®*, pero esta vez en presencia de un factor estresor (*tail pinch*) (Katz & Roth, 1979); al término de este período se les retiró el *tail pinch*. Así mismo, fueron retirados el alimento y el agua para ser cuantificado su consumo. A seguir, se les permitió beber agua *ad libitum* hasta el día siguiente al comenzar nuevamente con la fase de estrés.

Fórmulas nutricionales de los alimentos utilizados en el experimento: Los macronutrientes de la dieta en base a *pellet* estaban constituidos por 5% de fibras y 20% de proteínas, y el *Quaker Quadritos®* por 4,5% de grasa, 11% de proteínas y 70% de hidratos de carbono.

Luego de evaluar la conducta de ingesta (días post natal 116), las ratas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical para extraer la GSR izquierda de cada animal, las cuales fueron disecadas mesoscópicamente bajo lupa 10X. Se determinó el alto, ancho y grosor de cada glándula con un paquímetro digital marca Stainless Hardened (0 – 150 mm), el peso en una balanza analítica marca A&D Orion HR 120 (0,1 mg hasta 120 g) y el volumen a través del método de Scherle (1970). Este método consiste en colocar sobre una balanza un vaso precipitado conteniendo suero fisiológico. Posteriormente, se amarra un hilo por uno de sus extremos a un soporte y por el otro extremo se amarra un pequeño gancho sumergido en el suero fisiológico, sin tocar las paredes del vaso precipitado. A seguir, se pesa todo el sistema (peso inicial P1). Después, se coloca el órgano dentro del vaso precipitado, sujeto al pequeño gancho quedando suspendido dentro de éste, sin tocar sus paredes y se pesa

nuevamente el conjunto (peso final P2). De esta manera, conociendo el peso (en g) del órgano y sabiendo que $G=1\text{g/ml}$ ($G=$ gravedad específica) para órganos sólidos inmersos en el agua (Aherne & Dunnill, 1982) o más exactamente $G=1,0048\text{ g/ml}$ según Weibel (1979) se estima el volumen de cada órgano.

Para el estudio estereológico, se seleccionaron las GSR del lado izquierdo de las cinco primeras ratas de cada grupo, las que fueron fijadas en formalina tamponada al 10%. Una vez fijada la muestra se procedió según el **protocolo convencional para deshidratación, aclaración e inclusión en parafina para muestras histológicas:**

a) Deshidratación de las muestras utilizando una batería de alcoholes ascendente (Merck®).

- Alcohol de 70°, 1 hora.
- Alcohol de 80°, 1 hora.
- 3 alcoholes de 96°, 1 hora cada uno.
- 3 alcoholes de 100°, 1 hora cada uno

b) Aclaración de las muestras utilizando un reactivo intermediario.

- Xilol, 3 cambios por 1 hora cada uno.

Tanto el xilol como el etanol absoluto usados para crear esta batería son de marca Merck®.

Para la confección de los tacos se usó Paraplast Tissue Prep® marca Fisher Scientific que es una mezcla de parafina y polímeros sintéticos, la que fue mantenida en su punto de fusión (57°C) hasta el momento de agregarla a los moldes que contenían la GSR en estudio. Cada muestra se incluyó

completa. Luego se dejó a temperatura ambiente hasta que solidificara. Obtenidos los tacos, se usó el micrótopo Microm HM – 325 para obtener cortes histológicos de 4 µm de espesor. De cada GSR se realizaron 5 cortes los que fueron montados en los portaobjetos con la ayuda de un baño de flotación marca DFL® modelo 1052.

Para el estudio estereológico se utilizó la **Tinción de Hematoxilina – Eosina**, descrita por Prophet *et al.* (1995).

- Desparafinar e hidratar las láminas hasta llegar al agua destilada.
- Teñir con hematoxilina de Harris, filtrada recientemente por 1 minuto.
- Lavar en agua corriente por 10 minutos.
- Teñir con eosina por 1 minuto.
- Deshidratar con batería de alcoholes ascendentes y aclarar con xilol.
- Montar con medio resinoso (Entellán®).

Se observaron 5 campos de cada corte, observando un total de 125 campos. Las láminas fueron observadas en un microscopio óptico Olympus® modelo CX31, con cámara marca Moticam® modelo 480. Las imágenes fueron proyectadas en un monitor de pantalla plana marca Sony®. Para realizar la estereología se usó el test multipropósito M42.

El sistema test multipropósito M42 cuenta con las siguientes características: P_T : 42 (P_T : números de puntos test); L_T : 21xd (L_T : largo de la línea test, d: largo de cada línea del test, debe calibrarse según el aumento que se esté utilizando en el microscopio); A_T : 36,36x d2 (A_T : Área test).

Los parámetros estereológicos medidos en la zona fasciculada de la GSR fueron los siguientes: densidad de número (N_v), densidad de volumen (V_v), y densidad de superficie (S_v).

Para determinar la densidad de número (N_v), es decir, el número de estructuras por unidad cúbica, se aplicó el método del Disector. Sabiendo que los cortes eran de 4 μm de grosor, se identificaron dos campos microscópicos idénticos utilizando el macro y el micro. Cada campo fue considerado como una cara en un bloque de tejido. En las dos caras se identificaron las estructuras que se estaban contando y se consideró solo la cara superior, así fueron contadas las células glandulares que sólo aparecían en esta cara. Conociendo el espesor de tejido que separa las dos caras (e) que es de 4 μm y como se trabajó en un área determinada por el sistema-test M42 (A_T), se pudo calcular el volumen del Disector de tejido así delimitado ($V(\text{dis})$) y evaluar directamente el N_v de la estructura.

$$N_v: \Sigma Q^- / V(\text{dis})$$

$$V(\text{dis}): e \times A_T$$

La densidad de volumen (V_v), es decir el porcentaje de tejido glandular en la zona fascicular de la GSR, está determinado por el cociente entre el número de puntos que alcanza la célula glandular (P_p) por el número de puntos

test (P_T). Esto determina un valor representado en porcentaje de la estructura (%).

$$Vv: Pp/ P_T.$$

La densidad de superficie (S_v), determinado por el cuociente entre 2 veces las intersecciones (I) contada sobre la estructura en el sistema Test M42 y la longitud total de las líneas del M42 (L_T). Así, la interpretación está dada por cuantas unidades² de estructuras en 1 unidad³ presenta el órgano en estudio.

$$S_v: 2I/L_T$$

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Stata versión 11.0 y se aplicó la prueba ANOVA. Se utilizó un nivel de significación de 5% para las pruebas estadísticas. Una vez obtenidos estos datos, se calculó el promedio (X), la desviación estándar (DE), error estándar ($EE: DE/\sqrt{n}$), n = número de casos, coeficiente de variación ($CV: DE/X$) y coeficiente de error ($CE: EE/X$).

RESULTADOS

1. Conducta de Ingesta

El consumo total de alimento, es decir Quaker® y Pellet, para los grupos fue mayor en el período de anticipación. Entre los grupos experimentales el que tuvo un mayor consumo, tanto en la anticipación como durante todo el período de experimentación, fue el grupo EA, seguido del grupo EC (figura 1).

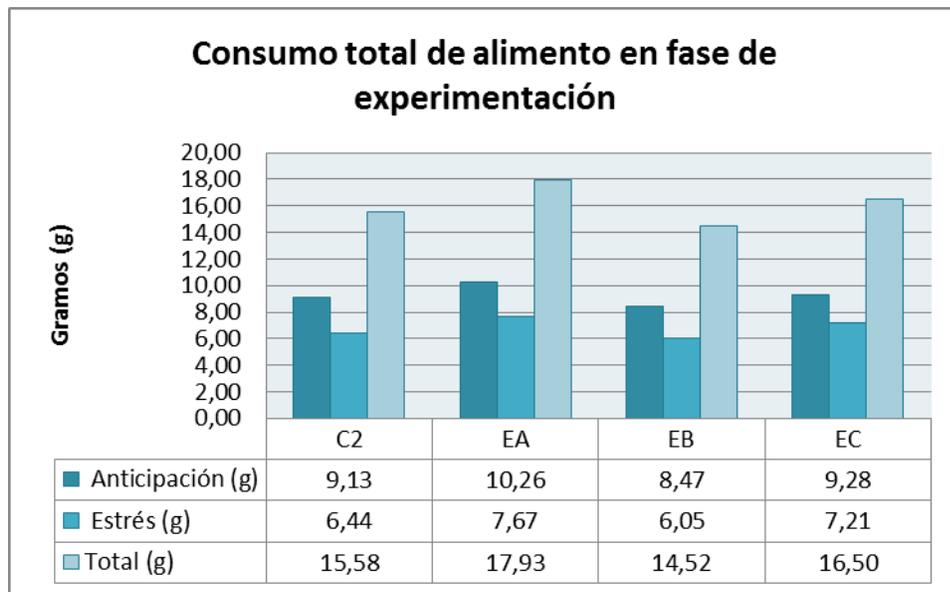


Figura 1. Consumo total de alimento (Quaker® y Pellet) durante el período de anticipación, estrés y período total de experimentación en ratas hembras sometidas a estrés crónico intermitente.

El consumo de pellet durante los 6 días de exposición a estrés crónico intermitente, tanto durante el período de anticipación (figura 2), como durante el período de estrés (figura 3), fue mayor en los grupos con experiencias adversas temprana (EA) y tardía (EB) comparados con el grupo control (C2). Siendo el

grupo más vulnerable (EC) el de mayor consumo total de Pellet durante los 6 días.

El consumo de Quaker® durante el período de anticipación y estrés fue menor en los grupos EB y EC. El grupo EA mostró un consumo similar al grupo C2 durante el período de anticipación, sin embargo, durante el período de estrés fue incluso mayor al grupo C2.

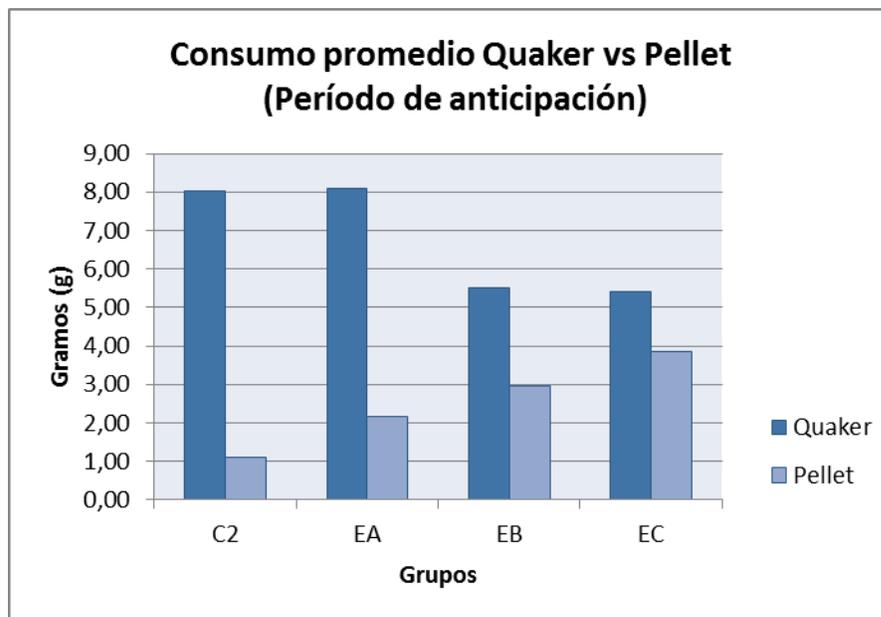


Figura 2. Consumo promedio en 6 días de Quaker® vs Pellet en ratas hembras durante el período de anticipación al estrés crónico intermitente.

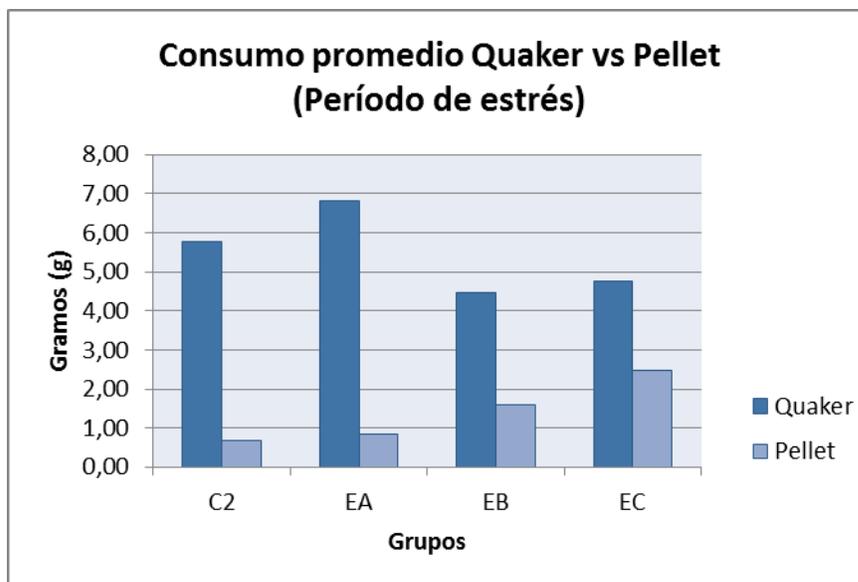


Figura 3. Consumo promedio en 6 días de Quaker® vs Pellet en ratas hembras durante el período de estrés crónico intermitente.

Respecto a la conducta de ingesta durante el período de experimentación, se observó una variación en el consumo total de alimento a través de los días, es decir, los primeros 3 días y los últimos 3 días. La ingesta de alimento tanto del grupo C2 como del grupo EA se mantuvo sin mayores cambios durante toda la fase experimental. Sin embargo, los grupos EB y EC aumentaron el consumo total de alimento durante los últimos 3 días, especialmente el grupo EC (figura 4).

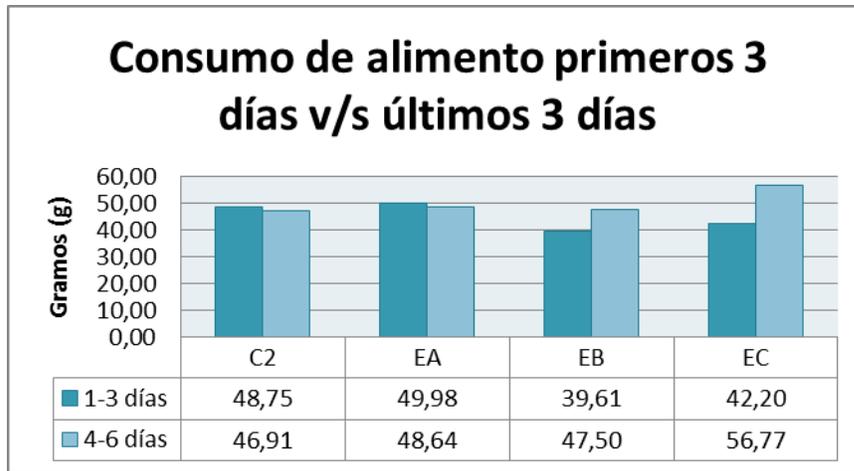


Figura 4. Consumo total de alimento durante los primeros 3 días v/s últimos 3 días en ratas hembras sometidas a estrés crónico intermitente.

2. Morfometría de la Glándula Suprarrenal

Las medidas morfométricas de alto, ancho, grosor, peso y volumen promedio de las GSR de los distintos grupos experimentales, se muestra en la tabla I.

Tabla I. Medidas morfométricas promedio de las glándulas suprarrenales de ratas hembras sometidas a experiencias adversas temprana y tardía y posterior estrés crónico intermitente.

Grupo	C1	C2	EA	EB	EC
Alto (mm)	4,6071	4,6786	4,6671	5,0514	4,6343
DE	0,2611	0,3418	0,3266	0,3777	0,2669
Ancho (mm)	6,1886	6,1300	6,1300	6,2057	5,9914
DE	0,1610	0,2409	0,2909	0,2781	0,2422
Grosor (mm)	3,2457	3,0486	2,7114	3,6300	3,0457
DE	0,1602	0,1139	0,2371	1,7992	0,1591
Peso promedio (g)	0,0513	0,0528	0,0531	0,0494	0,0487
DE	0,0043	0,0075	0,0046	0,0042	0,0049
Volumen promedio (mm³)	0,0350	0,0373	0,0381	0,0389	0,0359
DE	0,0053	0,0068	0,0041	0,0116	0,0051

El peso absoluto de la GSR aumentó en los grupos C2 y EA, comparados con el grupo C1 y EC, sin embargo las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

El volumen de la GSR fue levemente mayor en todos los grupos experimentales, comparado con el C1, sin encontrar diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$).

3. Estereología de la Glándula Suprarrenal

La densidad de número promedio de células en la zona fasciculada fue mayor en el grupo C1 con $7,20 \times 10^5/\text{mm}^3$ (DE 1,32) y menor en el grupo experimental EC, con $5,50 \times 10^5/\text{mm}^3$ (DE 1,22), con un valor de p de 0,001. En la Tabla II se muestra el análisis estadístico de la Nv promedio de células en la zona fasciculada, según grupo en estudio.

Tabla II. Densidad de número promedio de células en la zona fasciculada de glándula suprarrenal de ratas hembras sometidas a experiencias adversas temprana y tardía y posterior estrés crónico intermitente.

Nv	C1	C2	EA	EB	EC
Prom. ($\times 10^5/\text{mm}^3$)	7,20	6,83	6,71	6,86	5,50
D.E. ($\times 10^5/\text{mm}^3$)	1,32	1,22	1,18	1,13	1,22
Míni ($\times 10^5/\text{mm}^3$)	5,76	5,68	5,85	5,82	4,25
Máx ($\times 10^5/\text{mm}^3$)	8,74	8,13	8,13	8,19	7,01
E.E. ($\times 10^5/\text{mm}^3$)	0,59	0,54	0,53	0,51	0,54
C. V. %	18,31	17,78	17,64	16,46	22,11
C. E. %	8,19	7,95	7,89	7,36	9,89

La densidad de volumen promedio de células en la zona fasciculada fue mayor en el grupo experimental C2 con un 10,69% (DE 2,00) y menor en el grupo experimental EC con un 8,34% (DE 2,06), con un valor de p de 0,001. En la Tabla III se muestra el análisis estadístico de la Vv promedio de células en la zona fasciculada, según grupo en estudio.

Tabla III. Densidad de volumen promedio de células en la zona fasciculada de glándula suprarrenal de ratas hembras sometidas a experiencias adversas temprana y tardía y posterior estrés crónico intermitente.

Vv	C1	C2	EA	EB	EC
Promedio %	9,33	10,69	9,77	8,90	8,34
D.E. %	1,60	2,00	2,10	1,56	2,06
Mín. %	7,62	8,70	7,35	7,22	5,98
Máx. %	10,95	13,10	11,96	10,55	10,82
E. E. %	0,72	0,89	0,94	0,70	0,92
C. V. %	17,17	18,69	21,56	17,59	24,72
C. E. %	7,68	8,36	9,64	7,87	11,05

La densidad de superficie promedio de células en la zona fasciculada fue mayor en el grupo experimental C2 con un $71,75 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ (DE 13,83) y menor en el grupo experimental EC con un $52,83 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ (DE 15,00), con un valor de p de 0,001. En la Tabla IV se muestra el análisis estadístico de la Sv promedio de células en la zona fasciculada, según grupo en estudio.

Tabla IV. Densidad de superficie promedio de células en la zona fasciculada de glándula suprarrenal de ratas hembras sometidas a experiencias adversas temprana y tardía y posterior estrés crónico intermitente.

Sv	C1	C2	EA	EB	EC
Prom. (mm2/mm3)	62,60	71,75	65,78	68,44	52,83
D.E. (mm2/mm3)	16,36	13,83	15,43	15,20	15,00
Mín. (mm2/mm3)	45,84	56,25	47,87	50,79	34,67
Máx. (mm2/mm3)	83,17	85,97	82,92	85,71	69,33
E. E. (mm2/mm3)	7,32	6,18	6,90	6,80	6,71
C. V. %	26,15	19,24	23,38	22,13	28,40
C. E. %	11,70	8,60	10,45	9,90	12,70

DISCUSIÓN

Si bien existen variadas investigaciones que abordan la relación existente entre la conducta de ingesta y la situación de estrés, son escasos los estudios que relacionan las experiencias adversas temprana con la conducta de ingesta.

Nuestros resultados sugieren que bajo situaciones de estrés hay un aumento en el consumo total de alimentos en aquellas ratas que tienen precedente de una experiencia adversa temprana (EA) como lo es la alteración del vínculo madre-cría. Sin embargo, cuando la experiencia adversa es tardía (aislamiento social en la adultez) (EB) se observó una disminución en el consumo total de alimentos al ser comparados con el grupo control C2 que sólo fue sometido a estrés crónico intermitente. Por otro lado, tanto en el período de anticipación como en el período de estrés, se encontró un mayor consumo de Quaker® en los grupos experimentales, lo que concuerda con los resultados de Torres – González *et al.* (2010), quienes demostraron que ratas hembras tendrían un mayor consumo de alimento y de agua endulzada comparado con los machos cuando ambos son sometidos a un período de estrés crónico. Además Habhab *et al.* (2009), encontraron que mujeres sometidas a un alto nivel de estrés consumían alimentos más dulces dependiendo del nivel de estrés. Pérez *et al.* (1999), señalaron además que el cambio del alimento estándar a un nuevo alimento favorecería su predilección solo por lo novedoso del sabor, hecho que junto con la situación de estrés favorecería la preferencia por consumir Quaker® en los grupos experimentales.

Las diferencias encontradas en la conducta de ingesta de los distintos grupos experimentales sometidos a una experiencia adversa temprana, una experiencia adversa tardía o ambas (EA, EB y EC, respectivamente), se

relacionan con lo descrito por Bowlby (1988), que sugiere que el desorden conductual puede ser más severo cuando las experiencias socioemocionales traumáticas ocurren en etapas postnatales tempranas. Asimismo, Marti *et al.* (1994), observaron que los cambios en la ingesta de alimentos están estrechamente relacionados con la intensidad del factor estresor. Por otra parte, Pascual *et al.* (2003) señalaron que una experiencia adversa tardía aumentaría la ansiedad.

Al realizar una comparación del consumo total de alimentos del grupo control (C2) y de los grupos experimentales (EA, EB y EC), todos sometidos a estrés crónico intermitente, el grupo experimental sometido a una experiencia adversa tardía como el aislamiento social (EB), presentó el menor consumo total de alimento. Los resultados obtenidos anteriormente, concuerdan con los obtenidos por otros autores que establecen una directa relación entre el aislamiento social y la tendencia hacia la hipofagia, con la consecuente reducción del peso corporal, en conjunto a un alto nivel de ansiedad (Cárdenas-Villalvazo *et al.*, 2010; Bartolomucci *et al.*, 2009). Además, el grupo experimental sometido a una experiencia adversa tardía (EB), mostró una ingesta mayor durante los últimos 3 días de la fase de estrés crónico intermitente.

Podríamos inferir que aquel grupo que presenta una experiencia adversa temprana y tardía debería ser aquel que presente el menor consumo de alimento debido a una mayor intensidad del factor estresor, sin embargo, ocurrió lo contrario, ya que en este grupo experimental (EC) se produjo un consumo de alimento similar al grupo C2, con mayor tendencia al consumo de

Pellet tanto en la fase de anticipación como de estrés, comparado con el grupo control (C2) y los demás grupos experimentales (EA y EB). En adición a lo señalado anteriormente, consumieron más alimento durante los últimos 3 días de estrés crónico, lo cual podría sugerir una menor tolerancia al estrés crónico con un aumento de la ansiedad (Pascual, 2002; Kwak *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2009; Bledsoe *et al.*, 2011) a lo largo del tiempo, que se va reflejando en una mayor ingesta de alimento.

En cuanto a la morfometría de la GSR, la literatura señala que el estrés crónico genera un aumento significativo en el peso de las glándulas suprarrenales de delfines crónicamente estresados, en comparación con los expuestos a estrés agudo (Clark *et al.*, 2006).

Si bien en nuestro trabajo las diferencias en el peso de las GSR no fueron estadísticamente significativas, se encontró un aumento del peso de la glándula en el grupo C2 y EA en comparación al grupo C1, lo cual concuerda con los resultados de Pellegrini *et al.* (1998), quienes señalaron un aumento no significativo en el peso medio de las GSR, en ratas adultas sometidas a estrés crónico intermitente por inmovilización. Así mismo, Ulrich-Lai *et al.* (2006) indicaron un aumento significativo en el peso (absoluto y relativo) de las GSR de ratas sometidas a estrés crónico variable.

Por el contrario, Milosevic *et al.* (2005) identificaron una reducción del 39% del peso absoluto y un 32% del peso relativo de la GSR, en ratas sometidas a estrés crónico por exposición a luz constante. Si bien en los grupos EB y EC se encontró una disminución del peso de las GSR, estas no fueron

suficientemente bajas para ser consideradas significativas, por lo que es de suponer que las diferencias con los autores señalados anteriormente se deben a una mayor intensidad del estrés generado en el modelo de estrés crónico por luz constante.

El estudio estereológico proporciona herramientas eficientes y fiables para la determinación de los parámetros cuantitativos de la estructura de un tejido en estudio. En nuestro trabajo, los principios de la estereología nos permitieron evaluar los cambios en la morfología de la GSR, específicamente en la zona fasciculada, de cada una de las ratas de los grupos experimentales (EA, EB y EC) y controles (C1 y C2).

El grupo control C2, luego de la exposición al estrés crónico intermitente, no mostró un cambio significativo de la N_v de la zona fasciculada al ser comparado con el grupo control C1, lo que está en concordancia con los resultados de Alario *et al.* (1987), quienes sugirieron que el número de células no se ve afectado por estrés crónico. Por otra parte, Yvonne *et al.* (2006), señalaron que la exposición a estrés crónico variable genera la aparición de hiperplasia en la parte externa e hipertrofia en la parte interna de la zona fasciculada de la GSR. Empero, es difícil establecer una comparación entre nuestros resultados y los hallazgos de Yvonne *et al.* (2006), debido a que no cuantificamos separadamente las partes interna y externa de la zona fasciculada, pues se observaron 5 campos al azar de la zona en estudio como ha sido señalado por Mandarim-de-Lacerda, 2003. En el grupo control C2, se también se observó un aumento de la V_v y S_v de la zona fasciculada al

compararlo con el grupo control C1 que no fue sometido a estrés crónico intermitente. Estos últimos hallazgos concuerdan con los resultados expuestos por Milosevic *et al.* (2005), quienes encontraron un aumento en el volumen celular de la zona fasciculada de ratas expuestas a estrés crónico por exposición a luz constante. Por lo anterior, creemos que estos cambios se deben a la alta demanda en la síntesis y secreción de corticosterona liberada en respuesta al sometimiento de estrés crónico como ya fue señalado por Yvonne *et al.* (2006).

Todos los parámetros estereológicos del grupo EA fueron menores a los observados en el grupo control C2, aunque no fueron significativamente distintos. Sin embargo, estos resultados podrían sugerir que la experiencia adversa temprana por ruptura del vínculo social madre-cría, puede generar consecuencia en la actividad normal de la GSR durante el estrés crónico intermitente en la adultez.

El grupo sometido a una experiencia adversa tardía (EB) presentó un perfil similar al grupo control C2 en cuanto al Nv y el Sv, sin embargo, disminuyó el Vv, hecho que estaría relacionado con lo mencionado por Koko *et al.* (2004), quienes indicaron una disminución del volumen de las células de la zona fasciculada como consecuencia de estrés agudo por calor.

Por otro lado el grupo experimental EC, sufrió grandes cambios estereológicos en la zona fasciculada de las GSR. La Nv, Vv y Sv resultaron disminuidas con respecto al grupo control C2 e inclusive con el grupo control

C1, que no fue sometido a estrés ($p < 0,001$). A partir de lo anterior, podemos suponer que estos cambios en los parámetros estereológicos estarían generando una menor producción de corticosterona, lo cual se contrapone con los resultados obtenidos por Aguilera *et al.* (1996) quienes observaron un aumento de glucocorticoides y disminución en el aclaramiento plasmático de esta hormona con incremento de los receptores de ACTH en la GSR de ratas a consecuencia de un aumento en la esteroidogénesis durante el estrés crónico por inmovilización. Sin embargo, King & Edwards (1999), encontraron altos niveles de ACTH, pero no de corticosterona en ratas alejadas de sus madres a los 21 días y posteriormente sometidas a estrés crónico durante la edad adulta, lo cual respaldaría los cambios estereológicos encontrados en nuestro estudio.

A la luz de los resultados, es posible inferir que el estrés crónico provoca cambios morfológicos en la GSR de ratas hembras, reflejados en un mayor porcentaje de tejido glandular en la zona fascicular y mayor superficie de estas células en ésta zona. Estos hallazgos, estarían indicando una hipertrófia glandular en la zona fascicular de la GSR para aquellas ratas expuestas a estrés crónico que han sido criadas en condiciones estandarizadas, es decir sin experiencias adversas.

Por otra parte, observamos que tanto el grupo EA, EB y en especial al grupo más vulnerable (EC) presentaron menor porcentaje de tejido glandular y superficie celular en la zona fascicular de la GSR, en consecuencia menor actividad glandular, lo que concuerda con una desensibilización al estímulo de la ACTH, asociado a una baja producción de corticosterona (King & Edwards,

1999), impidiendo sobrellevar de buena manera el periodo de estrés crónico, lo que junto con el aumento de la ansiedad provocaría en las ratas más vulnerables una mayor susceptibilidad a presentar un trastorno alimenticio.

En conclusión, las experiencias adversas temprana y/o tardía a la que fueron expuestos los individuos de los grupos experimentales, juegan un rol importante respecto a los cambios morfológicos y estereológicos provocados en la GSR de ratas sometidas a estrés crónico en la vida adulta.

CONCLUSIONES

1. La experiencia adversa temprana, aumenta el consumo total de alimento y preferencia por el alimento más palatable, durante el periodo de estrés crónico en la vida adulta, pudiendo generar consecuencia en la actividad normal de la glándula suprarrenal durante el estrés crónico intermitente en la adultez.
2. La experiencia adversa tardía, se asocia a una disminución en el consumo total de alimento, con un periodo de mayor ingesta en los últimos 3 días del periodo de estrés crónico en la vida adulta.
3. La experiencia adversa temprana-tardía, durante el estrés crónico genera un aumento en el consumo de alimento durante los últimos 3 días, presentando los mayores cambios estereológicos reflejados en la disminución de la Nv, Vv, y Sv.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adzic, M.; Djordjevic, J.; Djordjevic, A.; Niciforovic, A.; Demonacos, C.; Radojic, M. & Krstic-Demonacos, M. Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J. Endocrinol.*, 202:87-9, 2009.

Aguilera, G.; Kiss, A.; Lu, A. & Camacho, C. Regulation of adrenal steroidogenesis during chronic stress. *Endocr. Res.*, 22(4), 433-43, 1996.

Aherne, W. & Dunnill, M. *Morphometry*, London: Edward Arnold. London, 1982.

Alario, P.; Gamallo, A.; Beato, M. J & Trancho, G. Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. *Physiol. Behav.*, 40: 29-32, 1987.

Bartolomucci, A.; Cabassi, A.; Govoni, P.; Ceresini, G.; Cero, C.; Berra, D.; Dadomo, H.; Franceschini, P.; Dell'Omo, G.; Parmigiani, S. & Palanza, P. Metabolic consequences and vulnerability to Diet-Induced obesity in male mice under chronic social stress. *Plos One*, 4(1):4331, 2009.

Bledsoe, A.; Oliver, K., Scholl, J & Forsten, G. Anxiety states induced by post-weaning social isolation are mediated by CRF receptors in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull.*, 85(3-4):117-22, 2011.

Bowlby, J. *A secure base: Clinical applications of attachment theory*. Routledge, Londres, 1988.

Cárdenas–Villalvazo, A.; López-Espinoza, A.; Martínez, A.; Franco, K.; Díaz, F.; Aguilera, V. & Valdez, E. Consumo de alimento, crecimiento y ansiedad, tras estrés por hacinamiento o aislamiento de ratas. *Rev. Mex. Anal. Conducta*, 36(2):129-42, 2010.

Chrousos, G. P. Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 5:374–81, 2009.

Chrousos, G.P. & Kino, T. Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders. *Stress*, 10(2):213-9, 2007.

Clark, L.; Cowan, D. & Pfeiffer, D. Morphological Changes in the Atlantic Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Adrenal Gland Associated with Chronic Stress. *J. Comp. Path.*, 135:208-16, 2006.

Díaz F. & Bruner C. A. Comer y beber en ratas con libre acceso a la comida y al agua. *Acta Comport.*, 15(2):111-30, 2007.

Díaz, F.; López-Espinoza, A.; Franco, K.; Martínez, A.; Aguilera, V. & Cárdenas, A. Efectos del periodo de privación de alimento sobre la tasa de comer en ratas. *Rev. Mex. Anal. Conducta*, 35:149-60, 2009.

Galindo A. & López-Espinoza A. Efectos del sabor y del contenido calórico del agua sobre la conducta alimentaria durante un período de privación de comida en ratas albinas. *Rev. Mex. Anal. Conducta*, 32(2):95-109, 2006.

Goldstein, D. & Kopin, I. Evolution of concepts of stress. *Stress*, 10(2):109-20, 2007.

Habhab, S.; Sheldon, J. & Loeb, R. The relationship between stress, dietary restraint, and food preferences in women. *Appetite*, 52: 437-44, 2009.

Herman J.P, Prewitt C.M & Cullinan W.E. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical stress axis. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 10 (3-4):371-94, 1996.

Katz, R. J. & Roth K. Tail Pinch Induced Stress-Arousal Facilitates Brain Stimulation Reward. *Physiol. Behav.*, 22:193-4, 1979.

King, J. A. & Edwards, E. Early stress and genetic influences on hypotallamic-Pituitary-Adrenal axis functioning in adulthood. *Horm. Behav.*, 36: 79-85, 1999.

Koko, v.; Djordjeviæ, J.; Cvijijæ, G. & Davidoviæ, V. Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study. *J. Exp. Biol.*, 207: 4225-30, 2004.

Kwak, H.; Lee, J.; Kwon, K.; Kang, C.; Cheong, I.; Chun, W.; Kim, S. & Lee, H.

Maternal Social Separation of Adolescent Rats Induces Hyperactivity and Anxiolytic Behavior. *Korean J Physiol Pharmacol*, 3:79-83, 2009.

Lopéz-Espinoza A. & Martínez H. Efectos de dos programas de privación parcial

sobre el peso corporal y el consumo total de agua y comida en ratas. *Acta Comport.*, 9(1):5-17, 2001.

Magariños, A.; McEwen, B.; Flügge, G. & Fuchs E. Chronic Psychosocial Stress

Causes Apical Dendritic Atrophy of Hippocampal CA3 Pyramidal Neurons in Subordinate Tree Shrews. *J. Neurosci.*, 76(10):3534-40, 1996.

Mandarim-de-Lacerda, C. A. Stereological tools in biomedical research. *An.*

Acad. Bras. Cienc., 75(4):469-86, 2003.

Marti, O.; Marti, J. & Armario, O. Effects of chronic stress on food intake in rats:

influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol. Behav.*, 55(4):747-53, 1994.

Milošević, V.; Trifunovic, S.; Sekulic, M.; Šošic-Jurjevic, B.; Filipovic, B.; Negic,

N.; Nestorovic, N.; Manojlovic Stojanoski M. & Starčević, V. *Gen. Physiol. Biophys.*, 24:299-309, 2005.

Moreno, L., Lamprea, M. & Duenas, Z. Diferencias en los comportamientos asociados a la ansiedad de ratas macho y hembra expuestas a un protocolo de estrés crónico por separación maternal temprana. *Suma Psicol.*, 16(1):31-43, 2009.

Nadal, R. & Armario A. Mecanismos de susceptibilidad al estrés. *Hipertens Riesgo Vasc.*, 27(3):117-24, 2010.

Ojea, M.; Fustiñana, C.; Argibay, P. Efectos del destete temprano sobre el comportamiento adulto en un modelo animal. *Arch. Argent. Pediatr.*, 108(4):350-3, 2010.

Osorio, J.; Weisstaub, G. & Castillo, C. Desarrollo de la conducta alimentaria en la infancia y sus alteraciones. *Rev. Chil. Nutr.*, 29(3):0717-7518, 2002.

Pascual, R. La interrupción temprana del vínculo social altera la organización citoarquitectónica y expresión de neuropéptidos en la corteza prefrontal. *Rev. Chil. Neuro-psiquiatr.*, 40(2):9-20, 2002.

Pascual, R.; Catalán, M. & Fuentealba, M. Rasgos de ansiedad y alteraciones neuronales en la corteza prefrontal medial, ocasionadas por experiencias adversas tempranas. *Rev Chil Neuro-psiquiatr.*, 41(3): 201-11, 2003.

Pellegrini, A; Grieco, M.; Materazzi, G.; Gesi, M. & m. Ricciardi, P. Stress-induced morphohistochemical and functional changes in rat adrenal cortex, testis and major salivary glands. *Histochem J.*, 30 (10):695-701, 1998.

Penney, D. P. & Brown, G. M. The fine structural morphology of adrenal cortices of normal and stressed squirrel monkeys. *J. Morph.*, 134:447-66, 2005.

Pérez, C., Fanizza, L. & Sclafani, A. Flavor preferences conditioned by intragastric nutrient infusions in rats fed chow or a cafeteria diet. *Appetite*, 32:155-70, 1999.

Pérez–Olvera, O.; Arellano, S. & Rodríguez, H. Revisión de los métodos estereológicos y su aplicación en biología celular. *Patología*, 50(2):63–71, 2012.

Petrovic–Kosanovic, D.; Velickovic , K.; Koko, V.; Jasnica, N.; Cvijic, G. & Milosevic, M. Effect of acute heat stress on rat adrenal cortex—a morphological and structural study. *Cent. Eur. J. Biol.*, 7(4): 611-9, 2012.

Prophet, E.; Mills, B.; Arrington, J.; Sobin L. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Washington D. C. Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP), 1995.

Ruetti E., Justel N., Mustaca A. Estrés neonatal y frustración. *Rev. Latinoam. Psicol.*, 42(2):279-88, 2010.

Santacoloma, A. & Quiroga, L. Perspectivas de estudio de la conducta alimentaria. *Rev. Iberoam. Psicol. Cienc. Tecnol.*, 2(2):7-15, 2009.

Saucedo–Molina, T. & Gómez, G. Modelo predictivo de dieta restringida en púberes mexicanas. *Rev. Psiquiatría Fac. Med. Barna.*, 31(2):69-74, 2004.

Scherle, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*, 26:57-63, 1970.

Torres–González, C.; López-Espinoza, A.; Martínez, A.; Franco, K.; Díaz, F.; Sosa, G. A.; Aguilera, V.; Magaña, C. R. & Cárdenas, A. Consumo de alimentos y endulzantes bajo condiciones de estrés crónico en ratas. *Rev. Mex. Anal. Conducta*, 35:13-147, 2009.

Toth, E.; Avital, A.; Leshem, M.; Richter-Levin, G. & Braun, K. Neonatal and juvenile stress induces changes in adult social behavior without affecting cognitive function. *Behav. Brain Res.*, 190:135-9, 2008.

Ulrich–Lai, I.; Figueiredo, H.; Ostrander, M.; Choi, D.; Engeland, W. & Herman, J. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a

subregion-specific manner. *Am J Physiol. Endocrinol. Metab.*, 291:965-73, 2006.

Weibel, E. R. *Stereological Methods. vol 1. Practical Methods for Biological Morphometry*, Academic Press, London, 1979.

Ziegler, D. R. & Herman, J. P. Neurocircuitry of stress integration: anatomical pathways regulating the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat. *Integ. and comp. Biol.*, 42:541-51, 2002.