



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

“Establecimiento de un modelo de estrés crónico en roedor. Variaciones
conductuales y endocrinas”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JOEL GUTIÉRREZ ORTÍZ

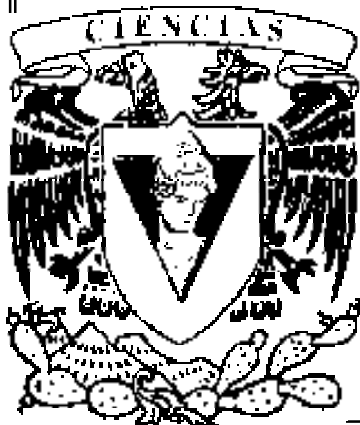
Directora de tesis:

Dra. Lucia Alba Martínez Mota

Co-tutor:

Dr. Lenin Pavón Romero

2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Gutiérrez
Ortiz
Joel
56832437
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
093231129

2. Datos del tutor

Dra.
Lucia Alba
Martínez
Mota

3. Datos del co-tutor

Dr.
Lenin
Pavón
Romero

4. Datos del sinodal 1

Dra.
Marcela Margarita
Morales
Mulia

5. Datos del sinodal 2

Dra.
Carolina
López
Rubalcava

6. Datos del sinodal 3

Dra.
Erika Monserrat
Estrada
Camarena

7. Datos del trabajo escrito

Establecimiento de un modelo de estrés crónico en roedor. Variaciones conductuales y endocrinas.
60 p.
2009

Agradecimientos:

En primer lugar quiero agradecerle a la Dra. Lucia Martínez Mota por todo el tiempo de dedicación para corregir y mejorar la tesis, y por todo lo que aprendí de su parte, además de ser una buena persona, abierta a los comentarios y por el tiempo que duro la realización de la tesis siempre tuvo disposición para aclarar mis dudas.

También quiero agradecerle a los miembros del jurado. Al Dr. Lenin Pavón Romero, a la Dra. Marcela Morales Mulia, a la Dra. Carolina López Rubalcava y a la Dra. Erika Estrada Camarena, por el tiempo que dedicaron a la revisión de la tesis y cuyas sugerencias la mejoraron considerablemente.

Hubo mucha gente que el transcurso de la realización de la tesis, a quienes agradezco su ayuda, ya que sin ella la realización de toda la parte experimental hubiera sido más complicada. Agradezco a la Dra. María Eugenia Hernández por que dedico mucho de su tiempo a enseñarme todos los procedimientos experimentales. Al Biol. Luis Enrique Villanueva, por la realización de toda la parte histológica. A la Q.F.B. Ivonne Granados Camacho y al Tec. Sergio Márquez por su ayuda en la parte experimental.

Especialmente agradezco por su infinita paciencia y comprensión a mi mamá Ana y mi papá Ricardo, que siempre me han apoyado y que este trabajo esta dedicado a ustedes dos. Gracias.

Hay una persona que desde que la conozco ha sido parte importante, que con su alegría, buen humor y sus cualidades bailables, me ha hecho pasar momentos muy divertidos. A pesar de las circunstancias siempre está conmigo, se alegra por mi y me apoya. Gracias Gema.

INDICE

Resumen	1
Índice de abreviaturas.....	2
Capítulo I. Estrés	
Definición de estrés	3
Sistema de estrés	3
Capítulo II. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)	
Eje HHA	5
Componentes del eje HHA	6
Receptores a glucocorticoides	8
Mecanismo de activación de eje HHA	8
Capítulo III. Estrés y patologías	
Estrés y el sistema reproductivo	10
Estrés y crecimiento	10
Estrés y tracto intestinal	11
Enfermedades asociadas a la desregulación del eje HHA	11
Respuesta inmunológica al estrés	12
Psicopatologías	14
Capítulo IV. Depresión	
Definición de depresión	16
Hipótesis de citocinas	17
Hipótesis neurotrófica	17
Capítulo V. Modelos animales	
Modelos animales	20
Modelo de estrés por inmovilización	21
Ratas Wistar-Kyoto	22
Capítulo VI. Prueba de campo abierto	25
Justificación	27
Hipótesis	28
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
Material y métodos	29

Animales	29
Diseño experimental	29
Tratamiento	30
Estrés por restricción de movimiento	30
Prueba de campo abierto	31
Procedimiento quirúrgico	31
Determinación de corticosterona sérica	32
Análisis histológico	32
Análisis estadístico	33
Resultados	34
Discusión	42
Conclusión	51
Bibliografía	52
Apéndices	57

RESUMEN

La depresión es un trastorno afectivo que se caracteriza por ideas de suicidio, anhedonia (incapacidad para sentir placer), tristeza intensa, entre otros, e interfiere con el funcionamiento físico y social de los que la padecen. Esta enfermedad afecta de un 8-12% de la población mundial. Se sabe que el estrés crónico es uno de los factores asociados a la depresión en individuos susceptibles. Para la investigación de las bases neurológicas de la depresión, así como el desarrollo de nuevos fármacos para su tratamiento, la utilización de modelos animales son una herramienta importante. La cepa de ratas Wistar-Kyoto es hiperreactiva al estrés y es considerada como un modelo de depresión endógena, debido a que presenta diversas características similares a las presentadas por los pacientes. El objetivo de este estudio es determinar si la aplicación crónica de estresores promueven alteraciones a nivel conductual, endocrino e inmunológico. En este estudio se aplicó, a ratas de la cepa WKY, dos estresores de forma crónica, de forma independiente o en conjunto: restricción de movimiento y una solución de hidrocortisona (2%), para inducir las alteraciones del eje HHA, y caracterizar los cambios en parámetros de actividad endocrina (grosor de la corteza adrenal y producción de corticosterona sérica), inmunológica (formación de folículos secundarios en el bazo) y conductuales (actividad locomotora y exploratoria) a través del curso temporal de 42 días. Se encontró que la aplicación de ambos tratamientos por separado produjo variaciones en el peso de las glándulas adrenales, modificación de la estructura en los folículos secundarios del bazo y una reducción de la actividad locomotora al día 21 de tratamiento. Los estímulos estresantes aplicados de manera conjunta fueron más efectivos para mantener desregulado el eje HHA: se observó con una hiperplasia adrenal hasta el día 14 de tratamiento, continuando con una hipertrofia de las glándulas. Este cambio fue acompañado por la disminución significativa del peso de las adrenales, del grosor de la corteza adrenal, y por abatimiento de la actividad ambulatoria/exploratoria. Como en los grupos anteriores, estos cambios están asociados a la presencia de alteraciones en los folículos secundarios del bazo. Se concluye que la aplicación del estrés crónico, de alta intensidad así como el consumo de una solución de hidrocortisona, produce en una cepa sensible al estrés, cambios endocrinos, inmunológicos y conductuales que son similares a los que experimentan los pacientes deprimidos.

Índice de abreviaturas

HHA.- hipotálamo-hipófisis-adrenal

ACTH*.- hormona adrenocorticotrópica

SNC.- sistema nervioso central

CRH*.- hormona liberadora de corticotropina

PVN*.- núcleo paraventricular

POMC.- proopiomelanocortina

DA.- dopamina

5-HT.- 5-hidroxitriptamina

OFT*.- prueba de campo abierto

LC.- locus coeruleus

CSF*.- fluido cerebroespinal

NA.- noradrenalina

SNS.- sistema nervioso simpático

GR*.- receptor a glucocorticoides

MR*.- receptor a mineralocorticoides

GC.- glucocorticoides

MC.- mineralocorticoides

IL.- interleucina

TNF*.- factor de necrosis tumoral

BDNF*.- factor neurotrófico derivado del cerebro

RM.- restricción de movimiento

HC.- hidrocortisona

AVP.- arginina-vasopresina

Wi.- Wistar

S-D.- Sprague-Dawley

FST*.- prueba de nado forzado

*** Por sus siglas en inglés.**

CAPÍTULO I.

Definición de estrés

La estabilidad del ambiente interno de los organismos vivos es resultado de un complejo equilibrio, el cual es constantemente demandado por fuerzas intrínsecas o extrínsecas, estímulos físicos o fisiológicos, que son conocidos como estresores. La tendencia dirigida a la estabilidad es la homeostasis, por lo que el estrés es la respuesta del organismo ante una amenaza, para lo cual reacciona con una serie de respuestas adaptativas tanto conductuales como fisiológicas para preservar su equilibrio interno (Chrousos, 2007; Tafet y Bernardini, 2003; Pacák y Palkovist, 2001).

Se han desarrollado diversos puntos de vista sobre cómo definir el estrés. Wiener (1991) describió a los estresores como presiones selectivas del ambiente fisiológico y social que amenazan o retan a un organismo. Chrousos y Gold (1992) definieron al estrés como un estado de falta de armonía o de amenaza a la homeostasis, que evoca respuestas adaptativas tanto fisiológicas como conductuales. Goldstein (1995) definió al estrés como “una condición donde las expectativas, dependiendo si están genéticamente programadas, establecidas por aprendizaje o deducidas por las circunstancias, no coinciden con las percepciones anticipadas o actuales del ambiente interno o externo (citado en Pacák y Palkovist, 2001).

Sistema de estrés

Los componentes centrales del sistema de estrés se encuentran localizados, entre otras estructuras, en el hipotálamo y en el tallo cerebral, así como en el locus coeruleus (LC) y otros grupos celulares principalmente noradrenérgicos de la médula y el puente; este sistema incluye neuronas productoras de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP) del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y neuronas CRHérgicas del núcleo paragigantocelular y parabranchial de la médula (Chrousos, 2007).

La respuesta de estrés es activada por el *sistema de estrés* localizado tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el periférico. El SNC recibe e integra una gran diversidad de señales neurosensoriales y sanguíneas. La activación del sistema de estrés conlleva cambios conductuales y físicos, lo que en conjunto se conoce como adaptación general o síndrome de estrés. Las adaptaciones conductuales incluyen incremento en el estado de alerta y la vigilancia, daño en los procesos cognitivos, así como euforia y disforia. Las

adaptaciones físicas están enfocadas principalmente para re-direccionar los procesos energéticos, por ejemplo, los nutrientes y el oxígeno son dirigidos principalmente hacia el SNC y los sitios del cuerpo sometidos a estrés, donde son más necesarios (Chrousos, 2007).

La respuesta adaptativa que se presenta ante un estresor agudo incluye procesos fisiológicos y conductuales, los cuales son esenciales para reestablecer el balance homeostático. Durante la respuesta al estrés agudo, los procesos fisiológicos son importantes para redirigir la utilización energética entre varios órganos e inhibir o estimular selectivamente varios sistemas de órganos o sus componentes, para movilizar las reservas de energía y estar preparado para la exposición a amenazas adicionales e impredecibles. El incremento en el aporte de energía hacia órganos cruciales es realizado principalmente por liberación de catecolaminas y glucocorticoides, los cuales incrementan la gluconeogénesis (ruta metabólica anabólica que permite la síntesis de glucosa a partir de compuestos no glucídicos [carbohidratos] como aminoácidos, lactato, piruvato y glicerol) y la glucogenólisis (degradación metabólica del glucógeno [polisacárido de reserva energética de los animales] a glucosa cuando el organismo necesita energía), inhiben la captura de glucosa, y potencian la proteólisis y lipólisis. El sistema inmune es otro componente esencial de esas respuestas fisiológicas adaptativas de respuesta al estrés (ver capítulo II) (Pacák y Palkovist, 2001). La respuesta fisiológica al estrés que promueve la supervivencia en el contexto de una situación de amenaza, es adaptativa a corto plazo. Sin embargo, si la recuperación de ese evento agudo no se acompaña por una respuesta homeostática adecuada para finalizar la respuesta adaptativa aguda de los mediadores de estrés, aparecen efectos deletéreos en la función psicológica y fisiológica (Charney, 2004).

Cuando el estrés se presenta en forma crónica, se llega a sobrepasar el umbral de resistencia del organismo lo que puede provocar los estados patológicos conocidos como enfermedades de adaptación. El estrés crónico puede darse ya sea por una exposición prolongada y continua a factores estresantes externos o por condiciones prolongadas de la respuesta al estrés (como en sujetos que padecen depresión o síndrome de estrés postraumático). Sujetos con estas patologías se ven expuestos prolongadamente a las llamadas hormonas del estrés, tales como catecolaminas, adrenalina y noradrenalina (NA) liberadas por el sistema nervioso simpático y los glucocorticoides (Ulrich-Lai y cols., 2006).

CAPÍTULO II.

Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA, ver fig. 1) es el eje neuroendocrino de estrés en animales y en el hombre. Su activación se presenta seguida de un estímulo estresante. A corto plazo, el eje HHA actúa para mantener el equilibrio interno después de demandas ambientales que amenazan la homeostasis. Cuando se presenta un estímulo estresante la corteza adrenal libera glucocorticoides; los niveles elevados de los glucocorticoides inhiben subsecuentemente al eje actuando a través de la activación de sus receptores ubicados en la adenohipófisis, el hipotálamo y el hipocampo, limitando así la respuesta neuroendocrina al estrés. Sin embargo, la activación crónica del eje HHA por el estrés puede llevar a su desregulación en poblaciones de individuos susceptibles, que se acompaña por la manifestación de patologías (Suzuki y cols., 2001).

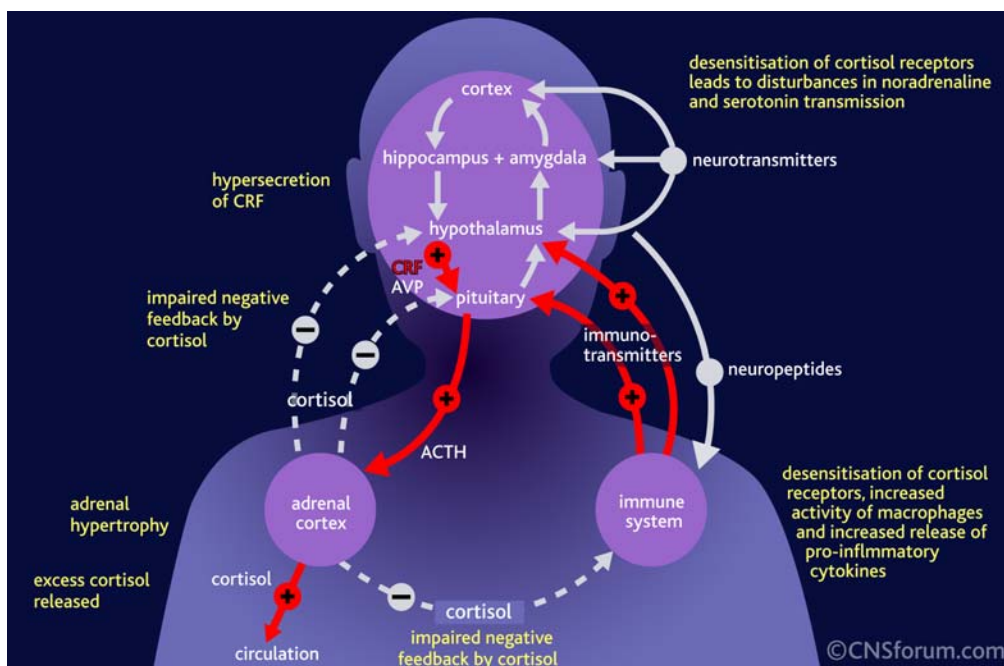


Fig 1. Representación simplificada de los componentes centrales y periféricos del eje HHA, sus interrelaciones funcionales y sus relaciones con otros sistemas involucrados en la respuesta al estrés (figura tomada de www.cnsforum.com).

Componentes del eje HHA:

El hipotálamo es una glándula que forma parte del diencefalo, y se sitúa por debajo del tálamo, y sus límites están constituidos por: superior.- el piso del tercer ventrículo; anterior.- por el quiasma óptico; posterior.- por la línea imaginaria entre los cuerpos mamilares y la comisura posterior del cerebro. El hipotálamo regula funciones como el apetito, la saciedad, el nivel de glucosa, los ácidos grasos en la sangre, la temperatura y el ciclo de sueño-vigilia (ritmo circadiano). El hipotálamo está formado por varios núcleos, entre ellos, el PVN, que sintetiza y libera CRH desde las terminales neurosecretoras de neuronas de este núcleo hacia el plexo capilar primario del sistema porta-hipotálamo-hipofisial (PHH). El sistema PHH lleva la CRH al lóbulo anterior de la hipófisis, donde regula la transcripción del gen de pro-opiomelanocortina (POMC), un precursor común del ACTH.

La hipófisis o pituitaria, es una glándula que se aloja en un espacio óseo llamado silla turca del hueso esfenoides, situada en la base del cráneo, en la fosa media cerebral, que se conecta con el hipotálamo a través del tallo hipofisiario. Consta del lóbulo anterior o adenohipófisis que se compone de la *pars distalis*, *pars tuberalis* y *pars intermedia*, y del lóbulo posterior o neurohipófisis llamado también *pars nervosa*. La adenohipófisis secreta diversas hormonas entre las que se encuentra la ACTH que es un polipéptido de 39 a.a. La ACTH es sintetizada en las células basófilas de la adenohipófisis por estimulación de CRH, a partir de un precursor llamado POMC. Ante la presencia de un estímulo estresante, ya sea físico o psicológico, la secreción de CRH por neuronas del PVN del hipotálamo regula el gen de POMC, lo que conduce a la síntesis y secreción de ACTH que, a su vez, estimula la liberación de glucocorticoides por parte de la corteza adrenal (zona fascicular), y de andrógenos, como la dehidroepiandrosterona (DHEA) (zona reticular).

Las glándulas adrenales son glándulas endocrinas cuya función es regular las respuestas al estrés, a través de la síntesis de glucocorticoides (cortisol en primates y corticosterona en roedores) y catecolaminas, y la regulación de electrolitos. Anatómicamente las glándulas adrenales están situadas en la cara anterosuperior de los riñones y están irrigadas por la sangre que reciben de las arterias suprarrenales (superiores, medias e inferiores); las glándulas están formadas por diferentes estructuras: la médula adrenal y la corteza adrenal, ambas inervadas por el sistema nervioso autónomo (fig. 2).

La médula adrenal se localiza en el centro de la glándula y está rodeada de la corteza adrenal. Es el lugar principal de conversión de las catecolaminas adrenalina y noradrenalina a partir del aminoácido tirosina. Las células de la médula adrenal son conocidas como células cromafines (Randall y cols., 2002).

La corteza adrenal está situada rodeando la circunferencia de la glándula adrenal. Su función es la de regular varios componentes del metabolismo mediante la producción de mineralocorticoides y glucocorticoides. La corteza adrenal se dispone en tres capas diferentes de tejido basado en los tipos celulares y la función que realizan: a) zona glomerular: segrega mineralocorticoides, como la aldosterona y la desoxicorticosterona, en respuesta a un aumento en los niveles de potasio o descenso de flujo de sangre en los riñones; b) zona fascicular: es la capa predominante en la corteza adrenal, sus células segrega glucocorticoides, como el cortisol; c) zona reticular: es la más interna de las capas y sus células segrega esteroides sexuales como los andrógenos (testosterona, DHEA y andostendiona) y estrógenos (Randall y cols., 2002).

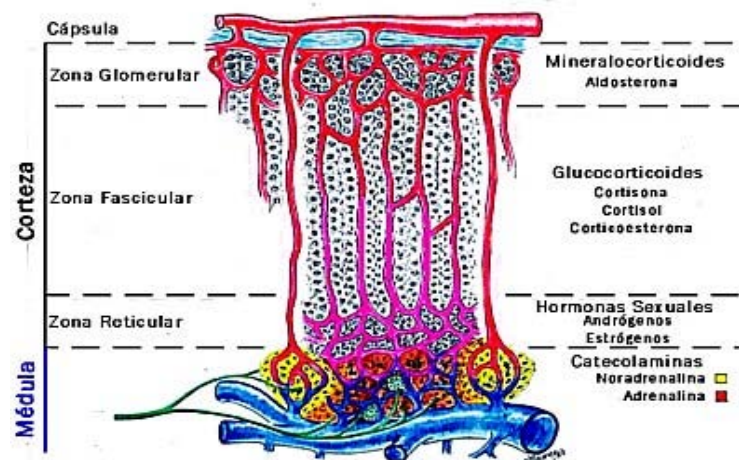


Fig 2. Representación esquemática de la disposición de las capas que conforman la corteza y la médula adrenal, y las sustancias liberadas por cada una de ellas.

Receptores a glucocorticoides (GRs)

Las hormonas esteroideas (ejem. glucocorticoides, estrógenos, testosterona y mineralocorticoides) son pequeños ligandos, liposolubles que difunden a través de las membranas celulares y se unen a receptores intracelulares, ubicados en el citoplasma. En respuesta a la unión del ligando, los receptores a hormonas esteroides se translocan hacia el núcleo, donde regulan la expresión de ciertos genes por unión a elementos de respuesta de hormonas específicas (HREs) en sus regiones regulatorias. Los receptores a corticosteroides se clasifican en dos tipos: los receptores a mineralocorticoides (MR) (receptores tipo I) y los receptores a glucocorticoides (GR) (receptores tipo II). Los MR se encuentran ampliamente distribuidos en algunas zonas límbicas, como el hipocampo -que es especialmente importante para la memoria declarativa y espacial-, el septum lateral, la amígdala media y los núcleos motores del tallo cerebral. Por su parte, los GR se encuentran en diversas áreas cerebrales como el hipocampo, la amígdala -que es una estructura crítica para la memoria emocional- y la corteza prefrontal -que está involucrada en el procesamiento de la memoria-. Los mineralocorticoides, como la aldosterona, se unen a los MR, pero los glucocorticoides se unen a ambos subtipos de receptores, MR y GR. Bajo condiciones normales, los MR se encuentran considerablemente ocupados, en contraste con los GR; los MR, por lo tanto, controlan la actividad basal del eje HHA. Cuando los niveles de cortisol aumentan, los GR van siendo ocupados gradualmente, esto proporciona una señal para la reducción de la actividad del eje HHA. Los MR se activan a bajas concentraciones de cortisol y los GR a altas concentraciones lo que propicia que el cerebro responda de manera adecuada a estos cambios en la concentración (van Prag, 2004; Bao y cols., 2007; Juruena y cols., 2004; Joels y cols., 2004).

La actividad de los GR es necesaria para la regulación de la retroalimentación negativa del eje HHA (respuesta al estrés, pico circadiano), pero los MR también juegan un papel importante modulando la regulación dependiente de GR (Juruena y cols., 2004).

Mecanismo de activación del eje HHA

Cuando una situación es percibida como estresante, el cerebro activa diversos circuitos neuronales para adaptarse a la demanda. Dos neuropéptidos, la CRH y la vasopresina (VP), son esenciales para la coordinación de las respuestas conductuales y metabólicas al estrés. El eje HHA recibe e integra varias entradas indicativas de estrés, que convergen en el PVN del hipotálamo. Neuronas del PVN sintetizan CRH que es liberado al sistema portal hipofisario de la adenohipófisis. Entonces, la CRH regula la transcripción del gen de POMC, un precursor común de la ACTH y estimula la liberación de ésta hacia el torrente sanguíneo. Otros péptidos, como es la AVP, son también liberados para reforzar el efecto de la CRH. Así, la ACTH estimula la biosíntesis y liberación de glucocorticoides, particularmente cortisol, por células de la corteza adrenal (Tafet y Bernandini, 2003; de Kloet y cols., 2005).

Se conoce que el estrés repetido altera los mecanismos básicos para el mantenimiento de la homeostasis del eje HHA y se sugiere que la CRH se encuentra involucrada en las respuestas adaptativas hacia el estímulo estresante. Este neuropéptido es crucial en la regulación del eje HHA, es la vía final de respuesta al estrés (Swaab y cols., 2005).

CAPÍTULO III.

Estrés y patologías

Estrés y el sistema reproductivo

El estrés inhibe el sistema reproductivo en varios niveles: primero la CRH previene la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual estimula la liberación de una serie de hormonas que tendrán efecto sobre la conducta reproductiva y sexual. De forma similar, los glucocorticoides inhiben la liberación de GnRH, la ovulación y la liberación de esperma inducida por la hormona luteinizante (LH). Los glucocorticoides inhiben directamente la función de los testículos y los ovarios, obstaculizando la liberación de hormonas masculinas y femeninas, como testosterona, estrógenos y progesterona (Chrousos y cols., 1998).

El estrés provoca la disminución del deseo sexual y la incapacidad de obtener el orgasmo en las mujeres; además, puede causar impotencia temporal en los hombres. Parte de la respuesta al estrés involucra la liberación de sustancias las cuales oprimen los músculos lisos del pene y sus arterias. Esta constricción reduce el flujo sanguíneo e incrementa el flujo sanguíneo fuera del pene, lo cual puede impedir la erección (Bao y cols., 2007; Chrousos y cols., 1998).

Por otro lado, el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) también influye en el funcionamiento de las hormonas del estrés. Los estrógenos estimulan el eje HHA a través de la interacción con los receptores a estrógenos (ERs) vía elementos específicos de respuesta a estrógenos (EREs) en la región promotora del gen de CRH. Esto puede explicar por que las mujeres tienen niveles ligeramente elevados de cortisol, y por son más vulnerables a la depresión, a la anorexia nerviosa, a los desórdenes de pánico, al desorden obsesivo compulsivo y a las enfermedades autoinmunes, como el lupus y la artritis reumatoide (Swaab y cols., 2005).

Estrés y crecimiento

El eje HHA también tiene influencia sobre las hormonas necesarias para el crecimiento. La activación prolongada del eje HHA puede llevar a la supresión de la liberación de la hormona de crecimiento (GH), la inhibición de somatomedina C y del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1), las cuales son esenciales para el crecimiento normal. Los glucocorticoides

liberados durante estados de estrés prolongado pueden causar una menor respuesta de los tejidos al IGF-1. El incremento en la secreción de somatostatina causada por la CRH, resulta en la inhibición de la GH: esta característica ha sido relacionada con un mecanismo potencial de los efectos inhibidores del crecimiento provocado por glucocorticoides. Además, en varios desórdenes del humor relacionados con el estrés y con el eje HHA hiperactivo (ver tabla 1), los niveles de GH e IGF-1 se encuentran significativamente disminuidos (Chrousos y cols., 1998).

Estrés y el tracto gastrointestinal

Se sabe, que el estrés puede causar problemas digestivos. El estrés causa problemas tanto en el estómago como en los intestinos de varias maneras. La CRH dificulta la liberación de ácido estomacal y provoca el vaciado del estómago; además, está implicado en la hipermotilidad del colon, ya que aumenta la liberación de sus contenidos. Los niveles elevados de cortisol -como ocurre en varias formas de depresión, o durante estrés crónico psicosocial- puede incrementar el apetito y llevar por consecuencia a una ganancia de peso. Los centros de apetito/saciedad en el hipocampo se encuentran influenciados por el estrés: de manera aguda, la CRH causa anorexia, mientras que el neuropéptido Y (NPY), el cual es orexigénico (estimula el apetito), estimula la secreción de CRH (Chrousos, 1998).

Enfermedades asociadas a la desregulación del eje HHA

El eje HHA tiene un papel importante en la respuesta hacia estímulos internos y externos incluyendo estresores psicológicos. Es bien conocido el papel fundamental del estrés en los episodios precipitantes de los desórdenes psiquiátricos en individuos predispuestos (Jurueña y cols., 2004). Estas anormalidades parecen estar relacionadas a cambios en la habilidad de los glucocorticoides circulantes, los cuales ejercen un efecto de retroalimentación negativa en la secreción de hormonas del eje HHA a través de su unión a MR y GR. Estudios previos han descrito que si la retroalimentación negativa del eje HHA se encuentra dañada, esto lleva a la hipercortisolemia, como ocurre en la depresión mayor. Otras condiciones pueden estar asociadas a la prolongada activación del eje HHA, entre las que se encuentran la anorexia nerviosa, el desorden obsesivo-compulsivo, el trastorno de pánico, los trastornos de ansiedad, el alcoholismo crónico, la abstinencia al alcohol y narcóticos y el hipertiroidismo. Otro grupo de estados son característicos de la hipoactivación del sistema de estrés, es decir, la secreción reducida de CRH podría resultar en diversas patologías y en una facilitación del

asa de retroalimentación negativa del eje HHA (tabla 1). Estas características son distintivas en pacientes con desorden de estrés post-traumático (Jurueña y cols., 2004).

Tabla 1. Estados asociados con la hiperactividad e hipoactividad del eje HHA

Incremento en la actividad del eje HHA

Depresión melancólica

Anorexia nerviosa

Desorden obsesivo-compulsivo

Desorden de pánico

Disminución en la actividad del eje HHA

Depresión estacional

Síndrome de fatiga crónica

Fibromialgia

Hipotiroidismo

Alteración en la actividad del eje HHA

Síndrome de Cushing

Deficiencia a glucocorticoides

Resistencia a glucocorticoides

Tomado de Jurueña y cols. 2004.

Respuesta inmunológica ante el estrés

La actividad del sistema inmunológico influye en el funcionamiento del SNC, diversas citocinas como la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-2 (IL-2), la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), pueden, como muchos neurotransmisores, estar involucrados en la regulación de la cognición, el estado de ánimo y la conducta. La producción de citocinas se ha propuesto como un aspecto fundamental de la patogénesis de la depresión y más recientemente, su papel en los cambios neuro-conductuales parecidos a la depresión en estados de enfermedades somáticas (Simmons y Broderick, 2005).

Diversos estresores infecciosos provocan la rápida activación del sistema inmunológico, entre los que se incluyen toxinas, la inoculación con diversos microorganismos (reto inmunológico) como los virus, las bacterias, los hongos y los parásitos o un antígeno. En respuesta a una infección, o a un desorden inflamatorio como la artritis reumatoide, el sistema

inmune libera citocinas que median la respuesta inmune innata, entre las que se incluyen las citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α , la IL-1, la IL-6 y los interferones de tipo I (INF- α/β). Otro grupo de citocinas que median la inmunidad adaptativa, como las citocinas IL-2 y los INF- γ (interferones tipo II), son importantes mediando las defensas antivirales. La citocinas liberadas como parte de la respuesta inmunológica adaptativa o innata pueden activar el eje HHA, promoviendo la liberación de glucocorticoides adrenales. Los glucocorticoides regulan negativamente las células de la respuesta inmunológica para suprimir la síntesis y liberación de citocinas, por lo tanto protegen al hospedero de las consecuencias de una respuesta inmunológica sobreactivada (daño al tejido, autoinmunidad, choque séptico) (Sapolsky y cols., 2000; Silverman y cols., 2005).

La CRH es considerada como el mecanismo primario por el cual las citocinas estimulan la liberación de glucocorticoides. Las células del sistema inmune producen citocinas pro-inflamatorias: IL-1, IL-6 y el TNF- α . Estas tres sustancias, trabajando ya sea individualmente o en combinación, provocan la liberación de CRH. La evidencia sugiere que IL-6 juega un papel primario en la estimulación inmunológica del eje HHA humano ya que promueve la liberación de ACTH y de cortisol. La CRH disminuye la proliferación de células T y de células citotóxicas o “natural killers” (NK). En contraste, la CRH a dosis extremadamente elevadas puede ser también un estimulante inmune, potenciando la proliferación de células B y la proliferación de linfocitos en respuesta a diversos mitógenos e incrementando el número de receptores a IL-2 (Sapolsky y cols., 2000; Chrousos, 1998).

El eje HHA interactúa con el sistema inmunológico, haciendo al organismo más vulnerable a la fatiga e infecciones, entre otras alteraciones. Los altos niveles de cortisol producidos por estados de estrés crónico pueden hacer que el organismo sea más susceptible a las enfermedades ya que hace menos efectiva la función de las células blancas sanguíneas. Contrariamente, cuando el eje HHA se encuentra en un estado de baja actividad, hay poca producción de corticosteroides, lo que por consiguiente, puede producir que el sistema inmune se vuelva hiperactivo lo que incrementaría el posible riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes (Sapolsky y cols., 2000; Chrousos, 1998).

En condiciones normales, las células del sistema inmunológico adaptativo (por ejemplo, células T y B) circulan en la sangre y la linfa, forman grupos anatómicamente

definidos en los órganos linfáticos y se encuentran en todos los tejidos. La organización anatómica de estas células y su capacidad de intercambio entre la sangre, la linfa y los tejidos son muy importantes para generar las respuestas inmunológicas. Para optimizar las interacciones celulares necesarias para las fases de reconocimiento y activación de las respuestas inmunológicas específicas, los linfocitos y las células accesorias se localizan y se concentran en los ganglios linfáticos y el bazo a donde se transportan y concentran los antígenos. Los tejidos linfáticos se clasifican en órganos primarios, donde los linfocitos expresan por primera vez los receptores antigénicos y alcanzan la madurez fenotípica y funcional, y en órganos secundarios, donde se inician y desarrollan las respuestas ante los antígenos no propios. El bazo es un órgano linfoide secundario que tiene un papel importante en la filtración de la sangre y en la defensa contra organismos patógenos. Es el órgano principal donde tienen lugar las respuestas contra los antígenos que transporta la sangre. La masa esplénica consta de una porción conocida como pulpa blanca, donde se concentran las células linfoides, y una porción llamada pulpa roja, donde se encuentran las otras células de la sangre. Dentro de la pulpa blanca las células linfoides se distribuyen tanto en forma dispersa como agrupadas en folículos. Las células T predominan en el tejido linfoide disperso, mientras que las células B se localizan principalmente en los folículos. Los folículos están rodeados por un anillo de linfocitos y macrófagos, denominado zona marginal.

Psicopatologías

Cuando una situación estresante es prolongada y sostenida, excede la capacidad del cuerpo para mantener la homeostasis, lo que propicia la aparición de secuelas psicopatológicas. Después de una fase de reacción aguda, aparecen síntomas derivados de esa situación prolongada, entre las que se incluyen la ansiedad, la irritabilidad y un sentimiento de incapacidad para hacer frente a diversas situaciones lo cual puede resultar en depresión en individuos susceptibles (ver capítulo IV). La depresión es probablemente el desorden más relacionado con el estrés. Sin embargo, el estrés repetido *per se*, no es causa suficiente para la aparición de la depresión. Las interacciones entre la predisposición genética y algunos estresores ambientales son necesarios para la aparición de esta enfermedad (Lanfume y cols., 2008). Por otro lado, otro de los desórdenes precipitados por la exposición a condiciones estresantes es la ansiedad. La evidencia actual sugiere que la ansiedad no parece tener un componente hereditable, también se ha sugerido que los factores ambientales juegan un papel importante en la manifestación de algunas psicopatologías específicas. Las patologías de

ansiedad se cree están relacionada a una combinación de efectos negativos y el sentimiento de tener poco control ante situaciones específicas o ambientes determinados (Davis y cols., 2002). Los síntomas de ansiedad son muy diversos, entre ellos el sentimiento de angustia y otros que involucran la hiperactividad vegetativa, como taquicardia, taquipnea (frecuencia respiratoria rápida), sensación de ahogo, temblores en las extremidades, sensación de pérdida de control o del conocimiento, transpiración, rigidez muscular, debilidad muscular, insomnio, entre otros (Davis y cols., 2002; DSM-IVR, 1998). La ansiedad se puede manifestar de tres formas diferentes; a través de síntomas fisiológicos, cognitivos y conductuales. Estos hacen referencia a tres niveles distintos, los cuales pueden influirse unos en otros, es decir, los síntomas cognitivos pueden exacerbar los síntomas fisiológicos y estos a su vez disparar los síntomas conductuales.

CAPÍTULO IV.

Depresión

La depresión es una alteración del estado de ánimo, o trastorno afectivo que se caracteriza por un sentimiento de tristeza intensa, desesperanza, anhedonia (incapacidad para sentir placer), pérdida de la concentración, preocupaciones pesimistas, ideas de suicidio, entre otros (DSM-IV-R, 1998). Los trastornos del estado de ánimo tienen como característica principal una alteración del humor. Estos trastornos del estado de ánimo están divididos en trastornos depresivos (depresión unipolar), trastornos bipolares y dos trastornos basados en la etiología: trastorno del estado de ánimo debido a una enfermedad médica y trastorno del estado de ánimo inducido por sustancias. Al menos cerca del 21 % de la población mundial ha experimentado en algún momento de su vida un episodio depresivo (Nemeroff, 1998) y en México este porcentaje es semejante. En un estudio realizado por Caraveo-Anduaga y cols. (1999) en la Ciudad de México, se encontró que el 7.9% de la población presentó un episodio depresivo durante la vida, con un claro predominio en las mujeres. La enfermedad interfiere en gran medida con el funcionamiento físico y social de los pacientes, y la alta morbi-mortalidad la convierte en un problema de salud pública.

La depresión es una enfermedad de origen multifactorial en la que intervienen la predisposición genética, la vulnerabilidad al estrés, los factores medioambientales, entre otros; sin embargo, el mecanismo neurobiológico que subyace a la depresión es todavía incierto. Se sabe que múltiples sistemas del organismo participan en la regulación del estado de ánimo, y en consecuencia, están relacionados con la depresión. Por ejemplo, se sabe que existe una estrecha relación entre la disfunción del eje HHA y la depresión, ya que la exposición crónica a eventos de vida estresantes se asocia con el desarrollo de síntomas depresivos en ciertos individuos, bajo ciertas condiciones desfavorables. En el mismo sentido, el estrés psicosocial es ampliamente reconocido como un disparador importante de varios síndromes clínicos, particularmente desórdenes de ansiedad y del estado de ánimo. Además, el hipotálamo, una estructura del SNC involucrada en la regulación del eje HHA, está fuertemente inervado por sistemas cerebrales productores de neurotransmisores, los cuales tienen un papel importante en la patogénesis de la depresión (Tafet y Bernardini, 2003).

Hipótesis de citocinas

La hipótesis de citocinas en la depresión deriva tanto de observaciones experimentales como clínicas. Las observaciones clínicas fueron hechas en pacientes tratados con INF γ e IL-2. Dichos pacientes frecuentemente presentaban síntomas parecidos a la influenza y síntomas psiquiátricos, algunos de los cuales son característicos de la depresión. Los primeros estudios sugirieron un déficit en la función inmune en pacientes deprimidos, pero los resultados fueron inconsistentes y altamente variables (Dunn y cols., 2005). Algunos estudios subsecuentes reportaron que pacientes depresivos presentaban activación inmune, y la depresión era más frecuente en pacientes con enfermedades que tuvieran un componente inmunológico (Dunn y cols., 2005). Sin embargo, los resultados fueron muy variados; la función inmune en pacientes deprimidos estaba disminuida en algunos aspectos, pero activada en otros.

Algunos reportes indican que la depresión es causada por un desequilibrio entre las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Entre las primeras cabe mencionar a IL-1, IL-6, IL-2 e IL-12, mientras que las segundas son IL-4, TGF- β . Se ha reportado que el uso de antidepresivos en pacientes deprimidos reduce la liberación de citocinas pro-inflamatorias y de otros factores inmunológicos. Por otro lado, también se ha reportado que los antidepresivos pueden disminuir la relación citocinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias, por lo que se ha hipotetizado que la hipersecreción de citocinas puede estar involucrada en la patofisiología de los desordenes depresivos. Sin embargo, el tratamiento con antidepresivos no siempre se acompaña de reducción en las concentraciones de citocinas pro-inflamatorias. Por lo tanto, las asociaciones específicas entre el tratamiento antidepresivo y las alteraciones en los niveles de citocinas se mantiene todavía incierto (Sutcgil y cols., 2007).

Hipótesis neurotrófica de la depresión

En 1965 Joseph Schildkraut postuló que el déficit en la neurotransmisión monoaminérgica, es decir, de serotonina (5-HT), NA y dopamina (DA) en el SNC, lleva a una alta vulnerabilidad a presentar este desorden. Algunas evidencias clínicas soportaron esta hipótesis ya que pacientes con depresión presentan alteraciones en la producción de 5-HT, NA y DA. Además, los tratamientos antidepresivos incrementan la neurotransmisión monoaminérgica, en particular la de 5-HT (Swaab y cols., 2005). Diversas observaciones apuntan al déficit en el metabolismo de 5-HT en la depresión. A finales de 1960s se reportaron bajas concentraciones en el fluido cerebroespinal (CFS) de ácido 5

hidroxyindolacético (5-HIAA) en pacientes depresivos, el mayor producto de degradación de la 5-HT; la concentración de 5-HIAA en el CFS puede ser considerada como un indicador del metabolismo de 5-HT, de tal forma que bajas concentraciones de 5-HIAA en el cerebro podría sugerir baja concentración de 5-HT (van Praag, 2004).

A pesar de la relación entre las monoaminas y la depresión, actualmente se sabe que la enfermedad es compleja, por lo que se han propuesto nuevas hipótesis para explicarla, entre ellas la hipótesis neurotrófica.

Los factores neurotróficos son reguladores clave en la formación y plasticidad de las cadenas neuronales. De esos factores neurotróficos, la familia de neurotrofinas - factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3, neurotrofina-4 -son las mejor caracterizadas. Sin embargo, otros factores como los miembros del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) también regulan la plasticidad neuronal. Recientemente, los factores neurotróficos como el BDNF y el receptor a tirosin-cinasa (TrkB), se relacionaron con la regulación de los desórdenes del humor y los efectos antidepresivos. Estos descubrimientos han llevado a la formulación de la hipótesis neurotrófica de la depresión, la cual propone que los bajos niveles cerebrales de BDNF en ciertas estructuras predisponen a la depresión, mientras que el incremento en el nivel de BDNF produce un efecto antidepresivo. Sin embargo, el papel de las neurotrofinas en el desarrollo y en el cerebro adulto, sugieren una hipótesis neurotrófica modificada, que enfatiza el papel del BDNF como una herramienta que modifica las cadenas neurales las cuales regulan diferentes aspectos relacionados al humor (Castrén y cols., 2007).

El estrés es usado como un modelo para estudiar las alteraciones de la estructura y función cerebral debido a que los desórdenes del humor son frecuentemente precipitados o exacerbados por eventos de vida estresantes. El estrés causa daño y atrofia en neuronas de ciertas estructuras cerebrales, notablemente en el hipocampo, una de las varias estructuras límbicas que han sido relacionadas con los desórdenes del humor y con procesos de memoria. Diferentes paradigmas de estrés de tipo agudo o crónico (7 a 21 días) reducen la expresión del BDNF en el hipocampo y esa reducción puede ser prevenida mediante un tratamiento con drogas antidepresivas. Los animales sometidos a estrés y los pacientes deprimidos muestran reducción del volumen hipocampal, y al menos parte de este efecto puede ser contrarrestado

por fármacos antidepresivos. Se ha encontrado que los tratamientos antidepresivos administrados en un corto plazo aumentan la concentración de las monoaminas; mientras que el tratamiento de largo plazo con estos fármacos incrementa la expresión de factores neurotróficos (VEGF, BDNF, IGF-1 y FGF-2) en el hipocampo adulto, e incrementa de manera significativa la neurogénesis en dicha estructura (Duman y Monteggia, 2006). Se ha sugerido que la neurogénesis es un blanco común de los medicamentos antidepresivos farmacológicos; resulta interesante que la producción de nuevas neuronas también se lleva a cabo después de tratamientos antidepresivos no farmacológicos, como el ejercicio voluntario y la estimulación magnética transcraneal repetitiva (Tsutsumi y cols., 2002).

Algunos estudios examinaron la influencia del estrés por inmovilización de manera aguda y reportaron una reducción significativa en la expresión del mRNA del BDNF en el hipocampo, en las células de la capa granulosa del giro dentado, así como una disminución de la capa de células piramidales de las regiones hipocámpales CA3 y CA1. Posteriormente se encontró que otros tipos de estrés, incluyendo los impredecibles, el aislamiento social, estrés por nado, también disminuyen la expresión del BDNF en el hipocampo. Los mecanismos para entender la regulación a la baja de la expresión de BDNF han sido investigados y podrían relacionarse de forma primaria al incremento en la concentración de corticosteroides secretados durante el estrés. Por otro lado, el bloqueo de los receptores 5-HT_{2A} parcialmente obstruye los efectos del estrés en el BDNF hipocámpal, sugiriendo una relación entre los mediadores del estrés, la 5-HT y el factor neurotrófico. También hay evidencia que la IL-1 β contribuye a la regulación a la baja de la expresión de BDNF en el hipocampo (Duman y Monteggia, 2006, Castrén y cols., 2007).

La relación de los cambios en los neurotransmisores con los del BDNF en la depresión se ha establecido a lo largo de una década del surgimiento de esta hipótesis. El planteamiento y resultados de esta interacción han demostrado la complejidad de los desórdenes depresivos en cuanto a la neurobiología, y en consecuencia a los tratamientos. Es un hecho que sólo un porcentaje de pacientes responde a las terapias tradicionales farmacológicas y no farmacológicas, lo que confirma que aún desconocemos las bases neurobiológicas de la depresión, y que la investigación al respecto va a ser un tema crucial en las neurociencias.

CAPÍTULO V.

Modelos animales

La creación de modelos animales razonablemente válidos de enfermedades psiquiátricas presenta diversas dificultades debido tanto a la naturaleza verbal y personal de los síntomas psiquiátricos, como por ejemplo, la tristeza o desilusión, así como al poco conocimiento de factores etiológicos claros los cuales pueden ser usados para crear estos modelos (Henn y Vollmayr, 2005). De ahí la dificultad de crear modelos animales de enfermedades como la esquizofrenia, cuya característica principal es la alteración de la percepción. Sin embargo, a la fecha existen varios modelos animales de depresión que han sido validados en la investigación preclínica. Estos modelos son herramientas fundamentales dirigidas a obtener un mejor entendimiento y comprensión de las bases neurobiológicas de esta patología; en los últimos años se han desarrollado diversas propuestas en las cuales se puede estudiar distintas características de esta enfermedad. Algunos de estos modelos intentan replicar en los animales uno o varios componentes del cuadro depresivo en humanos. Otros modelos, son o pretenden ser herramientas útiles para la detección y eficacia de drogas antidepressivas (Ferreira y cols., 1997).

Existen criterios que permiten determinar el grado de validez de cualquier propuesta de modelos animales de depresión. Estos criterios de validación están orientados principalmente a valorar tres aspectos fundamentales. El primer criterio se refiere a la medida en la que el modelo animal reproduce la apariencia del cuadro que se presenta en los seres humanos, llamándose a esto validez de apariencia. Para analizar la validez de apariencia, se examina el punto de similitud entre el modelo y el desorden, en un amplio rango de signos y síntomas. Sin embargo, no todos los síntomas de la condición psiquiátrica pueden ser replicados en el modelo, por lo que se propone que éste represente al menos alguno de los signos o síntomas clínicamente más importantes. De acuerdo a los criterios diagnósticos del DSM-IV, la depresión mayor requiere de la presencia de al menos uno de los dos siguientes síntomas esenciales: pérdida de interés o placer (anhedonia) y humor deprimido. De éstos, la anhedonia puede ser modelada en animales, pero no el humor deprimido. En el análisis de la validez de apariencia de modelos animales, la anhedonia, por lo tanto, asume la posición principal (Ferreira y cols., 1997; Willner y Mitchell, 2002).

El segundo criterio, se refiere al grado de consistencia que la propuesta tiene con alguna teoría referente a la generación de la depresión, a esta característica se denomina validez de constructo o validez hipotética. La evaluación de los fundamentos teóricos de un modelo animal requiere de características que consideren tanto al desorden por si mismo como a la conducta exhibida debido al desorden. Las teorías de depresión podrían ser usadas para evaluar la validez de constructo de un modelo animal que podría relacionarse con los mecanismos neurobiológicos, etiológicos (este aspecto de la validez de constructo es algunas veces conocida como validez etiológica) o psicológicos. Por ejemplo, se sabe que los episodios de depresión mayor están frecuentemente precipitados por la exposición a estresores agudos severos, o estresores crónicos no tan severos (Willner y Mitchell, 2002), por lo que uno de los factores válidos para inducir anhedonia en animales sería la aplicación de estresores. Sin embargo, cualquier evaluación de un modelo animal de depresión esta intrínsecamente limitada por el estado rudimentario de las teorías de la patología de la depresión (Ferreira y cols., 1997; Willner y Mitchell, 2002).

El tercer criterio revisa la capacidad del modelo para responder selectivamente a fármacos con actividad antidepresiva, a lo que se le conoce como validez predictiva. Este criterio está determinado en gran parte por su respuesta a drogas antidepresivas, en la mejoría o atenuación de los síntomas por tratamientos efectivos en el tratamiento de la condición humana e inversamente, no ser afectados por aquellos tratamientos que son inefectivos en la atenuación del desorden en humanos. (Ferreira y cols., 1997; Willner y Mitchell, 2002; Anisman y Matheson, 2005).

Modelo de estrés por inmovilización

Hans Selye fue el primer investigador que utilizó el estrés por inmovilización, el cual lleva a la rata a presentar manifestaciones del síndrome de estrés, por ejemplo, hipertrofia adrenal, ulceración gástrica e involución timicolinfática. El procedimiento de restricción original de Selye consistía en atar juntas las patas de la rata y envolver al animal fuertemente con una toalla. Todos los tipos de estrés por restricción pueden ser vistos como una mezcla de estresores físicos y fisiológicos. Ante este estresor, la respuesta máxima del sistema efector de estrés se ve usualmente dentro de los primeros 30 min (Pacák y Palkovists, 2001). Se sabe que el estrés por inmovilización regula a la baja la expresión del mRNA del BDNF en el

hipocampo y causa un incremento en la liberación y producción de 5-HT en el hipocampo (Pacak y Palkovists, 2001, Vaidya y cols., 1997).

Ratas Wistar Kyoto

La cepa de ratas Wistar-Kyoto (WKY) ha sido propuesta como un modelo animal de depresión endógena. Proviene de la cepa Wistar (Wi) y fue inicialmente desarrollada como una cepa control normotensa de la rata espontáneamente hipertensa (SHR). Las ratas WKY presentan medidas hormonales, conductuales y fisiológicas que emulan a aquellas encontradas en pacientes que presentan sintomatología depresiva (Will y cols., 2003).

Como algunos humanos deprimidos, las ratas WKY son hiper-reactivas al estrés y presentan desregulación del eje HHA. Comparadas con ratas de las cepas Sprague-Dawley (S-D) y Wi, las WKY presentan conducta tipo depresiva en un amplio rango de paradigmas conductuales: presentan mayor cantidad de inmovilidad en la prueba de nado forzado y desarrollan anhedonia más fácilmente que otras cepas de ratas (Will y cols., 2003; Jiao y cols., 2003).

Las WKY desarrollan también estrategias pasivas cuando son expuestas a pruebas de ansiedad: cuando son probadas tanto en el campo abierto, el laberinto elevado en cruz, o en la caja de transición luz/oscuridad, las WKY presentan baja locomoción, menor conducta exploratoria, y aumento de conductas relacionadas con la ansiedad, como congelamiento y acicalamiento facial (Durand y cols., 2003). En otras pruebas de ansiedad, como la de enterramiento defensivo, las WKY exhiben mayor conducta de congelamiento, en vez de la típica conducta de enterramiento que caracteriza a otras cepas de roedores: por lo tanto, ante una situación que genera temor-ansiedad, las WKY responden con estrategias de *coping* pasivo (Durand y cols., 2003).

Los cambios fisiológicos en respuesta al estrés son más severos en ratas de la cepa WKY, en comparación con otras cepas como la Wi, S-D, Fischer-344 (F-344), por ejemplo, son más susceptibles a padecer úlceras gástricas inducidas por el estrés. La aparición de úlceras es considerada como un clásico ejemplo de una enfermedad psicosomática y esto es importante debido a que evidencia que los estresores emocionales pueden influir, en un determinado grado, en los procesos de enfermedad. También el contenido de ACTH y los

niveles de mRNA de POMC en la adenohipófisis se ven significativamente aumentados en respuesta al estrés (Suzuki y cols., 2001; Zafar y cols., 1997; Paré y Redei, 1993).

Ante la aplicación de un estresor, las ratas Wi liberan corticosterona y alopregnanolona, un metabolito de la progesterona con actividad ansiolítica mediada por los receptores GABAA-benzodiazepinas (Fernández-Guasti y Picazo, 1995). De acuerdo con estos datos, un individuo normal libera sustancias endógenas capaces de contrarrestar la respuesta de estrés y los efectos tóxicos de la corticosterona. Sin embargo, las ratas WKY no responden al efecto ansiolítico de la alopregnanolona (Estrada-Camarena en preparación), sugiriendo que los metabolitos endógenos que contrarrestan los efectos tóxicos de la corticosterona carecen de efecto en individuos que muestran una alteración del eje HHA.

La hiperactividad del eje HHA y el incremento en las conductas de ansiedad en las ratas WKY pueden estar asociadas con un perfil neuroquímico alterado. Esta cepa tiene alterado el sistema de 5-HT, que se evidencia por la baja respuesta a los antidepresivos y ansiolíticos que actúan mediante un mecanismo de acción serotoninérgico (De La Garza y Mahoney, 2004). La ansiedad y la depresión han sido asociadas con alteraciones en el funcionamiento de NE cerebral; los estudios de autorradiografía de cerebros de ratas WKY revelan que presentan un incremento significativo de la densidad de los transportadores de NE (NET) en el hipocampo y la amígdala. Esta modificación neuroquímica conduce a una deficiencia en la disponibilidad de NE, lo que podría contribuir a la conducta depresiva de las WKY. Se conoce poco acerca del funcionamiento del sistema DA en esta cepa de animales. Un reporte reveló que la unión a [³H]GBR-12935 (usado como marcador para el transportador a DA: DAT) se encuentra disminuido en el núcleo accumbens de las WKY, comparado con las ratas S-D. Este descubrimiento es importante porque se conoce que el sistema DA está implicado en los procesos de recompensa y de adicción a drogas y tiene su importancia en los desórdenes afectivos y la acción antidepresiva. Recientemente, se ha reportado que el tratamiento repetido con drogas antidepresivas que bloquean la captura de NE y DA alteran la conducta de las ratas WKY en la prueba de nado forzado y en el campo abierto, respectivamente (Jiao y cols., 2005, De La Garza y Mahoney, 2004; Pardon y cols., 2003).

Las ratas WKY presentan también anomalías hormonales en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT), el cual también se encuentra alterado en pacientes con depresión,

por ejemplo, tienen altos niveles basales de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y de la 3,5,3'-triiodotironina (T_3) en relación con la cepa Wi (Solberg y cols., 2001).

Las ratas WKY presentan fallas al responder, al menos a nivel conductual, a los efectos de diversos fármacos antidepresivos, entre los que se incluyen los SSRI cuando se comparan con otras cepas como la Brown Norway, la Lewis, F344 y la S-D, mientras que otros estudios han reportado, por el contrario, una respuesta aumentada a estos mismos antidepresivos. La fluoxetina tiene efectos variables en varias cepas en las conductas presentadas en la prueba de campo abierto, aunque las WKY parecen ser particularmente resistentes. Los tratamientos administrados de forma aguda/subaguda con fluoxetina o imipramina ejercen sus efectos dependiendo de la cepa en la prueba de nado forzado (FST), siendo inefectivos en las WKY. El pre-tratamiento agudo/subagudo en esta cepa con SSRI en la FST refleja una resistencia general a este antidepresivo, por otro lado, el pre-tratamiento agudo con fluoxetina o citalopram también es inefectivo cuando estas ratas se prueban en el laberinto elevado en cruz (Durand y cols., 2003, Will y cols., 2003).

CAPÍTULO VI.

Prueba de campo abierto

Hall en 1934 describió originalmente la prueba de campo abierto (OFT) para el estudio de la emocionalidad en ratas. El procedimiento consistía en someter a un animal, usualmente un roedor, a un ambiente desconocido del cual no puede escapar. El aparato de Hall consistía de una arena circular de 1.2 m de diámetro cerrada por una pared de 0.45 m de alto, iluminada. Colocaba a las ratas individualmente en el anillo más externo del campo abierto y observaba la conducta del animal por un periodo de 2 minutos, durante repetidas pruebas diarias. Las ratas fueron probadas después de 24 ó 48 horas de privación de alimento. Hall observó que las ratas caminaban más cuando se les privó de comida, pero había algunos animales que a pesar de tener alimento no comían, a los cuales llamo emocionales. Cuando estos animales cuando se comparaban con ratas no-emocionales, realizaban pocas entradas hacia la parte central de la arena y tenían altos niveles de defecación (Prut y Belzung, 2003).

La prueba de campo abierto es ahora uno de los procedimientos más populares en el estudio de la conducta animal y es generalmente aceptada como un modelo animal para la medición de conductas relacionadas con la ansiedad. Actualmente hay diferentes versiones disponibles, las cuales difieren en la forma del ambiente (circular, cuadrado o rectangular), luminosidad (algunas veces se utiliza luz roja), presencia de objetos dentro del área como plataformas, columnas, túneles, etc. El procedimiento generalmente involucra una confrontación forzada del roedor con la situación. Este paradigma esta basado en un conflicto interno entre la exploración en un nuevo ambiente (basado en una potencial recompensa) y la evitación del nuevo ambiente. El animal es colocado en el centro o cerca de las paredes del aparato y las conductas que el animal realiza son videograbadas por un período que va del rango de los 2 a los 20 minutos (usualmente 5 minutos): locomoción horizontal (número de cruces de las líneas marcadas en el piso), frecuencia de erguimientos (*rearing*) o inclinaciones (*learning*) (también llamado actividad vertical) y acicalamiento (*grooming*). En dicha situación, los roedores espontáneamente prefieren mantenerse en la periferia del aparato de actividad que en las partes centrales del campo abierto. Los roedores usualmente se mantienen en referencias verticales como son las paredes, una respuesta conductual innata referida como thigmotaxis. El incremento en tiempo que pasan en la parte central así como la tasa de locomoción central/total o la

disminución de la latencia para entrar en la parte central son indicadores de ansiólisis. La conducta en la prueba de campo abierto esta influenciada por diversos factores, entre los que se incluye la variabilidad genética, el género, la edad y experiencias recientes del individuo, además del nivel de iluminación en la arena de campo abierto. Los roedores son de hábitos nocturnos y tienden a evitar lugares muy luminosos, por lo que la luz intensa puede ser usada como un estímulo aversivo en el campo abierto lo que lleva a un incremento en las conductas relacionadas con la ansiedad, como la evitación del centro de la caja y la disminución de la actividad exploratoria y locomotora (Prut y Belzung, 2003; Bouwknecht y cols., 2007).

Justificación:

La depresión es un trastorno del estado de ánimo que se caracteriza por la presencia de sentimientos de tristeza, anhedonia y desesperanza, que puede ser transitorio o permanente. La depresión mayor se caracteriza por presentar alteraciones endocrinas, inmunológicas y conductuales, asociados a un deterioro general de la salud de los individuos, lo que hace que este padecimiento sea un problema de salud pública.

Para el estudio de los trastornos depresivos, los modelos animales son herramientas importantes que permiten profundizar nuestro conocimiento de los mecanismos involucrados en la enfermedad así como desarrollar los tratamientos óptimos para esta patología. Los modelos animales relacionados con el estudio de la depresión son múltiples y variados, pero a la fecha, los más utilizados son los que se basan en la aplicación de estrés agudo. Sin embargo, existen pocos estudios que utilicen modelos en los que esté implicado el factor genético y la respuesta a un estresor crónico; asimismo, se desconoce las implicaciones a nivel conductual, endócrino e inmunológico en un modelo animal con estas características. Un modelo de esta naturaleza nos permitiría estudiar algunos aspectos de las bases biológicas de la depresión.

Hipótesis

La aplicación de estímulos estresantes crónicos (restricción de movimiento) y/o la administración de un glucocorticoide sintético (hidrocortisona), ocasionan alteraciones cuantificables a nivel endocrino (grosor de la corteza adrenal y producción de corticosterona sérica), inmunológico (formación de folículos secundarios en el bazo) y conductual (actividad locomotora y exploratoria).

Objetivo General

Determinar las alteraciones conductuales, endocrinas e inmunológicas en una cepa de ratas hiper-sensibles al estrés (cepa WKY), inducidas por la aplicación de un estresor crónico (restricción de movimiento [RM]) y el consumo de hidrocortisona (HC).

Objetivos particulares

- I. Determinar si la aplicación de RM y la administración de un glucocorticoide sintético (HC) induce alteraciones conductuales.
- II. Analizar si la aplicación de RM y la administración de un glucocorticoide sintético (HC) afectan la función neuroendócrina de las glándulas adrenales
- III. Determinar si la aplicación de RM y la administración de un glucocorticoide sintético (HC) deteriora la respuesta inmunológica.

Material y Métodos:

Animales

Se utilizaron ratas hembras de la cepa WKY, de tres meses de edad, con un peso entre 190-230 gr al comienzo del experimento. Las ratas fueron alojadas en pares, en cajas de acrílico transparente (47 x 34 x 21 cm), con ciclo de luz-oscuridad invertido (la luz se encendió a las 22:00 hrs, debido a que los roedores son de hábitos nocturnos y la prueba locomotora debe realizarse en el periodo de mayor actividad), con alimento y agua *ad libitum*, hasta antes del inicio del experimento. El manejo general de las ratas se hizo de acuerdo a los principios generales para el cuidado de animales de laboratorio (NIH publication 85-23, 1985) y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Diseño experimental

Durante el experimento, la ingesta de líquidos se restringió a una solución de hidrocortisona al 2% (HC) (ver preparación en el apéndice III).

Los animales se dividieron en grupos independientes que recibieron diferentes tratamientos; a su vez, para cada tratamiento los animales fueron asignados a sub-grupos independientes con diferente duración de tratamiento:

Control: Este grupo (n = 5) fue conformado por animales que no recibieron ni RM ni consumo de HC. Inmediatamente después de salir del bioterio, las ratas fueron sometidas a una prueba de campo abierto para la evaluación conductual. Posterior a ésta, los animales fueron sacrificados por decapitación.

Consumo de HC: Este grupo de animales (n total = 24) recibió un tratamiento crónico con la solución de HC; los animales (n por grupo = 4 animales) de cada grupo fueron sacrificados los días 7, 14, 21, 28, 35, y 42.

RM: Las ratas de este grupo (n total = 30) fueron sometidas a RM (3hr por día) y sacrificadas los días 7, 14, 21, 28, 35, y 42 (n por grupo = 5). Estos animales tuvieron libre acceso a alimento y agua durante todo el experimento.

RM + HC: Los animales de este grupo (n total = 36) consumieron una solución de HC y fueron sometidas a RM (3hr por día); las ratas fueron sacrificadas los días 7, 14, 21, 28, 35, y 42 (n por grupo = 6).

Para los grupos experimentales, el último día de manipulación los animales fueron expuestos a una prueba de campo abierto y posteriormente sacrificados en los tiempos indicados.

Tratamiento

Los animales de los grupos experimentales consumieron una solución de HC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), al 2%. La solución de HC se vertió en bebederos de vidrio para el consumo de los animales. El procedimiento de preparación de la HC se realizó todos los días (ver apéndice III). La cantidad de HC consumida por día fue obtenida tomando el peso de las botellas menos el peso registrado 24 horas después del consumo; el peso fue utilizado para calcular los mg. de cortisona consumidos por los animales. Se sabe que la administración de glucocorticoides induce la desregulación del eje HHA (Young, 1996), por lo tanto este tratamiento fue utilizado para inducir cambios a nivel neuroendócrino en las ratas

Estrés por restricción de movimiento

Los animales fueron colocados en restrictores de movimiento (ver fig. 3) elaborados con acrílico transparente, con dimensiones de 24.8 cm de largo y 7.5 cm de diámetro, los restrictores son ajustables al tamaño de la rata mediante barras de acrílico, y permiten la libre circulación de aire. Las ratas fueron inmovilizadas por un período de 3 hrs. diarias (10:00-13:00), a lo largo de 42 días. Inmediatamente después de las 3hrs de RM, los animales fueron regresados a su caja. Los restrictores fueron lavados con agua y jabón y dejados a secar a temperatura ambiente.

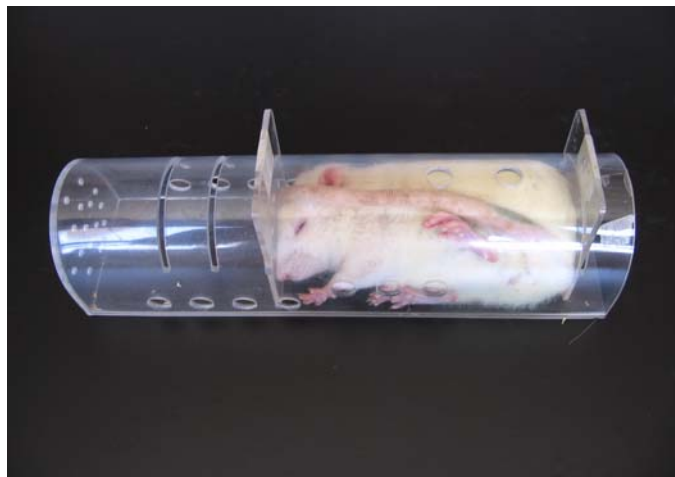


Fig. 3 Procedimiento de estrés por restricción de movimiento.

Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto se utilizó para evaluar posibles cambios en la respuesta a la novedad después de los tratamientos con RM, HC y RM + HC (Lowry y cols., 2008). La prueba de campo abierto se realizó el día anterior al sacrificio, por un periodo de 10 min, en un aparato de monitoreo de actividad locomotora IR LE-8811 (PanLab). Este equipo consta de dos emisores y detectores de infrarrojos que forman un cuadrante de 44.5 cm. por 44.5 cm. con dos sensores de 2.5 cm de ancho, cada uno para cuantificar la interrupción del infrarrojo (ver figura 4). Durante la prueba la computadora registró las siguientes conductas: actividad locomotora y actividad exploratoria de los cuales se obtuvo la actividad total. Las lecturas de los datos se tomaron a intervalos de 1 min durante 10 min. La prueba de campo abierto se realizó con una intensidad lumínica de 60 lux. El programa liberó una tabla de datos para cada parámetro, y los resultados se ilustraron como media \pm error estándar.

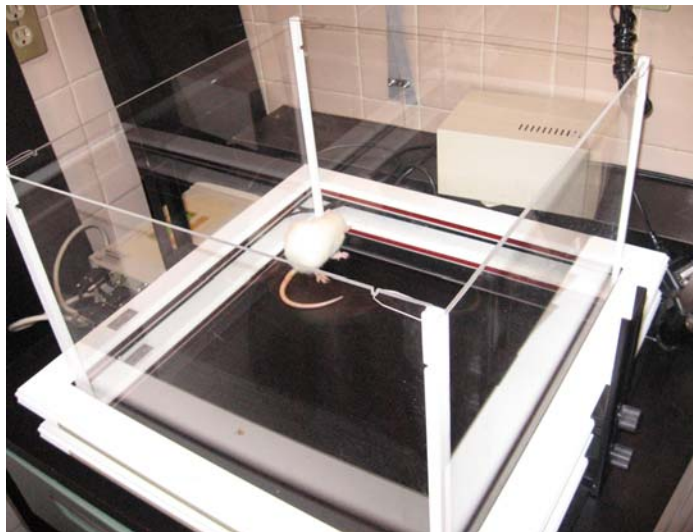


Fig. 4 Aparato de monitoreo de actividad locomotora IRLE-8811 utilizado para cuantificar la actividad locomotora y exploratoria.

Procedimiento quirúrgico

Al final del experimento, los animales fueron sacrificados por decapitación para la obtención de sangre, glándulas adrenales y bazo. Se realizaron todos los esfuerzos para evitar que las ratas sufrieran estrés adicional al momento del sacrificio. Las glándulas adrenales fueron limpiadas, retirando todo el exceso de grasa, con ayuda de agujas quirúrgicas y un microscopio de disección y posteriormente las glándulas de cada animal fueron pesadas individualmente. La determinación del peso se repitió 5 veces para cada glándula en una báscula analítica (Ohaus, modelo EP213C, Suiza). Los resultados son expresados como el promedio de las 5 mediciones \pm SD. Tanto las glándulas adrenales como el bazo fueron colocados en tubos eppendorf con 2 ml de alcohol absoluto y almacenados a temperatura ambiente para su posterior análisis histológico y morfométrico.

Determinación de corticosterona sérica

La sangre de los animales fue recolectada en tubos de ensaye, dejándose coagular para posteriormente obtener el suero por centrifugación (centrífuga Eppendorf 5804R), a 3800 rpm por 10 minutos a 4°C. El suero obtenido fue almacenado a 4°C en tubos eppendorf, con un volumen 50 μ l cada uno. Posteriormente el suero fue analizado con kits comerciales (Coat-A-Count Rat Corticosterone, Diagnostic Products Corporation) para detección de corticosterona en rata por la técnica de radioinmunoensayo (RIA) (ver apéndice II).

Análisis histológico

Para la determinación del grosor de la corteza adrenal y la formación de folículos secundarios en el bazo, se utilizó un microscopio de la marca Leica, modelo DMRX, y el programa analizador de imágenes Leica Qwin. Los resultados obtenidos son el promedio de las mediciones de cinco campos de las muestras de la corteza adrenal de cuatro individuos diferentes, por cada tiempo del curso temporal. Las diferencias cualitativas de la morfología de los folículos secundarios en el bazo se ilustran como microfotografías por cada tiempo de tratamiento.

Análisis estadístico

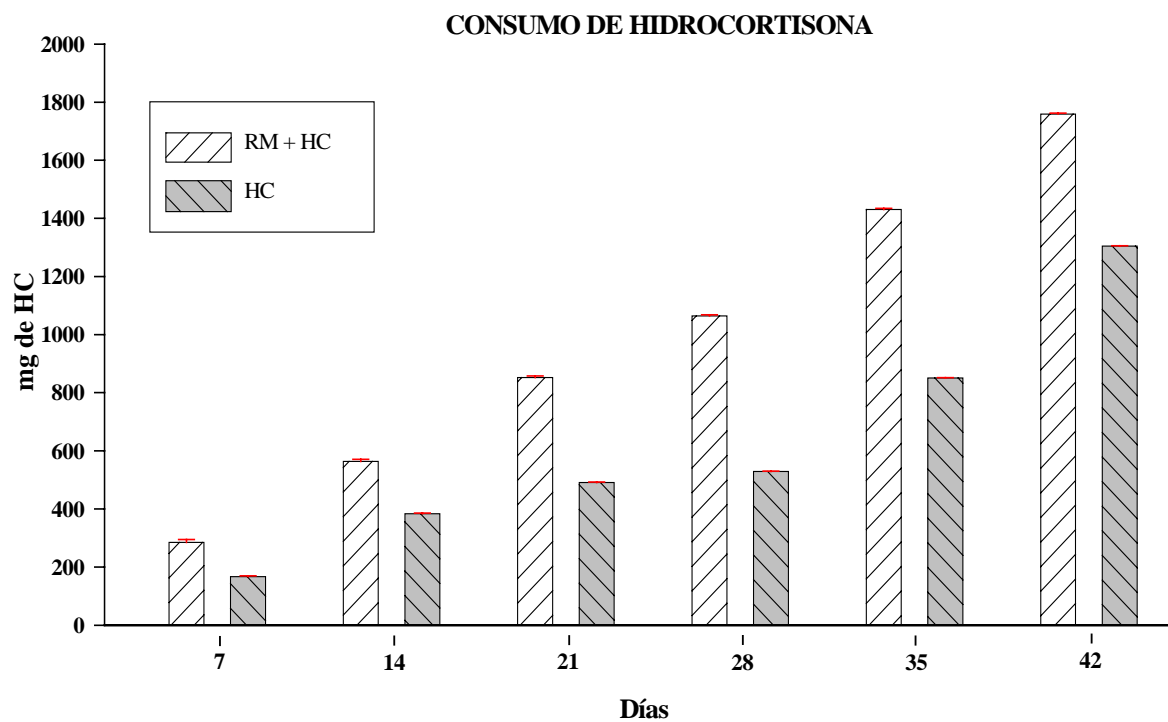
Los resultados del peso de los animales se analizaron con una prueba t-pareada para todos los grupos experimentales, comparando para cada grupo del curso temporal (7, 14, etc. días) el peso antes de iniciar el tratamiento con el peso después del tratamiento.

Los datos del grosor de la corteza adrenal y la producción de corticosterona sérica se expresaron como media \pm S.E.M.; y se analizaron con un índice de correlación de Pearson, para determinar el grado de asociación entre ambos parámetros. La formación de folículos linfáticos en el bazo se mostró como imágenes.

El análisis de los datos conductuales y del peso de las glándulas adrenales se realizó con ANOVA de dos vías, tomando en cuenta el curso temporal de la aplicación de los tratamientos (7-42 días) y los tratamientos (RM + HC, RM y HC). Posteriormente se aplicó una prueba *post-hoc* de Tukey, en caso de encontrarse diferencias estadísticamente significativas en el ANOVA. Las comparaciones pareadas se realizaron mediante una prueba t de Student.

Resultados

Los animales de los grupos HC e RM + HC consumieron una solución de este glucocorticoide en vez de agua. En la gráfica 1 se muestra el consumo de HC (mg de HC) por grupo, y se observa que parten de niveles basales moderadamente diferentes, por lo que el procedimiento de RM no modificó sustancialmente el consumo de HC. De acuerdo a lo esperado, el consumo de HC por animal fue constante e independiente de los días de tratamiento, por ejemplo un animal del grupo de 7 días con RM + HC consumió en promedio 40.66 mg de HC por semana, mientras que un animal de 42 días con RM + HC consumió 41.87 mg de HC. Sin embargo, la gráfica ilustra que la mayor exposición a la HC induce un consumo general mayor de la sustancia. Por lo tanto, es posible relacionar los parámetros de alteración neuroendocrina con la hipercortisolemia consecuente al consumo de HC.



Gráfica 1. Consumo de solución de HC para los grupos RM + HC e HC. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M. de 4 (grupo HC) o 7 (grupo RM + HC) ratas por tiempo de consumo. Los datos se presentan como el consumo acumulado de HC por semana.

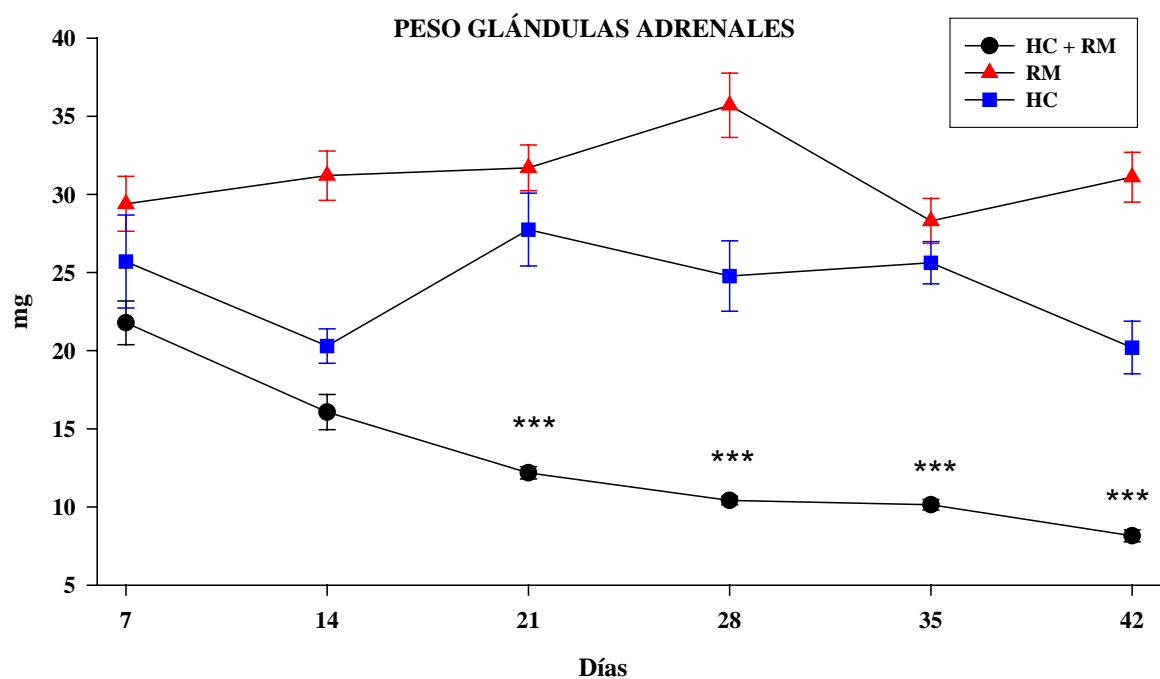
Peso de las ratas antes y después de la exposición a los diferentes tratamientos experimentales.

En la tabla 2 se muestra la pérdida del peso corporal (como una expresión indirecta del estrés) después de la exposición a los tratamientos, expresada como porcentaje de cambio respecto a su peso inicial. En todos los tratamientos, el peso de las ratas disminuyó conforme avanzaba el tiempo de exposición, pero entre los días 28 y 35 se observó un mayor porcentaje en pérdida de peso en el grupo con RM + HC (20.46%, $p < 0.001$) y en el grupo de HC (16.84%, $p < 0.05$).

Tabla 2. Porcentaje de cambio del peso de los animales después de la exposición a estresores respecto comparado con respecto el peso inicial.

Días de tratamiento	Tratamiento		
	RM % dif. de peso	HC % dif. de peso	RM + HC % dif. de peso
7 días	- 2.27	- 6.70	- 8.94
14 días	- 2.48	- 9.80	- 12.24
21 días	- 1.98	- 15.41	- 14.13
28 días	- 0.09	- 12.83	- 20.46
35 días	- 6.80	- 16.84	- 18.61
42 días	- 2.98	- 16.72	- 17.38

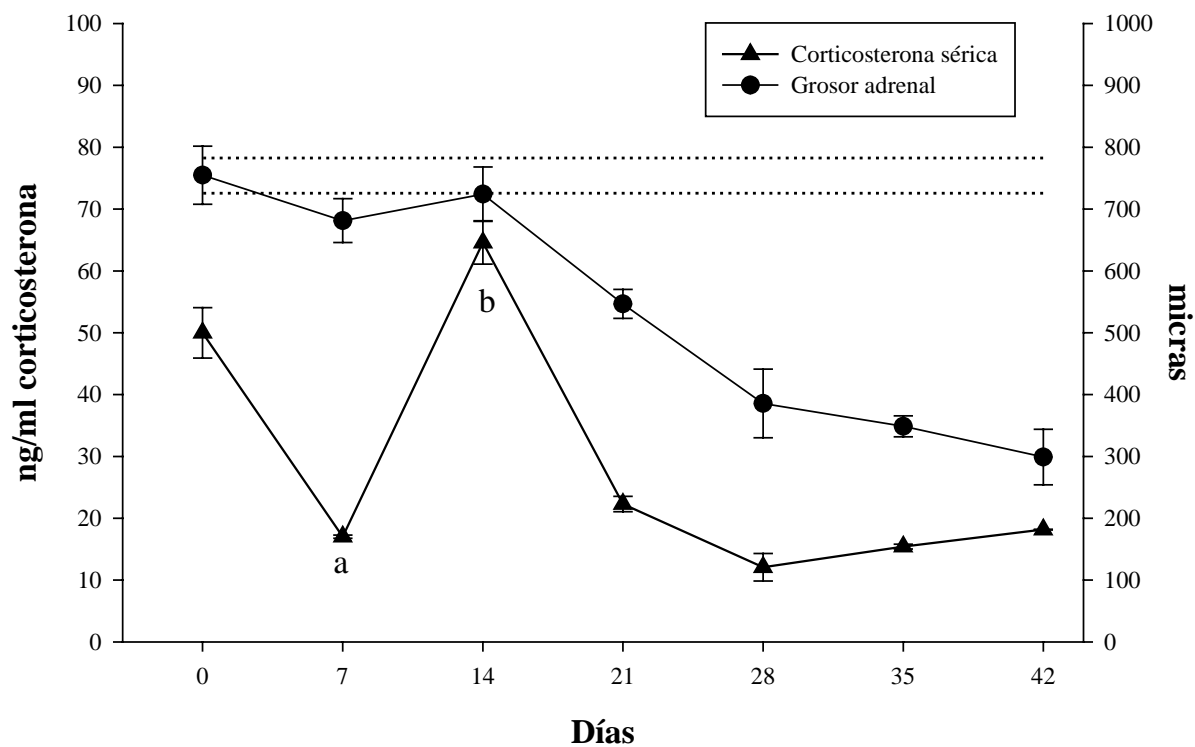
En la gráfica 2 se presenta el peso de las glándulas adrenales (mg) de los grupos RM + HC, HC y RM. El ANOVA de dos vías mostró que el peso de las adrenales fue modificado por el tratamiento ($F_{2,95} = 330.78$, $p < 0.001$), por el tiempo de exposición al tratamiento ($F_{5,95} = 7.09$, $p < 0.001$) y por la interacción de ambos factores ($F_{10,95} = 8.19$, $p < 0.001$). El tratamiento que más afectó el peso de las glándulas adrenales fue la combinación ($p < 0.001$ *versus* los otros grupos), seguido por el tratamiento con HC, y por la RM. Observamos que el grupo al cual se le aplicó ambos factores presenta una disminución gradual del peso de las adrenales conforme avanza el tiempo del tratamiento, destacando que el efecto se observa a partir del día 21 ($p < 0.001$). En los grupos restantes el peso de las glándulas adrenales se mantuvo a lo largo del tiempo.



Gráfica 2. Cambio en el peso de las glándulas adrenales de los animales con diferentes tratamientos. Los resultados son expresados como la media \pm S.E.M, para los tratamientos experimentales RM + HC, RM e HC. Prueba Tukey: *** $p < 0.001$.

En la gráfica 3 se observa como el grosor de la corteza adrenal disminuye gradualmente ($F= 184.27$, $df 69$, $p<0.001$) conforme avanza el curso temporal del tratamiento con RM + HC, alcanzando la significancia estadística desde el día 21 de tratamiento. Además, el análisis estadístico mostró una relación tipo dosis-respuesta a partir del día 28 de tratamiento respecto al día 21. El día 14 de tratamiento se produjo un incremento de la corticosterona sérica, que posteriormente vuelve a los valores del día 7 de tratamiento, en concordancia con la disminución del grosor de la corteza adrenal.

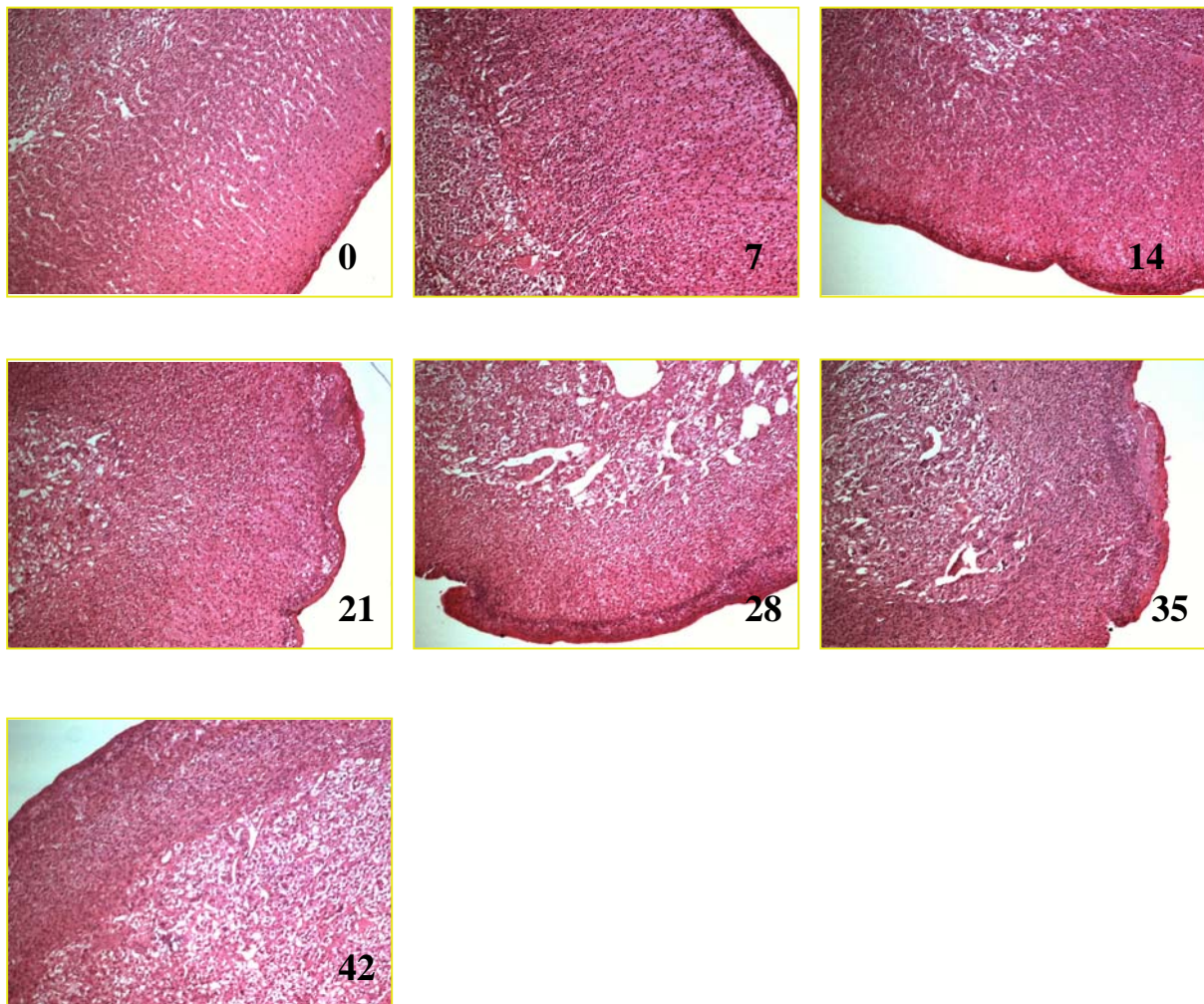
RELACIÓN GROSOR ADRENAL-CORTICOSTERONA SÉRICA



En la gráfica 3 se muestra la relación entre el grosor de la corteza adrenal (micras) y la producción de corticosterona sérica (ng/mL) en el grupo de animales con RM + HC. Los resultados están expresados como la media \pm S.E.M. de 4 ratas por tiempo de exposición al tratamiento. Se observa que conforme disminuye el grosor de la corteza adrenal hay una menor producción de corticosterona sérica. Prueba de Tukey, a $p< 0.001$ versus control, b $p< 0.01$ versus control. El índice de correlación de Pearson mostró que existe una correlación positiva entre los coeficientes de ambas variables (0.887); $p<0.05$, sólo cuando se analizaron los datos que van de los 14 días hasta los 42 días.

Debido a que los efectos más contundentes sobre la concentración de corticosterona sérica y sobre el peso de las glándulas adrenales se observó en el grupo con la combinación de tratamientos, aquí se presentan las microfotografías de la corteza adrenal a lo largo de todo el curso temporal.

En el panel 1 se ilustra el efecto de la combinación de RM + HC sobre el grosor de la corteza adrenal. Se observa que conforme transcurre el tratamiento hay un adelgazamiento de la corteza adrenal, en comparación con el grupo control, con el máximo adelgazamiento al día 42 de tratamiento.

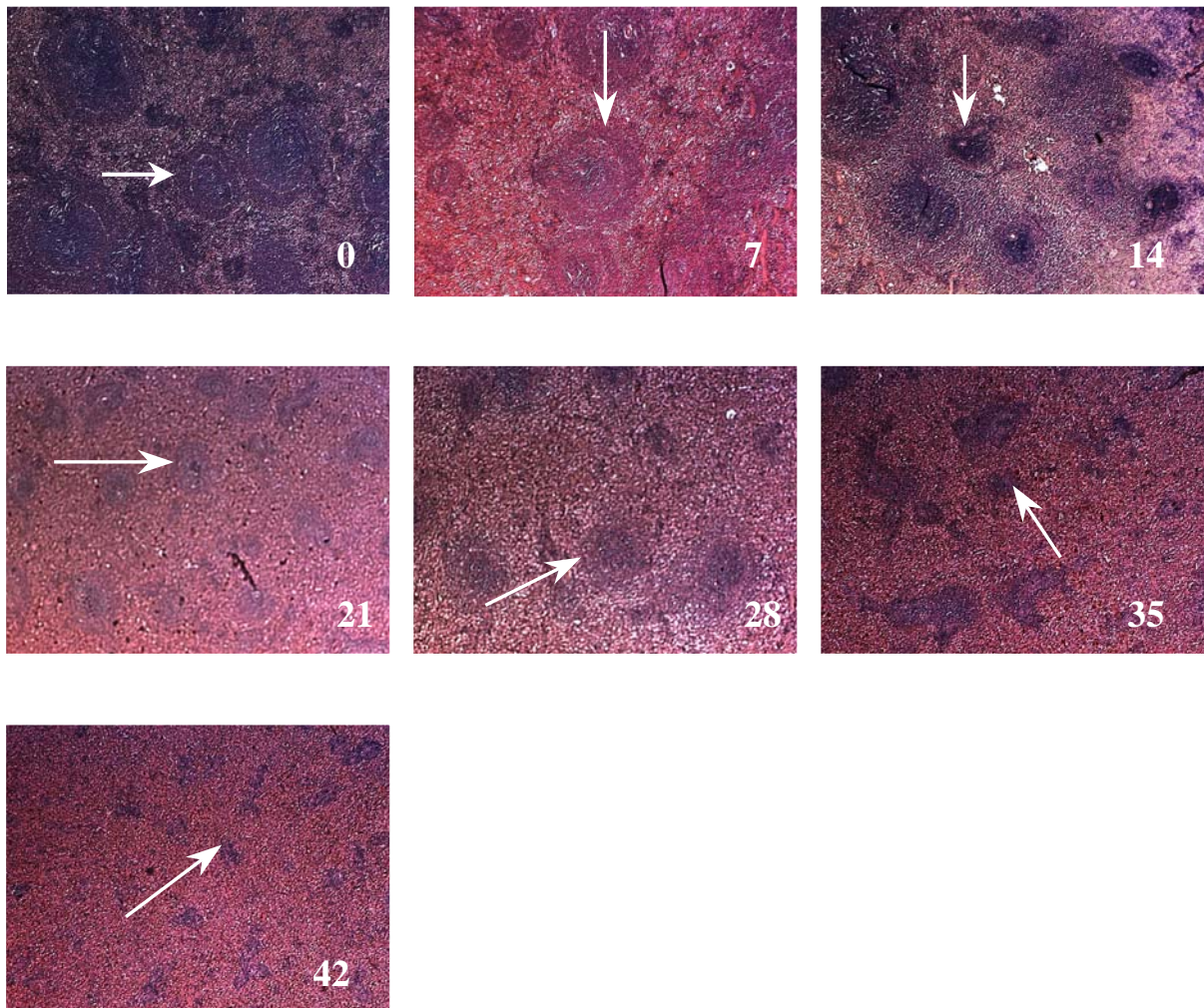


En el panel 1 se muestra el grosor de la corteza las glándulas adrenales del grupo control (0) y animales con RM + HC, 7 días; 14 días; 21 días; 28 días; 35 días y 42 días. (fotografía a 10x, aumento real 100x) .

Formación de folículos secundarios en el bazo

Se encontró que el grupo RM + HC presenta un deterioro de la estructura de los folículos secundarios del bazo con respecto al control. En un animal control la presencia de los folículos es de manera definida y limitada a lo largo del tratamiento, los folículos se van modificando hasta presentar una alteración de su forma original presentándose un mayor deterioro a los 42 días, en donde ocurre una desaparición casi total de los folículos.

Formación de folículos secundarios (grupo RM + HC)

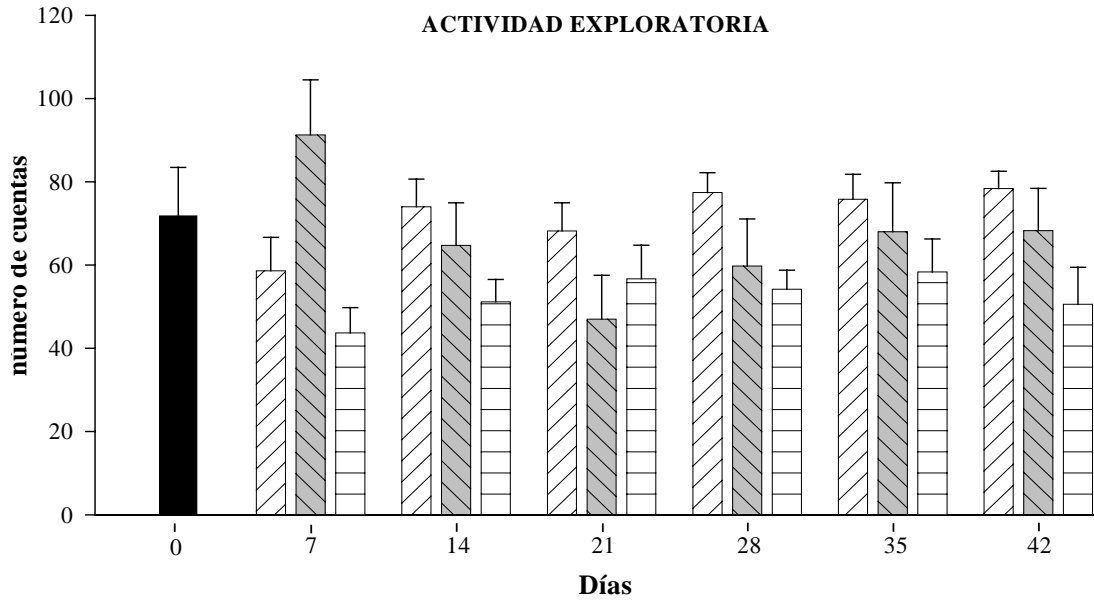
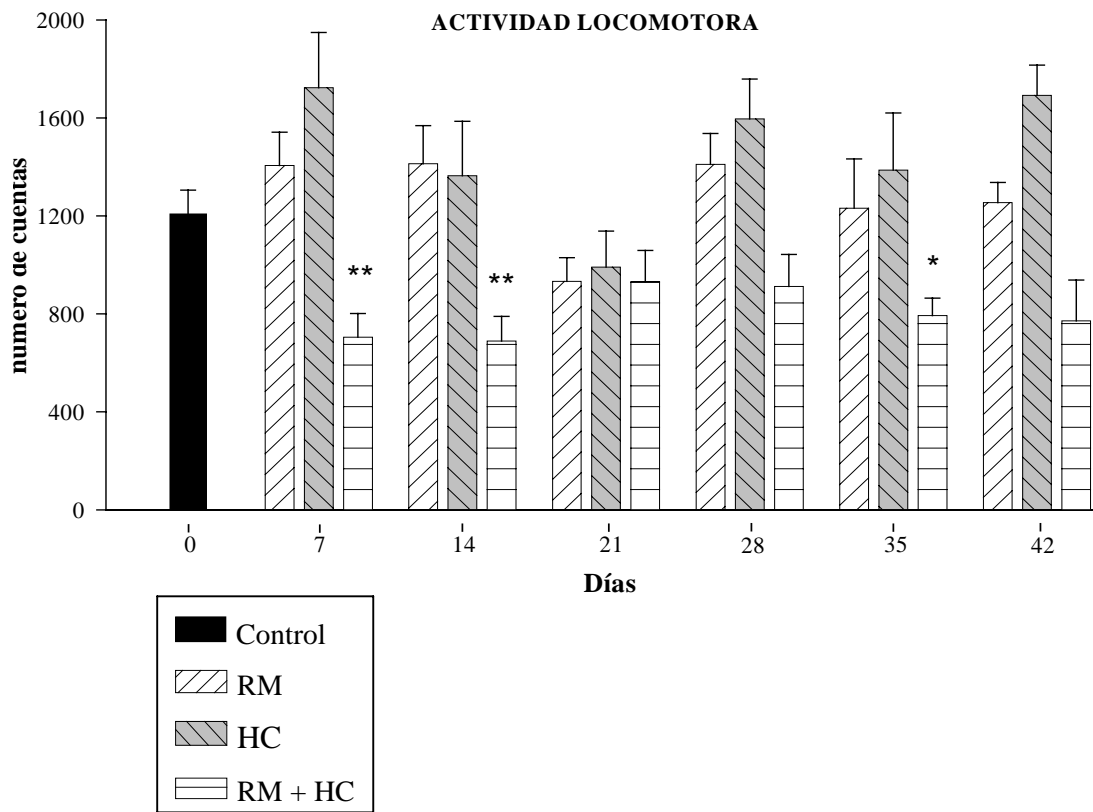


En el panel 2 se observa el deterioro que sufre la estructura de los folículos secundarios del bazo, en el grupo de RM + HC. Animal control (0), 7 días, 14 días, 21 días, 28 días, 35 días y 42 días (fotografía a 10x, aumento real 100x).

Prueba de campo abierto

En la gráfica 4 se presentan los registros de la actividad locomotora y la actividad exploratoria de los grupos RM + HC, RM, HC, y se comparan con el grupo control. El ANOVA de dos vías mostró que la actividad locomotora (movimientos horizontales) fue modificada tanto por el tratamiento ($F_{2,88} = 34.520$, $p < 0.01$) como por el tiempo de exposición a éste ($F_{5,88} = 2.402$, $p = 0.045$), pero sólo se observó una tendencia a disminuir la actividad locomotora por la interacción de ambos factores ($F_{10,88} = 1.746$, $p = 0.087$). Dado que se observaron cambios en los grupos de tratamiento, aunque no hubo interacción de factores se procedió a hacer una comparación pareada con la prueba t de Student. El tiempo de tratamiento donde se observó la menor actividad locomotora fue 21 días; posteriormente se observa que los grupos con RM o HC incrementan su actividad locomotora, no así el grupo con la combinación de tratamientos. Cabe destacar que un porcentaje de animales del grupo HC mostró un incremento en la irritabilidad (saltos, escalamiento en la caja de actividad) a partir de los 28 días de tratamiento: 1 de 4 animales en cada grupo en el curso temporal.

Por otra parte, el ANOVA de dos vías determinó que la actividad exploratoria fue modificada únicamente por el tipo de tratamiento ($F_{2,88} = 10.844$, $p < 0.01$), con un efecto significativo producido por la combinación de RM + HC ($p < 0.05$) respecto al grupo control, pero no se modificó por el tiempo de exposición ($F_{5,88} = 0.566$, $p = 0.726$). La interacción de factores produjo una reducción de la actividad ambulatoria, pero sólo se alcanzó una tendencia no significativa ($F_{10,88} = 1.871$, $p = 0.064$).



Gráfica 4. Registros de la actividad locomotora y exploratoria de los animales de los grupos experimentales RM + HC, RM e HC y el grupo control (n= 4-7 por grupo). Los resultados se expresan en la media \pm S.E.M. Prueba t: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Discusión

Los resultados del presente estudio se resumen de la siguiente manera: la aplicación de RM, HC y la combinación de estos estresores produjo en ratas WKY: 1) una disminución en el grosor de la corteza adrenal y la producción de corticosterona sérica relacionada con el tiempo de exposición al tratamiento; 2) modificaciones en la formación de folículos secundarios en el bazo, los cuales presentan alteraciones en su forma original y 3) modificó la actividad locomotora que podrían relacionarse con un deterioro en la respuesta conductual ante el estrés crónico. Las alteraciones en estos parámetros reflejan cambios deletéreos en el funcionamiento del eje HHA en ratas que se consideran un modelo genético de depresión (WKY). Estos cambios se observaron principalmente en los animales que recibieron la combinación de tratamientos (RM+HC) y siguieron un curso temporal ya que los efectos más significativos se observaron en los tiempos más prolongados de tratamiento. El tiempo umbral fue 21 días de tratamiento. Estas alteraciones indican que la aplicación de estresores crónicos en individuos susceptibles puede producir un síndrome similar al que presentan los pacientes deprimidos.

Ratas WKY

La cepa de ratas WKY es considerada como un modelo genético para el estudio de la depresión, ya que presenta algunas características que permiten la investigación de las bases neurológicas de la depresión, y que son útiles para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de esta patología. Las ratas WKY presentan características hormonales, fisiológicas y conductuales que están presentes en la sintomatología de pacientes depresivos, por ejemplo: tienen desregulado el eje HHA por lo que son hipereactivas al estrés, presentan hipolocomoción, desórdenes del sueño y disminución de las conductas sexuales (Solberg y cols., 2001; Suzuki y cols., 2001).

Las hembras de la cepa WKY son más emocionales que los machos cuando se evalúan en pruebas como el campo abierto y el nado forzado. Las diferencias también se establecen tomando en cuenta las fases del ciclo reproductivo, ya que las hembras en proestro (con mayor concentración de estrógenos) son más emocionales (Paré y Redei, 1993). El presente estudio se llevó a cabo en hembras, por lo que se presume un incremento en la vulnerabilidad al estrés. Además, se incluyó un grupo heterogéneo de hembras (tanto en la fase de proestro

como en diestro), por lo que las diferencias conductuales relacionadas a la concentración de estrógenos no son relevantes para los resultados.

Los resultados de este trabajo indican que los animales de la cepa WKY pasan de una respuesta aguda de estrés (hiperplasia adrenal y aumento en la producción de corticosterona sérica, cambios dirigidos a restaurar la homeostasis de organismo) a una respuesta de estrés crónica (hipertrofia adrenal y disminución significativa en la producción de corticosterona sérica debido al agotamiento de los mecanismos para restaurar la homeostasis) alrededor de los 21 días de tratamiento con RM+HC.

Peso de los animales y consumo de HC

La exposición al estrés causa un amplio rango de alteraciones conductuales y fisiológicas en los organismos, como cambios en la ingesta de alimentos y en el peso corporal. El consumo de alimento es una de las variables sensibles al estrés y es particularmente interesante en la investigación, no solamente debido al impacto de la alimentación en el crecimiento y la salud, sino que es una variable que puede ser medida provocando molestias mínimas en los animales. La exposición a estresores suaves y de corto plazo incrementa de forma transitoria el consumo de alimento, mientras que la exposición a estresores de cierta severidad (choques eléctricos en las extremidades, endotoxinas, varios tipos de restricción) se reduce el consumo de alimentos en horas posteriores a la exposición al estímulo estresante (Vallés y cols., 2000). En el presente estudio, los animales con RM+HC tuvieron la mayor pérdida de peso, principalmente a los 28 días de tratamiento, comparados con los dos grupos restantes (RM e HC). El grupo que sólo recibió la administración de HC también mostró una disminución gradual del peso corporal, teniendo su pérdida máxima al final del experimento. Estos cambios significativos en el peso corporal no se relacionaron a una disminución en el consumo de alimento, ya que éste no se modificó a lo largo de la exposición de estresores (datos no mostrados). Esta disminución del peso corporal podría estar relacionada con los efectos metabólicos que ejercen los glucocorticoides (corticosterona), inducidos por la exposición a una situación de estrés crónico (Marin, 2007).

Por otra parte, el grupo con RM no presentó variaciones significativas en el peso a lo largo de todo el tratamiento, lo cual contradice algunos datos bibliográficos, por ejemplo, Vallés *et al.* en 2004, encontró que la exposición a un estresor severo como la inmovilización,

provoca anorexia a largo plazo (y en consecuencia pérdida de peso corporal). Para explicar estos datos es importante puntualizar que la inmovilización es un procedimiento de estrés más severo que la RM, ya que en la inmovilización las extremidades son atadas a una montura de metal pegada a mesa de madera y los movimientos de la cabeza están restringidos con dos sujetadores de metal alrededor del cuello, por lo que el animal no puede realizar ningún tipo de movimiento. En cambio, en el estrés por RM, la rata es introducida a un contenedor que aunque limita el movimiento, permite que la rata ajuste su postura dentro del dispositivo.

El diseño del presente estudio incluyó la sustitución del agua por una solución de HC con la finalidad de provocar alteraciones en el eje HHA, y de seguir su curso temporal. En los grupos RM + HC, e HC, se encontró que el consumo de la solución aumentó en forma directamente proporcional al tiempo de exposición a dicha solución (7 a 42 días). Aunque los grupos partieron de consumos basales ligeramente diferentes, por lo que se puede sugerir que los períodos de RM a los que fueron sometidos los animales con la combinación de tratamientos no modificaron la ingesta de solución de HC.

Es posible pensar que las alteraciones del eje HHA fueron consecuencia de otros factores distintos al consumo de HC, por ejemplo, cambios en la ingesta de líquidos que podría devenir en deshidratación (también considerado un modelo de activación del eje HHA, (Jaimes-Hoy y cols., 2008), sin embargo los resultados indican que los animales consumieron la solución de HC de forma constante y proporcional con el tiempo de exposición a la solución. Además, los cambios en la concentración de corticosterona sérica permitieron detectar que el eje HHA estuvo activado a lo largo de todo el experimento.

Concentración de corticosterona sérica, peso y grosor de las glándulas adrenales

Los cambios en la concentración de corticosterona sérica, el peso de las glándulas adrenales y la disminución del grosor de la corteza adrenal indican que hubo una desregulación del eje HHA, que condujo al deterioro histológico de las glándulas adrenales. Este cambio es similar al que ocurre en un proceso de enfermedad. En un modelo de tuberculosis pulmonar en ratón, la hiperplasia adrenal ocurre entre los 14 y 21 días posteriores a la inoculación de la cepa *M. tuberculosis* y en el día 60 después de la administración, las adrenales se encuentran atrofiadas en cerca de 50% de su tamaño normal, comparado con los

ratones no infectados (Hernández-Pando y cols, 1998). La atrofia adrenal se observó en el día 21 días de tratamiento y se presentó por la combinación de RM + HC. Este resultado indica que la estrategia de utilizar una cepa de animales sensibles al estrés, más un estresor crónico junto con la administración de un glucocorticoide, acorta el período de deterioro del eje HHA. Este tipo de modelo sería útil para determinar cambios en otros sistemas asociados a la depresión en humanos, particularmente aquel tipo de depresión que se acompaña por una desregulación del sistema asociado a la respuesta de estrés. Además, los resultados del peso de las glándulas adrenales sugieren que la combinación de estresores de diferente naturaleza, por ejemplo, estresores neurogénicos (que afectan al sistema límbico y al eje HHA) como la RM, y de estresores físicos (que afectan exclusivamente al eje HHA, Anisman y Matheson, 2005), como la ingesta de solución de HC (presente estudio) o la inoculación de *M. tuberculosis* (Hernández-Pando y cols., 1998), sinergizan para promover cambios más significativos en los parámetros que denotan desregulación del eje HHA.

El mecanismo que condujo a la desregulación del eje HHA por estresores como RM + HC podría ser explicado de la siguiente manera: la activación del eje HHA se presentó seguida de la aplicación de un estímulo estresante, lo que conlleva la liberación de concentraciones elevadas de glucocorticoides por parte de la corteza de las glándulas adrenales; así mismo, esta elevada concentración activa un mecanismo de retroalimentación negativa, que regresa al eje HHA a la normalidad. La medición de corticosterona sérica fue utilizada para determinar el grado de funcionalidad/deterioro de las glándulas adrenales en respuesta a la exposición crónica al estrés y al consumo de HC. Observamos que la concentración de corticosterona sérica en el grupo de RM + HC, presentó un aumento significativo entre los 7-14 días de tratamiento; esta respuesta asociada a una hiperplasia adrenal se considera parte de la adaptación al estrés (sobrecarga alostática) y refleja el esfuerzo del organismo por mantener la homeostasis. A partir del día 21 de tratamiento, los niveles de corticosterona sérica disminuyeron significativamente y se mantuvieron en la misma concentración hasta el final del tratamiento (42 días), lo cual se asoció a la hipertrofia de la corteza adrenal encontrada en estos animales. Estos resultados son comparables a los encontrados por otros autores que usaron estresores intensos y encontraron bajos niveles de corticosterona asociados a una disminución del peso de las glándulas adrenales y de la corteza adrenal (Hernández-Pando y cols., 1998; Armario, 2006).

Referente a la hiperplasia observada alrededor del día 21, Armario (2006) observó que los niveles séricos de corticosterona bajo situaciones altamente estresantes, como es la RM, propicia que las glándulas adrenales se encuentren sumamente activas, encontrando que el peso adrenal está estrechamente relacionado con la alta actividad de las glándulas, lo que sugiere que la elevada secreción de hormonas adrenocorticales se ve reflejada en un incremento de la masa adrenal. Este incremento es debido a que las células adrenales han aumentado en número, lo que provoca una mayor secreción de hormonas dirigido a reestablecer el circuito de retroalimentación negativa dañado por la situación de estrés intenso (Armario, 2006).

Alteraciones inmunológicas en animales con estrés crónico

El sistema inmunológico es particularmente sensible al estrés, y sus efectos específicos han sido ampliamente estudiados, por ejemplo varios estudios se han enfocado en el posible aumento de citocinas en pacientes deprimidos (Dunn y cols., 2005). El estrés agudo generalmente produce efectos positivos (activación inmune), mientras que el estrés crónico típicamente provoca inmunosupresión y esta asociado a diversas patologías, entre las que se encuentran las enfermedades autoinmunes. La respuesta neuroendocrina se inicia rápidamente cuando el CRH estimula la liberación de ACTH desde la hipófisis y finaliza con la liberación de glucocorticoides adrenales. Las bajas concentraciones de glucocorticoides estimulan la producción de citocinas pro-inflamatorias, mientras que la elevada concentración de estos esteroides tiene efectos inmunosupresivos (Schiepers y cols., 2005). La activación crónica de las vías de respuesta al estrés puede causar numerosas patologías. Diversos desórdenes psiquiátricos, como la anorexia, la depresión mayor y pánico-ansiedad han sido asociados con la sobreproducción de CRH y a la desregulación del eje HHA (Jurueña y cols., 2004), de forma interesante, algunos de estos trastornos se acompañan de la desregulación de la respuesta inmune (Dunn y cols., 2005; Gerpe y Méndez, 2001).

Stenzel-Poore et al., en 1992, desarrollaron un modelo de ratón transgénico de estrés crónico, en el cual la CRH se encuentra sobreexpresada en el sistema nervioso central, por lo que estos roedores presentan altos niveles de corticosterona. Estos ratones presentan severas perturbaciones en las poblaciones de leucocitos, con una disminución significativa en la población de células B asociada a la alteración de los centros germinales, los cuales se encargan de proporcionar el ambiente propicio para la proliferación de este tipo de células. La

conclusión de los autores es que la elevada producción de corticosterona lleva a una marcada inhibición en la formación de centros germinales. En consistencia, otros estudios indican que la administración de glucocorticoides sintéticos puede incrementar la apoptosis de linfocitos T y B en los centros germinales (Murray y cols., 2004). De forma similar a los datos de la literatura, en los grupos RM + HC, RM e HC (datos no mostrados para estos dos grupos) se observó un desarreglo en la estructura de los folículos secundarios hasta desaparecer casi por completo; este deterioro es proporcional al tiempo de exposición al tratamiento, por lo que la aplicación de factores estresantes utilizados en el presente estudio, tanto de manera conjunta como en forma individual, provoca desajustes en el sistema inmune relacionados con la formación de centros germinales y por lo tanto con la producción de células B. Los daños observados en los folículos secundarios pueden estar relacionados con los niveles de corticosterona y con la baja capacidad de las glándulas adrenales para mantener la homeostasis. Debido a que no se llevó a cabo una evaluación cuantitativa de los folículos secundarios en el bazo, no es posible concluir un efecto de suma de los tratamientos RM + HC, respecto a los tratamientos individuales; esto será objeto de investigaciones futuras.

Cambios conductuales producidos por el estrés crónico

Cuando los roedores son expuestos a un nuevo ambiente, esto representa una situación desconocida y potencialmente peligrosa. Dicha situación es estresante, particularmente bajo condiciones de alta iluminación, debido a que son animales de hábitos nocturnos y los espacios abiertos e iluminados incrementan la depredación. La conducta de los animales en una prueba de campo abierto es el resultado de la interacción del miedo generado por encontrarse ante un espacio desconocido y sin protección, y su motivación para explorarlo y encontrar una posible salida a esta situación (Gagliano y cols., 2008). Otros factores que influyen sobre la conducta en la prueba del campo abierto es la variabilidad genética, el género, la edad y el nivel de iluminación (Bouwknecth y cols., 2007). En general, las hembras de la cepa WKY mostraron hipolocomoción (1208 ± 97.18) en comparación con las hembras de la cepa Wi (1972 ± 77.65 , datos del laboratorio), lo que corresponde con lo reportado por otros autores (Paré y Redei, 1993). En los grupos experimentales a los que únicamente se les aplicó un tratamiento (RM o HC), la actividad motora se mantuvo en niveles similares o ligeramente mayores que los del grupo control y disminuyó drásticamente al día 21 de tratamiento, para posteriormente experimentar un aumento en los días siguientes (28, 35 y 42 días) regresando al valor del día 7. En contraste, los animales que recibieron la combinación

de tratamientos mostraron hipolocomoción desde el día 7 de tratamiento y esta respuesta se sostuvo hasta el día 42. De acuerdo con estos datos, la administración de los tratamientos por separado requiere tres semanas para producir cambios sobre la locomoción, en tanto que la combinación de tratamientos reduce el umbral de cambios conductuales en coincidencia con cambios incipientes en la liberación de corticosterona y el grosor de la corteza adrenal.

Para los grupos tratados de forma independiente se observó que después de 28 días de tratamiento se produjo un incremento en la irritabilidad de los animales (saltos, escalamiento por las paredes, etc.) que se detectó en el programa de registro y análisis. Esto sugiere un cambio en la respuesta locomotora al estrés que parece depender de la intensidad del estresor, ya que los grupos que recibieron la combinación de tratamientos sostienen la hipoactividad motora. De forma interesante, el peso de las glándulas adrenales en estos grupos experimentales no cambia significativamente a lo largo del experimento, excepto para el grupo HC el día 42 de tratamiento. Algunos datos de la literatura contrastan con estos resultados. Planeta (2003) observó que la RM crónica, por 14 días (1h/día), incrementa inicialmente la actividad motora ante un ambiente novedoso, sin embargo el estudio de Planeta no extiende más su curso temporal. Dubovicky y Jezova (2004) demostraron que 14 días de RM por 2 h/día no cambiaron la actividad locomotora en la prueba de campo abierto. Por otro lado, McEwen y Luine, reportaron que la aplicación de un régimen de estrés por restricción más intenso (21 días por 6 h/día) produjo la disminución de la actividad exploratoria en campo abierto (citado en Marín y cols., 2007). Tomando en cuenta esta evidencia, es probable que las variaciones en la actividad ambulatoria (aumento, disminución y aumento) en respuesta a un ambiente novedoso se deban a la intensidad del estímulo estresante, al tiempo de aplicación del estresor (tanto en horas como en días), a la cepa y sexo de los sujetos.

Por otro lado, el grupo que recibió la combinación de tratamientos mostró disminución de la actividad exploratoria (*rearings*) desde el día 7 de tratamiento respecto al control, lo que confirma la hipoactividad exploratoria consecuente a una alteración del eje HHA (Lowry y cols. 2008) en ratas WKY, un signo que presentan algunos pacientes deprimidos. Es posible que la estabilidad en la actividad exploratoria a lo largo de 42 días en el grupo RM + HC se deba a un efecto de “piso” en la prueba de campo abierto, por lo que haría falta otro tipo de evaluaciones conductuales. La adaptación se descarta ya que el diseño incluyó grupos independientes para cada tratamiento y a lo largo del curso temporal. En contraste con el

grupo de combinación de tratamientos, la actividad exploratoria no se modificó con los tratamientos aplicados de forma independiente. Los resultados obtenidos indican, por un lado, la importancia de la aplicación de ambos tratamientos (RM + HC) para observar los cambios en la exploración, y por otro, la mayor sensibilidad de la actividad locomotora *versus* la exploración para revelar los efectos de la desregulación del eje HHA.

El mecanismo que conduce a cambios en la actividad locomotora después de la aplicación de estresores crónicos intensos podría asociarse con alteraciones en la concentración de corticosterona. Marín (2007) encontró una correlación negativa entre los niveles de corticosterona y la actividad locomotora: alta actividad exploratoria está relacionada con bajos niveles de corticosterona. Estos animales, altamente activos, presentan una percepción disminuida del estímulo estresante, lo cual puede facilitar la exploración de un nuevo ambiente. La observación sugiere que la exposición crónica al estrés podría dañar los mecanismos fisiológicos que regulan los procesos relacionados a la capacidad de enfrentarse a situaciones adversas. Sin embargo, en la cepa WKY, este análisis no ha sido descrito.

Es importante discutir los datos de actividad ambulatoria considerando la cepa de los animales: los estudios previos indican que ante la aplicación de estrés agudo las ratas de la cepa Wistar-Kyoto son hipoactivas en comparación con ratas de cepas como Sprague-Dawley o Fisher (Will y cols., 2003; Jiao y cols., 2003). En el presente estudio encontramos que ante la aplicación crónica de estresores (RM o HC), las ratas WKY mostraron variaciones en la actividad ambulatoria/exploratoria relacionadas al tiempo de exposición al estrés y posiblemente a la intensidad. Es probable que estas variaciones en la actividad ambulatoria/exploratoria de las WKY estén en un rango menor que el mostrado por ratas Wi (*vide supra*), sin embargo, estos cambios conductuales bajo los efectos del estrés quedan por ser demostrados.

La hipoactividad motriz es un rasgo de los pacientes deprimidos y en el presente trabajo se encontraron resultados similares en el grupo que tuvo RM + HC. Para caracterizar aún más la conducta de la rata WKY sometida a este procedimiento, se podrían agregar otras pruebas para experimentos futuros, por ejemplo, la prueba de nado forzado con la cual podemos determinar las conductas que denotan motivación (nado y escalamiento) así como conductas que indiquen desesperanza (inmovilidad) (Porsolt y cols., 1978; Réneric y cols., 2001). Para esta prueba podrían evaluarse animales los cuales estuvieran sometidos a estrés

crónico y consumo de HC hasta los 21 días, esto debido a que la prueba de nado forzado requiere de un gran esfuerzo físico y los animales sometidos a más días de estrés presentan disminución drástica del peso corporal y cambios metabólicos que podrían interferir con el resultado en la prueba de nado forzado, es decir, podría obtenerse un *falso positivo*. De forma interesante, Paré (1994) mostró una correlación positiva entre la hipoactividad de ratas WKY en la prueba de campo abierto, con la desesperanza en la prueba de nado forzado (un modelo propuesto para evaluar depresión en roedores), y en el modelo de desesperanza aprendida, sugiriendo que la incrementada vulnerabilidad al estrés que presentan las ratas WKY se asocia a un aumento en las conductas relacionadas a la depresión y la ansiedad. Por lo que resultaría interesante hacer una correlación entre estas conductas en ratas WKY sometidas a estrés crónico.

Es posible que el procedimiento empleado y los parámetros indicadores de disfunción del eje HHA puedan conducir a un modelo animal de depresión. Al igual que otros modelos éste podría ser útil para el estudio de las bases neurobiológicas del trastorno así como para la evaluación de terapias antidepresivas en individuos con estas características. En el desarrollo de este trabajo, se incluyeron principalmente dos criterios de validez: el de apariencia y de constructo. Para realizar la propuesta de un modelo sería necesario cumplir con el criterio de validez predictiva, utilizando fármacos con actividad antidepresiva para determinar qué aspectos de los medidos en este trabajo pueden ser revertidos o mejorados.

Conclusión

Los resultados del presente estudio confirman que el estrés crónico, inescapable, de alta intensidad, junto con el consumo de una solución de hidrocortisona, produce en las ratas WKY cambios conductuales, neuroendocrinos (en la actividad del eje HHA) e inmunológicos similares a los de los pacientes deprimidos.

BIBLIOGRAFÍA:

- ❖ Anisman H, Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 29: 525-546.
- ❖ Armario A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2006; 5(5): 485-501.
- ❖ Bao AM, Meynen G, Swaab DF. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Reviews* 2007.
- ❖ Bouwknecht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors; relationships to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull.* 2007; 72(1): 32-43.
- ❖ Caraveo-Anduaga J, Colmenares E, Saldívar G. Estudio clínico-epidemiológico de los trastornos afectivos. *Salud mental.* 1999. Vol. 22, N° 2: 7-17.
- ❖ Castrén E, Voikar V, Rantamaki T. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol.* 2007, 7:18-21.
- ❖ Charney D. Psychobiological mechanism of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. *Am J Psychiatry.* 2004; 161: 195-216.
- ❖ Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med.* 1998; 129(3): 229-40.
- ❖ Chrousos GP. Organization and integration of the endocrine system. *Sleep Med Clin.* 2007; 2(2): 125-45.
- ❖ Chrousos GP. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye memorial lecture. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; (6) 30; 851:311-35.
- ❖ Davis K, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C. *Neuropsychopharmacology. The fifth generation of progress.* 2002. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, PA, USA.
- ❖ de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Volume 6, June: 463-72.

- ❖ De La Garza R II, Mahoney JJ III. A distinct neurochemical profile in WKY rats at baseline in response to acute stress: implications for animal models of anxiety and depression. *Brain Res.* 2004; 1021(2): 209-18.
- ❖ DSM-IV-R. Manual de diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. 1998. American Psychiatric Association.
- ❖ Duman SR, Monteggia ML. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, 2006; 59:1116-27.
- ❖ Dunn JA, Swiergiel HA, de Beaurepaire R. Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 29: 891-909.
- ❖ Durand M, Morméde P, Chaouloff F. Wistar-Kyoto rats are sensitive to the hypolocomotor and anxiogenic effects of mCPP. *Behav Pharmacol.* 2003; 14(2): 173-7.
- ❖ Fernández-Guasti A, Picazo O. Flumazenil blocks the anxiolytic action of allopregnanolone. *Eur J Pharmacol.* 1995; 281 (1): 113-5.
- ❖ Ferreira NA, Becerril CN, Velásquez MJ. La línea de ratas Flinders: un modelo animal de depresión. *Salud Mental.* 1997 V.20 No.1 marzo.
- ❖ Gagliano H, Fuentes S, Nadal R, Armario A. Previous exposure to immobilisation and repeated exposure to a novel environment demonstrate a marked dissociation between behavioral and pituitary-adrenal responses. *Behav Brain Res.* 2008; 187: 239-45.
- ❖ Gerpe LD, Méndez MR. Alterations induced by chronic stress in lymphocyte subsets of blood and primary and secondary immune organs of mice. *BMC Immunology.* 2001; 2:7.
- ❖ Henn FA, Vollmayr B. Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neurosci and Biobehav Rev.* 2005; 29: 799-804.
- ❖ Hernández-Pando R, De la Luz Streber M, Orozco H, Arriaga K, Pavón L, Al-Nakhli SA, Rook GA. The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice. *Immunology.* 1998; 95 (2): 234-41.
- ❖ Hernández-Pando R, De la Luz Streber M, Orozco H, Arriaga K, Pavón L, Marti O, Lightman SL, Rook GA. Emergent immunoregulatory properties of combined glucocorticoid and anti-glucocorticoid steroids in a model of tuberculosis. *QJM.* 1998; 91 (11): 755-66.

- ❖ Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, de Gortari P. Differential response of TRHergic neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure. *Horm Behav.* 2008; 53 (2): 366-77.
- ❖ Jiao X, Paré WP, Tejani-Butt S. Strain differences in the distribution of dopamine transporter sites in rat brain. *Prog. Neuro-Psychopharmacol Biol Psych.* 2003; 27: 913-19.
- ❖ Joels M, Karts H, Alfarez D, Heine VM, Qin Y, van Riel E, Verkuylm M, Luchasen PJ, Kruger HJ. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress* December 2004 Vol. 7(4), 221-31.
- ❖ Juruena MF, Cleare AJ, Pariante CM. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depresión. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004; 26(3): 189-201.
- ❖ Launfumey L, Mongeau R, Cohen-Salmon C, Hamon M. Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanism of stress-related disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008. 32(6): 1174-84.
- ❖ Lowry CA, Hale MW, Plant A, Windle RJ, Shanks N, Word SA, Ingram CD, Renner KJ, Lightman SL, Summers CH. Fluoxetine inhibits corticotropin-release factor (CRH)-induced behavioural response in rats. *Stress.* 2008 Oct 24:1.
- ❖ Marin MT, Cruz CF, Planeta CS. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weigth in rats. *Physiol Behav.* 2007; 90: 29-25.
- ❖ Murray SE, Rosenzweig HL, Jhonson M, Huising MO, Sawicki K, Stenzel-Poore MP. Overproduction of corticotrophin-releasing hormone blocks germinal center formation: role of corticosterone and impaired follicular dendritic cell networks. *J Neuroimmunol.* 2004 Nov; 156(1-2): 31-41.
- ❖ Nemeroff CB. The neurobiology of depression. *Sci Am.* 1998; 278 (6): 42-9.
- ❖ Pacák K, Palkovists M. Stressor specificity of Central Neuroendocrinal response: Implications for Stress-Related disorders. *Endocr. Reviews.* 2001; 22 (4): 502-548.
- ❖ Pardon MC, Ma S, Morilak DA. Chronic cold stress sensitizes brain noradrenergic reactivity and noradrenergic facilitation of the HPA stress response in Wistar Kyoto rats. *Brain Res.* 2003; 971(1): 55-65.
- ❖ Paré WP. Open field, learned helplessness, conditioned defensive burying, and forced-swim tests in WKY rats. *Pshysiol Behav.* 1994; 55 (3): 433-9.

- ❖ Paré WP, Redei E. Depressive behavior and stress ulcer in Wistar Kyoto rats. *J Physiology*. 1993; 87: 229-38.
- ❖ Paré WP, Redei E. Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol Behav*. 1993; 54 (6): 1179-85.
- ❖ Porsolt RG, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 1978; 47(4): 379-391.
- ❖ Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003; 463: 3-33
- ❖ Randall D, Burggren W, French K. *Animal physiology. Mechanism and adaptations*. 2002.
- ❖ Réneric JP, Bouvard M, Stinus L. Idazoxan and 8-OH-DPAT modify the behavioral effects induced by either NA, or 5-HT, or dual NA/5-HT reuptake inhibitor in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 24 (4):379-390.
- ❖ Sapolsky RM, Romero LM, Munck UA. How do glucocorticoids influence stress response? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endo Rev*. 2000; 21 (1): 55-89.
- ❖ Schiepers OJG, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005; 29:201-217.
- ❖ Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, Miller AH. Immune modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol*. 2005; 18(1): 41-78.
- ❖ Simmons DA, Broderick PA. Cytokines, stressors, and clinical depression: augmented adaptation responses underlie depression pathogenesis. *Neuro-Psycho and Biol Psy*. 2005; 29: 793-807.
- ❖ Solberg LC, Olson SL, Turek FW, Redei E. Altered hormone levels and circadian rhythm of activity in the WKY rat, a putative animal model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281(3): R786-94.
- ❖ Sutçigil L, Oktenli C, Musabak U, Bozkurt A, Cansever A, Uzun O, Sanisoglu SY, Yelisova Z, Ozmenler N, Ozsahin A, Sengul A. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy. *Clin Develop Immunology*. 2007; article ID 76396.
- ❖ Suzuki S, Solberg LC, Redei EE, Handa RJ. Prepro-thyrotropin releasing hormone 178-199 immunoreactivity is altered hypothalamus of the Wistar-Kyoto strain of rat. *Brain Res*. 2001; 913: 224-233.

- ❖ Swabb DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Reviews*. 2005; 4: 141-94.
- ❖ Tafet EG, Bernardini R. Psychoneuroendocrinal links chronic stress and depression. *Neuro-Psychopharmacol Biol Psych*. 2003; 27: 893-903.
- ❖ Tsustsumi T, Fujiki M, Akiyoshi J, Horinouch Y, Isogawa K, Hori S, Nagayama H. Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on forced swimming tests. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat*. 2002; 26: 107-111.
- ❖ Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 291 (5): E965-73.
- ❖ Vaidya VA, Marek GJ, Aghajanian GK, Duman RS. 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J Neurosci*. 1997. 17 (8): 2785-95
- ❖ Vallés A, Martí C, García A, Armario A. Single exposure to stress causes long-lasting, stress-dependent reduction on food intake in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 279 (3): R1138-44.
- ❖ van Praag HM. Can stress cause depression?. *Neuro-Psychopharmacol Biol Psych*. 2004 ; 28 : 891-907.
- ❖ Will CC, Aird F, Redei EE. Selectively bred Wistar-Kyoto rats: an animal model of depression and hyper-responsiveness to antidepressants. *Mol Psych*. 2003; 8: 925-32.
- ❖ Willner P, Mitchell P.J. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol*. 2002; 13:169-188.
- ❖ Young EA. Sex differences in response to exogenous corticosterone: a rat model of hypercortisolemia. *Mol Psychiatry*. 1996; 1(4): 313-9.
- ❖ Zafar HM, Paré WP, Tejani-Butt SM. Effect of acute or repeated stress on behavior and brain norepinephrine system in Wistar-Kyoto (WKY) rats. *Brain Res Bull*. 1997; 44 (3): 289-95.

APÉNDICE I

Obtención de glándulas adrenales y el bazo:

Habiendo transcurrido los diferentes tiempos del procedimiento experimental (7, 14, 21, 28, 35 ó 42 días), las ratas fueron sacrificadas por decapitación mediante una guillotina. Posterior a la decapitación las glándulas adrenales y bazo fueron retirados, y se fijaron inmediatamente en tubos con etanol absoluto para su posterior análisis histológico.

Inclusión en parafina de las glándulas adrenales y el bazo:

Dichas estructuras que fueron anteriormente fijadas en etanol absoluto fueron incluidas en parafina de la siguiente manera:

- Las muestras se colocaron en un casete para inclusión en parafina.
- Se sumergieron en alcohol absoluto por el transcurso de 1 hr.
- Se sumergieron en Xilol I por el transcurso de 1 hr.
- Se sumergieron en Xilol II por el transcurso de 1 hr.
- Se sumergieron en parafina I durante 1 hr.
- Se sumergieron en parafina II durante 1 hr.
- Se sumergieron en parafina III durante 1 hr.
- Las muestras se incluyeron en bloques de parafina.

Posteriormente se realizaron los cortes histológicos.

Preparación de los portaobjetos para los cortes:

Los portaobjetos se desengrasaron con alcohol al 70% y fueron sumergidos en una solución de silano al 2% en acetona a 4°C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo se secaron a 37°C durante toda la noche.

Cortes de tejidos incluidos en parafina:

Una vez incluidos en parafina, los tejidos se cortaron en un microtomo para obtener cortes de 5 μ de grosor, los cuales se tiñeron mediante la técnica de hematoxilina-eosina (H-E).

Desparafinación:

Las laminillas se incubaron a 60°C durante 10 min.

- Se sumergieron en Xilol I durante 5 min.
- Se sumergieron en Xilol II durante 5 min.
- Se sumergieron en alcohol absoluto-xilol (50-50 v-v) durante 1 min.
- Se sumergieron en alcohol absoluto durante 1 min.
- Se sumergieron en alcohol 96° durante 1min.
- Se sumergieron en alcohol 70° durante 1 min.
- Se lavaron con agua corriente.

Tinción hematoxilina-eosina (H-E):

- Se cubrió el corte con hematoxilina durante 4 min.
- Se lavo con agua corriente.
- Se elimino el exceso de colorante con alcohol-ácido al 1% (2 baños).
- Se lavó con agua corriente.
- Se viró el color de la hematoxilina con carbonato de litio durante 1 min.
- Se lavó con agua corriente.
- Se eliminó el exceso de colorante con alcohol 96°.
- Se cubrió el corte con eosina durante 30 segundos.
- Se sumergió el corte con alcohol 96°.
- Se sumergió el corte con alcohol absoluto.
- Se sumergió el corte con alcohol absoluto-xilol.
- Se sumergió el corte en xilol (2 baños).

La preparación se montó con resina sintética entre porta y cubreobjetos.

APÉNDICE II

Determinación por RIA de las concentraciones de corticosterona sérica.

Las concentraciones totales de corticosterona sérica fueron medidas mediante un kit comercial de radioinmunoensayo (Coat-A-Count Rat Corticosterone, Diagnostic Product Corporation). El procedimiento de medición de corticosterona en rata por conteo de membrana es un radioinmunoensayo en fase sólida, en el cuál la corticosterona de rata se encuentra marcada con ^{125}I y compite por un tiempo fijo determinado con corticosterona en la muestra por los sitios para (del) el anticuerpo. Debido a que el anticuerpo se encuentra inmóvil en la pared del tubo de polipropileno, la decantación simple del sobrenadante es suficiente para finalizar con el proceso de competición y para aislar la fracción unida al anticuerpo de la corticosterona marcada radiactivamente. El conteo del tubo se realiza en un contador gamma que produce un número, el cual es convertido por medio de una curva de calibración en la medida de corticosterona presente en la muestra. La detección límite (o mínima dosis detectable) de un análisis, es aproximadamente de 5.7 ng/ml.

APÉNDICE III

Preparación de solución de hidrocortisona

La solución de HC se administro a una concentración de 50 mg/kg. Por cada 1000 ml de solución a prepararse se agregaron 27.77 mg de HC, pesados en una báscula analítica. La HC se disolvió en etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Ger.) a un 2.2% de volumen total de agua purificada. El peso requerido de HC de acuerdo a la cantidad a prepararse, se colocó en tubos Falcon para posteriormente añadir el etanol lentamente con una pipeta; para lograr que la HC se disolviera completamente en el alcohol, se utilizó un vortex Thermolyne. Ya preparada la solución totalmente homogenizada, se agregó al volumen requerido de agua purificada en un vaso de precipitado colocado en un agitador magnético y la solución HC-etanol se añadió en pequeñas cantidades, hasta quedar totalmente disuelta.