



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DEL ESTRÉS EN LA ETAPA POST-NATAL SOBRE EL EJE ADRENAL
Y LA VIA CRHÉRGICA DEL SISTEMA LÍMBICO Y SU RELACIÓN CON LAS
CONDUCTAS ALIMENTARIA Y DEPRESIVA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
VIRIDIANA ALCÁNTARA ALONSO**

**TUTOR PRINCIPAL Dra. Patricia de Gortari Gallardo
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Lourdes Massieu Trigo INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
Dr. Iván Velasco Velázquez INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F. Abril, 2013



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.



**A LOS MIEMBROS DE
JURADO DE EXAMEN**

Por medio del presente manifiesto que he revisado el texto que será sometido a su consideración del(a) alumno (a) de Maestría en Ciencias Bioquímicas **LDyN. VIRIDIANA ALCÁNTARA ALONSO**, titulado:

"Efecto del estrés en la etapa post-natal en la vía de CRH que dirige al eje adrenal y del sistema límbico y su relación con la conducta alimentaria y depresiva"

ATENTAMENTE

Patricia de Gortari
DRA. PATRICIA DE GORTARI GALLARDO'
Tutor Académico



mdcbq@posgrado.unam.mx

Of. No. PMDCB/067/2013

LDyN. VIRIDIANA ALCÁNTARA ALONSO
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 14 de Enero del presente año, conocieron su solicitud de ASIGNACIÓN de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA), con la tesis titulada "Efecto del estrés en la etapa post-natal en la vía de CRH que dirige al eje adrenal y del sistema límbico y su relación con la conducta alimentaria y depresiva", dirigida por la Dra. Patricia de Gortari Gallardo.

De su análisis se acordó ratificar al jurado asignado:

PRESIDENTE	Dr. Julio Morán Andrade
VOCAL	Dr. Federico Bermúdez Rattoni
VOCAL	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
VOCAL	Dra. Angélica Zepeda Rivera
SECRETARIO	Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de Enero de 2013.
EL COORDINADOR


DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

C.c.p. Archivo

RCO*lgg



mdcbq@posgrado.unam.mx

Of. No. PMDCBQ/320/2013

LDyN. VIRIDIANA ALCÁNTARA ALONSO
Alumna de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

En base a su oficio enviado para la solicitud de cambio de integrantes de jurado de examen, el Subcomité Académico en la sesión ordinaria del día 8 de Abril del presente acordó:

“Aceptar el cambio de sinodal sustituyendo al Dr. Julio Morán Andrade (P) por el Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre (P)”

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de Abril de 2013.
LA COORDINADORA DE ENTIDAD


DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

C.c.p. Archivo

MILV*igg



mdbcq@posgrado.unam.mx

ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervioso Central
NPV	Núcleo Paraventricular Hipotalámico
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
ACTH	Corticotropina, Hormona adrenocorticotrópica
GC	Glucocorticoides
GR	Receptor a glucocorticoides
HPA	Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal
CeA	Núcleo central de la amígdala
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BNST	Núcleos basales de la <i>stria terminalis</i>
GABA	Ácido γ aminobutírico
CRH-R1	Receptor tipo 1 de la hormona liberadora de corticotropina
CRH-R2	Receptor tipo 2 de la hormona liberadora de corticotropina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
HVM	Hipotálamo ventromedial
UCN	Urocortina
i.c.v.	Intra-cerebro ventricular
SM	Separación materna
ML	Material limitado
CREB	Elemento de respuesta a AMPc

INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	2
	2.1. Regiones involucradas en la respuesta al estrés.....	3
	2.2. Receptores a la hormona liberadora de corticotropina.....	6
	2.3. Estrés crónico.....	9
	2.4. Estrés en la etapa post-natal.....	11
	2.5. Relación estrés post-natal y depresión.....	14
3.	JUSTIFICACIÓN.....	15
4.	HIPÓTESIS.....	16
5.	OBJETIVOS.....	16
6.	MÉTODOS.....	17
	6.1. Procedimiento experimental.....	17
	6.2. Prueba de nado forzado.....	19
	6.3. Concentración de corticosterona y vasopresina séricas.....	20
	6.4. Disección del cerebro.....	21
	6.5. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	21
	6.6. Análisis estadístico.....	25
7.	RESULTADOS.....	26
	7.1. Madres.....	26
	7.2. Crías al destete.....	29
	7.3. Adultos.....	33
8.	DISCUSIÓN.....	40
	8.1. Madres.....	40
	8.2. Crías al destete.....	42
	8.3. Adulterez.....	47
9.	CONCLUSIONES.....	55
10.	PERSPECTIVAS.....	55
11.	REFERENCIAS.....	55

FIGURA 1. Funcionamiento del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal.....	5
FIGURA 2. Distribución de los receptores de CRH y glucocorticoides en el tejido cerebral.....	7
FIGURA 3. Optimización de ciclos para PCR.....	24
GRÁFICAS 1 y 2	26
GRÁFICAS 3 y 4.....	27
GRÁFICAS 5 y 6.....	28
GRÁFICAS 7– 9.....	29
GRÁFICAS 10 y 11.....	30
GRÁFICAS 12 y 13.....	31
GRÁFICAS 14 –17.....	33
GRÁFICA 18.....	34
GRÁFICAS 19 y 20.....	35
GRÁFICA 21	36
GRÁFICA 22.....	37
GRÁFICA 23.....	38
TABLA 1. Resumen de resultados al destete.....	32
TABLA 2. Resumen de resultados de animales adultos.....	39

Efecto del estrés en la etapa post-natal sobre el eje adrenal y la vía CRHérgica del sistema límbico y su relación con las conductas alimentaria y depresiva.

RESUMEN

La hormona liberadora de corticotropina (CRH) actúa por medio de sus receptores CRH-R1 y CRH-R2 en la regulación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) y de las conductas alimentaria, ansiosa y depresiva.

La activación del eje HPA de manera crónica modifica la actividad de la vía CRHérgica y cuándo se aplica estrés en el periodo post-natal temprano, dichas alteraciones permanecen hasta la adultez.

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la conducta tipo depresiva y los cambios en la expresión génica de la CRH, sus receptores y el de glucocorticoides, en el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) y en las regiones del sistema límbico: amígdala e hipocampo al someter ratas macho a 2 modelos de estrés post-natal, uno por ausencia de la madre (separación materna [SM]) y otro con presencia de una madre negligente (material limitado [ML]).

Los resultados demuestran que aunque el consumo de alimento aumentó en los animales adultos sujetos a ambos modelos (SM y ML), esta conducta se asoció al incremento en la expresión génica del CRH-R2 en el NPV de los animales con SM y a la inhibición de la síntesis de la CRH en la amígdala de los animales con ML. Por otro lado, las alteraciones en el funcionamiento del eje adrenal fueron diferenciales dependiendo del tipo de estrés aplicado, siendo más severo el de SM porque inhibió la respuesta de los animales adultos ante un nuevo estímulo estresante, incrementando la expresión de GR en el NPV y provocando conducta depresiva.

Por el contrario, el estrés por ML provocó adaptaciones que le permitieron al animal tener una respuesta normal al estrés y un eje HPA normal en condiciones basales. De esta manera, podemos concluir que son más graves los efectos del estrés por SM al compararlos con los de ML sobre la regulación del eje adrenal y la conducta depresiva.

ANTECEDENTES

El estrés es una condición del organismo caracterizada por un incremento en la concentración de hormonas séricas secretadas por la glándula adrenal como resultado de la exposición a estímulos amenazantes para el individuo; es una condición compleja y un desafío para los sistemas neuroendocrinos encargados de mantener la homeostasis del organismo.

La respuesta al estrés consta de 3 fases: inicio, mantenimiento y recuperación (1), que están acopladas al fenómeno de alostasis, definido como la habilidad de regresar a la estabilidad en respuesta a un desafío, reto o situación amenazante, por medio de ajustes autonómicos y hormonales (1).

Cuando el organismo percibe alguna forma de peligro se envían señales a través de los nervios periféricos hasta las neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC) encargadas de procesar la información y estimular en la división parvocelular del Núcleo Paraventricular Hipotalámico (NPV) la síntesis de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (2) en neuronas que co-expresan vasopresina (3). La función de la CRH al ser liberada de las terminales axónicas de la eminencia media es estimular por medio de la unión a sus receptores CRH-R1 en la hipófisis anterior, la síntesis y liberación de péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC) como corticotropina (ACTH), hormona estimuladora de melanocitos α (α -MSH), β -endorfina y β -lipotropina (4).

Al ser liberada al torrente sanguíneo la ACTH se une a su receptor en las glándulas adrenales, en donde estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol, en roedores corticosterona). La cantidad secretada depende de la intensidad y duración del estímulo amenazante (5).

La elevación de la concentración sérica de glucocorticoides (GC) provocada por un estímulo agudo tiene efectos supresores en la reproducción, la alimentación y la respuesta inmune (6); incrementa la presión arterial, la frecuencia cardiaca y provoca cambios fisiológicos que promueven la movilización de reservas energéticas (7) y la re-dirección del oxígeno a los tejidos que más los demandan (1) favoreciendo así la supervivencia del individuo.

En el cerebro, los receptores a glucocorticoides (GR) se expresan primordialmente en regiones como el hipocampo, el septum lateral, la amígdala y el NPV en donde la unión del ligando provoca que el receptor se traslade al núcleo, sitio en el que actúa como regulador de la transcripción génica (8).

El funcionamiento del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) se regula a través de retroalimentación negativa por medio de la activación de los GR localizados en el NPV e hipocampo, sensibles al incremento en la concentración de los GC circulantes, mecanismo que asegura una respuesta del organismo de magnitud suficiente pero duración limitada (1) [Figura 1].

De esta manera, la activación del eje HPA promueve respuestas adaptativas que mejoran la disponibilidad de energía y la activación neuronal favoreciendo el aprendizaje, la memoria, las estrategias de escape, el estado de alerta y el análisis de riesgos (1;9).

REGIONES CEREBRALES INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS

Además del hipotálamo, algunas regiones del sistema límbico son importantes en la percepción del peligro, las más estudiadas son la amígdala y el hipocampo debido a que poseen neuronas CRHérgicas (10) cuyos axones tienen contacto directo y/o indirecto con células del NPV (11;12).

Amígdala

El hipotálamo recibe aferentes catecolaminérgicas desde el núcleo central de la amígdala (CeA) (13) por medio de la vía amígdalo-hipotalámica, que parece estar relacionada con la respuesta a estímulos somato-sensoriales (14).

Esta estructura cuenta con numerosos GR, cuya activación tiene efectos excitadores sobre el eje HPA (15); se le ha relacionado con el mantenimiento de la respuesta al estrés, pues su estimulación eléctrica provoca un aumento de la concentración de ACTH y corticosterona plasmáticos (16), mientras que su

destrucción en ratas disminuye las conductas asociadas al miedo, y su estimulación en humanos incrementa los patrones de miedo y ansiedad (17;18).

El incremento del ARNm de la CRH en el núcleo central de la amígdala observado tanto con un tratamiento crónico de corticosterona sistémica (19) como con implantes del esteroide en dicha región (20), sugiere su participación de la amígdala en la fase de mantenimiento de la respuesta al estrés.

Así mismo, el estrés por restricción de movimiento incrementa la liberación de la CRH en la amígdala (21) que puede resultar de la activación de los GR, ya que los ARNm de ambas proteínas se coexpresan en neuronas del CeA (22).

Hipocampo

El hipocampo es crucial para procesos de memoria y es vulnerable al estrés; tiene conexiones con el NPV del hipotálamo a través del tracto hipocampal-hipotálamico por medio del cual regula la secreción circádica de hormonas que controlan los ejes neuroendocrinos (23).

La unión de los GC al GR en el hipocampo suprime la excitabilidad neuronal favoreciendo la retroalimentación negativa del eje HPA (11), permitiendo el retorno a los niveles basales de hormonas séricas y por lo tanto la capacidad de dar respuesta a un nuevo estímulo estresante (9).

La respuesta al estrés agudo involucra la activación de neuronas GABAérgicas de los núcleos basales de la *stria terminalis* (BNST) a través de la liberación de glutamato del hipocampo; el consecuente aumento de la concentración extracelular de ácido γ -aminobutírico (GABA) sobre el NPV determina el tono inhibitorio de la señal derivada del hipocampo al hipotálamo (24;25). De hecho, la hipocampectomía y las lesiones en esta estructura incrementan la actividad basal del eje adrenal (11;26); en cambio, su estimulación eléctrica disminuye la concentración de GC en plasma (27) y la inyección de antagonistas a los GR en el hipocampo incrementa la secreción de la ACTH (28), factores que en conjunto indican el carácter inhibitorio de esta estructura en la activación del eje HPA [Figura 1].

FIGURA1: Funcionamiento del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal.

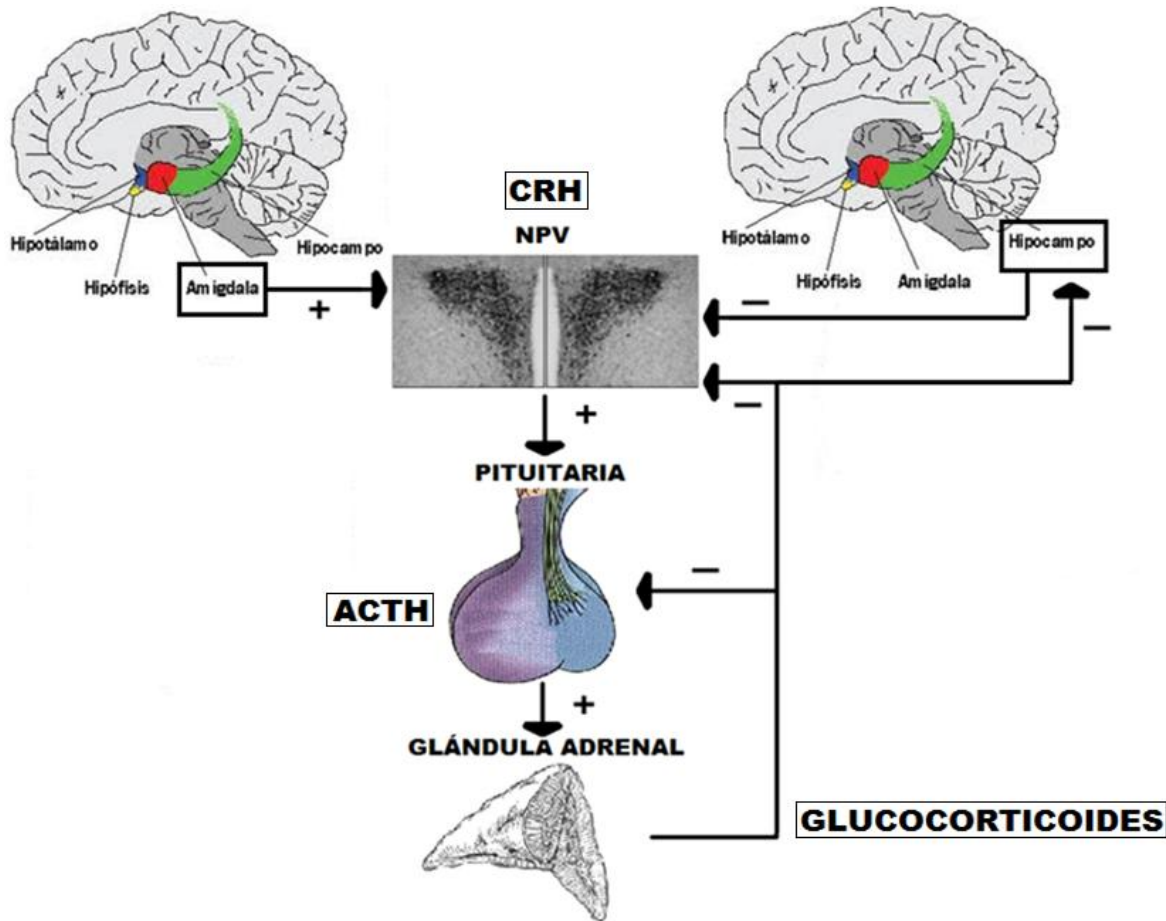


Figura 1: El eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal se regula por retroalimentación negativa de los glucocorticoides y de manera diferencial por la amígdala, que por sus inervaciones al hipotálamo se considera una región activadora y por el hipocampo considerado un inhibidor del eje adrenal (9).

La secreción de la CRH del hipocampo provocada por un evento estresante agudo parece difundir localmente para unirse a los CRH-R1 y participar en la plasticidad del hipocampo (29), en la consolidación de procesos de memoria relacionados a la situación estresante (30).

De esta manera, se establece que en la respuesta al estrés intervienen tanto acciones inmediatas, como la secreción de la CRH de regiones del sistema límbico (31) que promueven la vigilancia, el estado de alerta y la evaluación de la situación (32); además de acciones que requieren más tiempo, por ejemplo, los

cambios en el funcionamiento celular y la expresión génica por medio de la unión de los GC a los GR (9).

RECEPTORES A LA HORMONA LIBERADORA DE CORTICOTROPINA

Los efectos de la CRH en los patrones neuronales de disparo, la expresión génica y el comportamiento, son regulados por la unión a 2 clases de receptores de una manera dosis dependiente (33): CRH-R1 y CRH-R2 son codificados por diferentes genes, unidos a proteínas G con 7 dominios trans membranales (34). En la mayoría de los tejidos, la unión de la CRH a los CRH-R1 y CRH-R2 desencadena la activación de proteínas G_s y adenil ciclasas incrementando la concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (35). La actividad del receptor también se regula por AMPc ya que se han observado sitios de fosforilación para proteín-cinasa A (PKA), proteín-cinasa C (PKC) y caseín cinasa en las secuencias proteicas de ambos receptores (36). El receptor fosforilado presenta menor unión a la proteína G por lo que disminuye la cascada de señalización por la CRH (37).

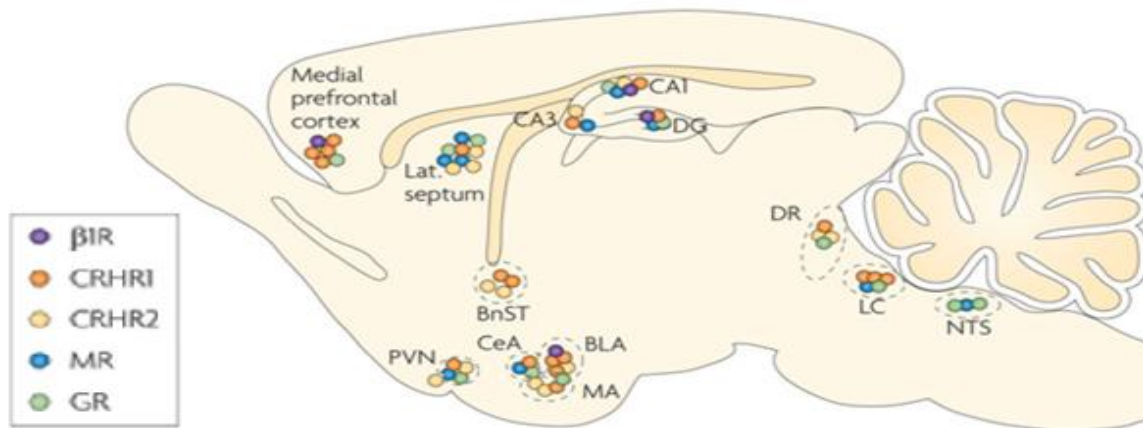
El CRH-R1 tiene mayor afinidad por el péptido que el CRH-R2 aunque los 2 comparten áreas idénticas en la secuencia de aminoácidos, en regiones cruciales para el acoplamiento con proteínas G y para la transducción de la señal (38).

El CRH-R1 está distribuido en el SNC en regiones como la corteza cerebral, cerebelo, tallo encefálico, septum e hipocampo y su expresión es muy baja en el hipotálamo (1) y en órganos periféricos (39) [Figura 2]. Debido a que predomina la expresión de CRH-R1 en la pituitaria, parece ser el encargado de la estimulación de la CRH sobre la secreción de la ACTH en los corticotropos en respuesta a un estímulo estresante (40) y de hecho, la inactivación del CRH-R1 en ratones transgénicos provoca concentraciones basales de corticosterona muy bajas sin presentar los picos diurnos normales; además, al ser sometidos a un estrés agudo presentan concentraciones séricas más bajas de ACTH y corticosterona que los controles (1;41).

En el núcleo central de la amígdala, la infusión de oligonucleótidos antisentido al CRH-R1 inhibe el efecto ansiogénico relacionado con el incremento en la expresión y liberación de la CRH en la amígdala ante el estrés provocado por la presencia de un macho dominante (42).

Del receptor tipo 2 se han demostrado 3 subtipos funcionales: CRH-R2 α , CRH-R2 β y CRH-R2 γ (43) que se encuentran distribuidos en tejidos periféricos como el corazón, el pulmón y el músculo esquelético. Algunas estructuras cerebrales como el septum lateral, el rafe dorsal, la amígdala y el hipotálamo presentan abundancia del CRH-R2 α [Figura 2] (1;39).

Figura 2 Distribución de los receptores de CRH y glucocorticoides en el tejido cerebral.



Joëls M and Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.* 2009 : 10(6): 459–466

El receptor CRH-R2 probablemente participa en la inhibición y la adaptación de la respuesta al estrés para el mantenimiento de la alostasis, lo cual es sugerido por el retardo en el retorno al nivel basal de corticosterona posterior a un evento estresante que se reporta en ratones con el gen del CRH-R2 anulado (1;41;44).

Además de su participación en la adaptación del eje al estrés, el CRH-R2 regula el efecto de la CRH en la conducta alimentaria. La inyección intra-cerebro ventricular (i.c.v.) de la hormona provoca anorexia, ya que los animales presentan reducción del consumo de alimentos y pérdida de peso (41).

El CRH-R2 se expresa en diferentes núcleos del hipotálamo, siendo su presencia predominante en el núcleo hipotalámico ventromedial (HVM) que está involucrado en la regulación del apetito (35;45). La síntesis del CRH-R2 en el HVM disminuye en ratas obesas y ayunadas con peso normal, es decir que tienen hambre y buscan alimentos; mientras que la leptina, un péptido que inhibe el consumo de alimentos, sintetizado en el tejido adiposo incrementa la expresión del receptor en este núcleo (46). El CRH-R2 también se expresa en el NPV (35) donde su función aún no está bien definida, ya que ni el ayuno, ni la administración de corticosterona o la adrenalectomía modifican su expresión (47) pero la anorexia inducida por deshidratación y no la restricción alimentaria forzada inhibe la expresión de CRH-R2 en el NPV (48) lo que le confiere al receptor de este núcleo un posible papel en la regulación de la conducta alimentaria (49).

De esta forma se postula al CRH-R1 como el encargado de la estimulación del eje HPA al estrés y del comportamiento ansiogénico provocado por la CRH; mientras que el CRH-R2 probablemente regula la adaptación al estrés y los efectos anorexigénicos de la hormona (50).

Por otra parte, las urocortinas (UCNs) son péptidos con estructura similar a la CRH cuya función en la regulación del eje HPA se ha evaluado recientemente. Aunque la UCN-1 tiene la misma afinidad por los 2 receptores; la UCN-2 y la UCN-3 se unen con preferencia al CRH-R2 (51).

La UCN-1 se sintetiza en cerebelo, hipocampo, ganglios basales, amígdala, los núcleos hipotalámicos ventromedial y paraventricular, el rafe dorsal y de manera particular en el núcleo de Edinger-Westphal (51). Tiene una homología de 43% con la CRH (52) y la afinidad de ambos receptores CRH-R1 y CRH-R2, es similar para éste péptido de 40 aminoácidos con una K_i de 0.4nM aproximadamente (51). La administración de UCN-1 a células de la pituitaria anterior *in vitro* incrementa la liberación de ACTH (53).

La UCN-2 tiene una homología de 34% con la CRH (51). Es un péptido de 38 aminoácidos que se expresa en los núcleos hipotalámicos paraventricular (con mayor expresión en neuronas magnocelulares (54)), supraóptico y arcuato; también es sintetizada en el locus coeruleus, el séptum lateral, y el núcleo medial de la amígdala (35;52). Después del estrés por inmovilidad el ARNm de la UCN-2 se incrementa en el NPV en neuronas parvocelulares donde colocaliza con 45% de las neuronas CRHérgicas (55), lo que podría indicar su participación en la regulación de la respuesta al estrés agudo, actuando a través de la activación del CRH-R2 en el NPV al que se une con mayor afinidad que la CRH (Ki de 1.7 nM vs 42 nM respectivamente)(51).

La UCN-3 también de 38 aminoácidos se sintetiza de manera predominante en el núcleo preóptico medial y el área rostral perifornical lateral al NPV del hipotálamo, así como en el núcleo medial de la amígdala (56). Su inyección i.c.v. también provoca la activación del eje HPA (56). Muchas terminales nerviosas que contienen UCN-3 se han identificado en regiones que expresan altos niveles del CRH-R2 como el séptum lateral y el HVM, por lo que se ha sugerido que la UCN-3 podría ser el ligando endógeno para el CRH-R2 en éstas áreas (35).

ESTRÉS CRÓNICO

El estrés crónico altera de forma progresiva la expresión génica del GR, la de CRH y de sus receptores en el NPV y en el hipocampo donde además, se presenta menor arborización dendrítica en neuronas piramidales, factor que modifica la tasa de disparo y la respuesta celular, por lo que se altera tanto la regulación del eje HPA como su funcionamiento (57).

Los modelos animales de estrés permiten estudiar los efectos de diferentes estímulos variando su intensidad y duración, facilitando un acercamiento a lo que ocurre en seres humanos; sin embargo, el estrés que experimenta el humano tiene una gran carga emocional y psicológica por lo que los resultados deben ser tomados con discreción ya que sólo representan una aproximación.

En animales adultos principalmente roedores, el estrés crónico provoca incremento en la concentración basal de corticosterona plasmática, alteraciones en el peso corporal, el apetito y en machos pérdida de peso testicular y menor concentración de testosterona sérica, lo que indica las consecuencias que tiene una alteración en el funcionamiento del eje adrenal sobre otros ejes neuroendocrinos (58;59). De igual forma, se presenta hipertrofia de las glándulas adrenales (considerado un indicador de estrés crónico) (2) y alteraciones metabólicas como disminución de la concentración de insulina y leptina (60).

La retroalimentación negativa del eje HPA se altera durante periodos de estrés, ya que el incremento de GC no es capaz de inhibir la síntesis y liberación de la CRH, cuyo ARNm permanece incrementado en el NPV como consecuencia de una inhibición en la expresión del ARNm del GR en regiones cerebrales como hipocampo y NPV (2).

Los ratones transgénicos que sobre-expresan CRH (CRH-Tg) al ser sometidos a estrés por inmovilidad (estrés psicológico agudo) presentan menor incremento de la concentración de la ACTH y la corticosterona comparado con la de animales control, lo que indica una respuesta atenuada del eje HPA al estrés y sugiere que la activación crónica del eje provoca la desensibilización del mismo (1).

Lo anterior también se ha observado en humanos, evaluándose la respuesta al estrés en pacientes con síndrome de Cushing, padecimiento caracterizado por un incremento crónico de GC circulantes, quienes también presentan un aumento menor de cortisol en respuesta a un nuevo estrés agudo (61). Así mismo, el estrés crónico se ha asociado al desarrollo de trastornos de la alimentación y de síndrome metabólico, trastorno conformado por resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, hipertensión arterial y obesidad (62). La exposición a largo plazo a GC provoca obesidad visceral (central) y remodelación de la composición corporal aún con pérdida de peso (60).

De igual manera la actividad de neuronas de péptidos que favorecen el consumo de alimentos como el neuropéptido Y/ péptido relacionado al agouti (NPY/AgRP) del núcleo arcuato hipotalámico, se inhibe con adrenalectomía y se normaliza con la administración de corticosterona en roedores (63), lo que implicaría una acción

de los GC en el incremento de consumo de alimento favorecido por NPY/AgRP durante el estrés crónico.

ESTRÉS EN LA ETAPA POST-NATAL

En humanos que experimentan estrés severo (abuso/descuido) en la infancia, se observan deficiencias cognitivas y trastornos psiquiátricos como ansiedad y depresión en la adultez, no relacionados con predisposición genética (64).

Nuevamente la utilidad de modelos animales se hace evidente y han contribuido a definir que las alteraciones en la respuesta al estrés varían según el tipo, la intensidad y el periodo de vida en que los animales son estresados. Por ejemplo, en el periodo post-natal el estrés agudo incrementa la eficacia sináptica y los procesos de aprendizaje (65) pero el estrés crónico causa alteraciones en la actividad eléctrica con mayor frecuencia de disparo de potencial de acción en el hipocampo en animales (66) y humanos (67) y sus efectos adversos en el aprendizaje pueden observarse incluso a largo plazo (68).

En las ratas, los primeros 15 días después del nacimiento se caracterizan por una inmadurez del eje HPA que se refleja en respuestas hormonales atenuadas y regulación genética de la CRH disminuida, comparada con la respuesta al estrés que se presenta en la adultez (69).

Hay diversos modelos animales de estrés post-natal, uno de ellos, el “*handling*” o paradigma de manipulación en el que las ratas recién nacidas son separadas de sus madres y colocadas en una caja adyacente a la de éstas diariamente por 15 minutos, provoca una alteración permanente de la expresión de GR en el hipocampo comparada con animales no manipulados. Esto mejora la retroalimentación negativa del eje HPA si se lleva a cabo desde el día 1 ó 2 post-natal durante 5 a 21 días (70), pero si se inicia la manipulación el día post-natal 8 aunque se lleve a cabo por 15 días, la retroalimentación negativa del eje no se

modifica (71), lo que indica la sensibilidad al estrés en el periodo post-natal temprano.

El desarrollo de la respuesta endócrina al estrés es influenciado por el aporte sensorial de la madre a la cría (acicalamiento, limpieza, alimentación y cuidado) que es necesario para el correcto desarrollo de las respuestas del eje HPA (72). Por ejemplo se ha reportado que 24 horas de separación materna provocan disminución en la síntesis de la CRH en el NPV e incremento en la concentración de corticosterona sérica, lo cual se restaura con estimulación táctil y alimentación con cánula (73) reproduciendo las conductas de cuidado materno.

Un cuidado materno deficiente observado en modelos animales como el de separación materna (SM) que consiste en separar a la madre de las crías durante 3 horas diarias del día post-natal 2 al 14, provoca en las crías aumento de la concentración de la corticosterona y la ACTH (74;75) así como trastornos cognitivos (66) derivados de la reducción de la densidad de fibras nerviosas en el hipocampo (76;77) y disminución en la conducta de exploración y el comportamiento de limpieza (78) relacionados con conductas tipo ansiedad y depresión en la vida adulta (79;80).

Las anormalidades neurobiológicas son progresivas ya que la activación de la respuesta sináptica declina con la edad en animales que sufrieron estrés en el periodo post-natal (66).

Por otra parte, el modelo de estrés post-natal por material limitado (ML) desarrollado por Baram y colaboradores (81) permite realizar determinaciones detalladas del comportamiento y se aproxima a las condiciones que se presentan en seres humanos con negligencia de los padres. Dicho modelo consiste en colocar a las hembras con sus crías sobre una reja con acceso limitado de material para hacer su madriguera del día 2 al día 9 post-natal.

El paradigma de estrés post-natal por ML, se basa en que la madre está presente pero el cuidado materno se vuelve errático e impredecible con menos interacción y acicalamiento de las crías y mayor tiempo dejándolos aislados o fuera del nido

(descuido y abandono) (66;82). Además, las madres presentan comportamiento ansioso en la prueba de campo abierto (82).

En las crías se observa hipertrofia de la glándula adrenal y niveles de corticosterona elevados, con una modesta disminución en el peso corporal el día post-natal 9; parámetros que se normalizan a la edad de 1 año en donde no se presenta conducta de ansiedad ni modificaciones en la respuesta al estrés por inmovilidad (66). A pesar de esto, tienen deficiencias en la memoria espacial en la prueba de laberinto de agua y de reconocimiento del objeto, asociadas a alteraciones en la funcionalidad de neuronas piramidales del hipocampo (66), que a su vez podría deberse a un incremento crónico en la expresión y liberación de la CRH en dicha región (83).

En este sentido se sugiere que la estimulación constante del CRH-R1 en el hipocampo derivada del estrés por ML, provoca reducción de la arborización dendrítica y como consecuencia menor habilidad en la memoria espacial, daño que permanece hasta la adultez (84). Por esto, la administración subcutánea e i.c.v. del antagonista al receptor CRH-R1 (NBI30775(3-[6-(dimetil-amino)-4-metil-pirid-3-il]-2,5-dimetil-*N,N*-dipropilpirazolo[2,3-*a*]pirimidin-7-amina) en la semana siguiente al periodo de estrés por ML, mejora la memoria en el laberinto de agua, reconocimiento del objeto y la potenciación sináptica, previniendo las anomalías dendríticas y también el incremento en la expresión de la CRH en hipocampo (84), lo que indica que la activación del receptor por la CRH en el periodo post-natal está vinculada a los déficits de aprendizaje asociados al estrés por ML.

Aunque se conoce que la vía de la CRH está alterada en el estrés post-natal en ambos modelos (SM y ML), las funciones de sus receptores en el NPV, la amígdala y el hipocampo en la regulación de la conducta alimentaria y depresiva no se han definido por completo.

RELACIÓN ENTRE ESTRÉS POST-NATAL Y DEPRESIÓN

El estrés crónico en las primeras etapas de vida afecta a la mayoría de los niños alrededor del mundo porque está conformado por situaciones como abandono o descuido, pérdida de un padre y pobreza extrema (85).

En las primeras etapas de la vida, el estrés está asociado a cambios morfológicos en regiones como la corteza cingulada anterior y la corteza pre-frontal de primates las cuales, se ven afectadas en padecimientos neuro-psiquiátricos en humanos (86). Del mismo modo, datos experimentales sugieren que el estrés psicológico como la SM o el aislamiento social en roedores predisponen a alteraciones cognitivas y a depresión en el animal adulto (66;79;87).

En pacientes deprimidos se ha encontrado un incremento en la concentración de la CRH en el líquido cefalorraquídeo; concentración elevada de cortisol y alteración en la retroalimentación negativa del eje HPA, por lo que se postula una alteración en la capacidad y la función de los GR hipotalámicos (88-90).

En animales adultos el estrés crónico induce hiperactividad de las neuronas CRHérgicas hipotalámicas y extrahipotalámicas, fenómeno relacionado con la fisiopatología de depresión (78).

Las posibles causas de los síntomas depresivos son alteraciones en la recepción, liberación o síntesis de monoaminas en el SNC. Estudios epidemiológicos muestran que aunque 40 a 50% de la vulnerabilidad a padecer un trastorno depresivo es de origen genético (91), ésta podría actuar junto con los cambios que sufre el eje HPA por la constante exposición a estímulos estresantes; vinculando a los trastornos depresivos con el estrés (91).

En estudios clínicos se ha encontrado eficacia en el tratamiento de pacientes con depresión con el antagonista R121919 para el CRH-R1(92); así mismo, la presencia del polimorfismo [RefSeq ID: NM_004382](#) para el gen del CRH-R1 se ha vinculado con depresión mayor en una población de origen chino y se ha demostrado interacción entre la presencia de los polimorfismos del gen del CRH-

R1 [rs110402](#) y [rs7209436](#), abuso en la infancia (sexual, físico o emocional) y depresión en la adultez (93).

Estos hallazgos permiten la asociación entre la hiperactividad de neuronas CRHérgicas por estrés, con la activación del CRH-R1 en regiones del sistema límbico y padecimientos psiquiátricos como la depresión (94).

La caracterización del papel del CRH-R2 en padecimientos psiquiátricos y su relación con la conducta alimentaria está bastante menos estudiada. Así, se propone el análisis de los cambios en la expresión del CRH-R2 hipotalámico por su participación en la regulación de la ingesta alimentaria reportada previamente (95).

JUSTIFICACIÓN

Puesto que el estrés puede llevar a trastornos de la alimentación en ambos extremos, obesidad y bulimia o anorexia nervosa (96), y que en niños con maltrato también se presentan trastornos de la alimentación en la etapa adulta (97) se pretende evaluar el efecto de 2 modelos diferentes de estrés post-natal uno con ausencia de la madre (SM) que semejaría tanto estrés físico como emocional y otro con presencia de una madre negligente (ML) representando solamente estrés emocional, sobre la conducta alimentaria y peso corporal de ratas adultas y relacionarla con el funcionamiento del eje HPA.

Es importante destacar que la anorexia muestra severidad en la sintomatología depresiva (98) y tiene una prevalencia de 16.9% de intentos de suicidio (99). En el otro extremo, el sobrepeso en humanos también está relacionado con un riesgo incrementado de padecer depresión (100) debido a que son más frecuentes la baja autoestima, la inconformidad física y los sentimientos de ansiedad (101).

Tanto estudios clínicos como de investigación básica han relacionado al estrés con vulnerabilidad a padecer depresión en la edad adulta (102), involucrando alteraciones en la regulación del eje HPA (103).

Posiblemente la conducta depresiva observada en animales con SM podría derivarse de modificaciones en la vía CRHérgica del sistema límbico, en donde se postula al hipocampo como inhibidor y a la amígdala como región excitadora de la

actividad del eje HPA (24) por lo que el estudio de la expresión génica en estas regiones facilitaría una asociación. En contraste, la conducta depresiva no se ha evaluado en animales adultos con ML, pero podría presentarse como resultado de la hiperactividad de la vía de CRH hipocampal reportada con este modelo (104) razón por la cual, el análisis de las consecuencias de cada tipo de estrés post-natal en la expresión génica de la vía CRHérgica y la conducta depresiva resulta significativo.

Por otro lado, en ratas sometidas a SM se ha reportado tanto menor ganancia de peso (105) como hiperfagia posterior a periodos de ayuno e incremento del peso corporal con respecto a los controles (106); mientras que con el modelo de ML se presenta disminución en el peso corporal el día post-natal 9 y éste se normaliza a la edad de 1 año (66), así que no se conoce si existe una asociación entre los cambios en el peso corporal que se presentan según el modelo utilizado y alteraciones en la expresión génica de CRH-R2 del NPV.

HIPÓTESIS

La naturaleza del estrés post natal (SM o ML) modificará de manera diferencial el funcionamiento del eje adrenal y la expresión génica de la CRH, sus receptores y el GR en el NPV y el sistema límbico, provocando cambios vinculados a la vía CRHérgica en el peso corporal, el consumo de alimentos y la conducta tipo depresiva en los animales adultos.

OBJETIVOS

Comparar los efectos de dos tipos de estrés post-natal sobre el funcionamiento del eje adrenal, la vía CRHérgica del sistema límbico y relacionarlos con las conductas alimentaria y depresiva de los animales adultos.

1.-Evaluar la conducta depresiva de animales adultos sometidos a estrés post-natal, por medio de la prueba de nado forzado y relacionarla con los cambios en la expresión génica de la hormona CRH, su receptor CRH-R1 y del de GC en el NPV, la amígdala y el hipocampo.

2.-Analizar los cambios en la expresión génica del CRH-R2 en el NPV de animales recién destetados y adultos, derivados del estrés post-natal de acuerdo al paradigma aplicado (SM o ML) y también los cambios resultantes de un estímulo estresante agudo en cada paradigma.

3.-Relacionar los efectos del estrés post-natal en la conducta alimentaria y el peso corporal de animales adultos con alteraciones en las vías de la CRH del sistema límbico y del NPV.

MÉTODOS

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se emplearon 24 ratas Wistar hembra gestantes, provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría (INPRFM), las ratas permanecieron en cajas de polipropileno individuales durante todo el periodo experimental en condiciones de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, 7:00/19:00 hrs con agua y alimento *ad libitum*.

El día de nacimiento de las crías se consideró como el día 0 y en el día post-natal 2 se registró el peso de las crías cuantificando el número de crías macho y el número de crías hembra por camada. Se formaron los siguientes grupos:

Control que consistió de 12 madres con 36 crías macho (3/madre en promedio), la mitad de los animales fue el control para cada modelo de estrés. El grupo control recibió como únicas manipulaciones el cambio de aserrín una vez por semana (para evitar estrés adicional), y el registro de su peso corporal los días 2, 7, 14 y 21 post-natales.

Separación materna (SM). Formado por 6 hembras con 18 crías macho, (3/madre en promedio) separando a la madre de su camada durante 3 h/día del día 2 al 14 post-natal, a diferentes horarios entre las 8:00 a.m. y las 2:00 p.m. Se registró el peso corporal de las madres y las crías macho los días 2, 7, 14 y 21 después del nacimiento. El cuidado materno se evaluó durante los 15 min posteriores a la reunión de la madre con sus crías, al igual que en 6 madres C separadas de sus crías únicamente por 5 minutos.

Material limitado (ML). Formado por 6 hembras con 18 crías macho, (3/madre en promedio). Del día 2 al 9 post-natal fue colocada una reja de metal de 25 x 15 cm unida a una base de madera de 2.5 cm de alto sobre la cama de aserrín de las cajas de polipropileno; sobre la reja se colocó a la madre y a sus crías y se le proporcionó una toalla de papel de 25 x 17 cm como único material para hacer su madriguera. Bajo estas condiciones a pesar de que la madre permanece en la caja todo el tiempo, el cuidado materno disminuye, razón por la cual a este modelo se le considera como de negligencia materna (66;82). El cuidado materno se evaluó en el grupo ML y control, grabando periodos de 30 minutos desde las 8:00 a.m. hasta las 2:00 p.m. ya que algunos aspectos del cuidado se alteran en el periodo de luz (82). Del día 10 al 21 se removió la reja en el grupo ML y se colocó a la madre y sus crías sobre el aserrín, sin mayor manipulación que el cambio de éste y la evaluación de su peso corporal semanalmente.

Se evaluó el tiempo que pasa la madre realizando las siguientes conductas:

- Fuera del nido: No estando la madre cerca o sobre la camada.
- Acicalando al menos a una cría
- Acicalamiento de la madre (Auto acicalamiento)
- Lactando: Madre sobre la camada, en actitud pasiva
- Lactando con la espalda arqueada: Conducta característica de cuidado materno activo.

Así como el número de crías que la madre deja fuera de la zona de cuidado mientras amamantaba.

El día 22 las crías fueron destetadas y las madres sacrificadas por decapitación, se obtuvo el suero para la determinación de corticosterona sérica y se extrajeron las glándulas adrenales para cuantificar su peso en gramos.

Así mismo se sacrificó una cría macho de cada madre control, SM y ML para determinar el contenido de corticosterona sérica, el peso adrenal, la expresión de la CRH, sus receptores y de GR en NPV, amígdala e hipocampo.

El resto de las crías macho se colocó en cajas individuales y se mantuvo con agua y alimento *ad libitum* durante las siguientes 7 semanas hasta alcanzar la

adulthood (10 weeks of life), determining their body weight and food consumption weekly.

Before the sacrifice on day 71, 8 rats/group of each model and their respective controls were subjected to the forced swim test to evaluate their depressive behavior.

The groups of adult animals were the following:

CONTROL SIN NADO: 10 animales

CONTROL CON NADO: 16 animales

SM SIN NADO: 6 animales

SM CON NADO: 8 animales

ML SIN NADO: 6 animales

ML CON NADO: 8 animales

PRUEBA DE NADO FORZADO

The forced swim test of Porsolt (107) was performed because depressive symptoms in basic research studies are evaluated by behavioral tests of the animal and since the forced swim test is considered an acute stressor, it was expected to observe an increase in the activity of the HPA axis (108).

In the Porsolt test, the animal is placed in a special container that, due to its depth, does not allow the hind paws to touch the bottom, so the animal is forced to swim for 15 minutes (pre-test).

24 hours later, the animal is placed in the same container and its behavior is recorded for 5 minutes (test).

The behavior was evaluated based on 3 main criteria:

Escalamiento: It refers to the time or number of 5-second periods (frequency) in which the animal supports its front paws on the surface of the container, attempting to escape. It is considered a parameter of motivation related to the activation of the noradrenergic pathway (109).

Nado: Tiempo o frecuencia en que el animal realiza movimientos de las patas y/o la cola por medio de los cuales se desplaza de un cuadrante a otro del contenedor. Es considerado un parámetro de motivación relacionado con la activación de la vía serotoninérgica (109).

Inmovilidad: Tiempo o frecuencia en que el animal está inmóvil, en el mismo cuadrante, solo mantiene el hocico fuera del agua con movimientos muy ligeros para evitar hundirse; es un indicador de desesperanza.

La frecuencia con que se presenta cada comportamiento fue comparada entre grupos; se considera que un mayor tiempo de inmovilidad está asociado a mayor comportamiento depresivo (107).

Todos los animales que entraron a la prueba lo hicieron el día 71 y fueron sacrificados por decapitación 30 minutos después de la misma, de igual manera los que no pasaron por el nado se sacrificaron, considerándose grupos en estado basal (C, SM y ML).

Se obtuvo la sangre troncal que se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810 R) para obtener el suero, en el que se determinó la concentración de corticosterona y vasopresina. El cerebro fue extraído y congelado en hielo seco para su posterior análisis de la expresión genética de la CRH, el GR, el CRH-R1 en NPV, amígdala e hipocampo y del CRH-R2 en NPV.

CONCENTRACIÓN DE CORTICOSTERONA Y VASOPRESINA SÉRICAS

Para medir corticosterona, se utilizó un kit comercial de radioinmunoensayo (RIA) de la marca coat-a-count®, de Siemens Medical Solutions Diagnostics, que tiene un límite de detección 5.7 ng/ml, coeficientes de variación intraensayo-interensayo 12.2 % y 14.9 % respectivamente.

Se midió vasopresina sólo en aquellos animales cuya concentración de corticosterona estaba elevada vs. la de su control que fueron los de SM (no se midió en los de ML), utilizando un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con un kit comercial (Enzo® Life Sciences). Límite de detección 3.39

pg/ml, coeficientes de variación intraensayo-interensayo 10.6 % y 8.5 % respectivamente.

DISECCIÓN DEL CEREBRO

La disección de las regiones cerebrales se realizó de forma manual con cerebros congelados sobre una caja de petri llena de hielo seco pulverizado; siguiendo las coordenadas de cerebro de rata según el atlas de Paxinos y Watson (110).

Se realizó un corte coronal para NPV y amígdala desde Bregma -1.08 hasta -3.24 mm antero-posterior y se identificó el tercer ventrículo localizado a 8 mm dorso-ventral, se extrajo el NPV con un sacabocados de 1 mm de diámetro y se realizaron cortes laterales de 4 a 2 mm de la línea media y de 7 a 9 mm dorso-ventral para la obtención de las amígdalas de los 2 hemisferios.

Para disecar el hipocampo se realizó otro corte coronal desde Bregma -3.72 a -5.16 mm antero-posterior y se extrajo el hipocampo dorsal y ventral con un bisturí.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

Para la determinación de la expresión genética, se llevó a cabo la extracción del ARN total de las regiones de interés por el método de Chomczynski-Sacchi (111).

Se homogenizaron las muestras por ultrasonido (vibra cell VC-130) en 100 µl de solución D (tiocinato de guanidina 4 M, citrato de sodio pH7 25 mM, sarcosil 0.5 %, β-mercaptoetanol 0.1 M) para el NPV, 500 µl para la amígdala, y 750 µl para el hipocampo de un solo hemisferio.

Una vez homogeneizado el tejido, se agregaron 100, 500 y 750 µl de Fenol saturado con H₂O/ dietil pirocarbonato (DEPC 0.1 %); 10, 50 y 75 µl de acetato de sodio 2 M pH 4 y 30, 150 y 225 µl de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 a NPV, amígdala e hipocampo respectivamente y la mezcla se agitó con vórtex (Daigger Genie 2).

Se dejaron 15 minutos en hielo previo a su centrifugación durante 20 minutos a 4°C y 10,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R).

Se recuperó la fase acuosa de cada muestra a la que se añadió 100, 500 y 750 µl de isopropanol a NPV, amígdala e hipocampo respectivamente, se mezcló con vórtex y se dejó reposar a -20° C durante 24 horas.

Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13 800 rpm a 4°C durante 30 min. Se decantó el contenido y se añadió 100, 500 y 750 µl de etanol al 75 % a NPV, amígdala e hipocampo respectivamente, se mezcló y centrifugó a 13 800 rpm a 4°C por 12 minutos, se decantó el contenido y se repitió el procedimiento 2 veces más. Se decantó el etanol del último lavado y los tubos se secaron en un concentrador bajo vacío (Eppendorf Vacufuge) durante 5 min.

Para realizar la lectura de las muestras, el sedimento del NPV fue resuspendido en 10 µl de H₂O/DEPC, la amígdala en 30 µl y el hipocampo en 50 µl.

Se obtuvo la densidad óptica con un fotómetro (Eppendorf Bio-photometer) a 230 nm para medir la cantidad de sales, a 260 nm para medir la cantidad de RNA y a 280 nm para medir la cantidad de proteínas. Las muestras que no tuvieron una relación mayor a 1.5 de la densidad óptica (D.O.) entre 260/230 y 260/280, se descartaron.

Se determinó la calidad de la extracción por medio de electroforesis con un gel de agarosa al 1.5 % determinando la integridad de la subunidades 28S y 18S del ARNr; la relación de la densidad de las dos bandas debe ser mayor a 1.5, de lo contrario, las muestras se descartan.

Transcripción de ARN total a ADNc

Las muestras (1.5 µg de ARN en 12 µl de H₂O/DEPC); se desnaturalizaron calentándolas en baño maría a 65°C por 5 minutos; posteriormente se agregó la mezcla de transcripción (8.9 µl de H₂O/DEPC, 6 µl de Buffer [Tris-HCl pH 7.5, 20 mM; 100 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0.01% NP-40; 50% glicerol] 3 µl de

DTT (0.1 M), 0.6 µl de desoxinucleótidos de trifosfato (dNTP's 100 mM), 1 µl de poliT (0.5 µg/µl) y 0.5 µl de M-MLV transcriptasa reversa 200 U/µl). La mezcla se incubó 2 horas a 37° C.

Mezcla para la realización de PCR

Se utilizaron 4 µl de ADNc/muestra, 35 µl de H₂O/DEPC, 5 µl de Buffer [KCl 500 mM; Tris-HCl pH 8.3 100 mM; gelatina 100 µg/ml; 1% tritón X-100; 1.5 mg/ml BSA], 2.5 µl de MgCl₂ (30 mM), 1 µl de dNTP's, 0.5 µl de Taq polimerasa (5 U/µl), 1 µl de oligo sentido y 1 µl de oligo antisentido (25 pmol/µl cada uno) para cada gen de interés.

Se utilizó un termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) con las siguientes temperaturas y tiempos:

1°:94 °C 1 minuto

2°:64 °C (para CRH-R2, GR, ciclofilina), 63 °C (para CRH) ó 55 °C (para CRH-R1)
1 minuto

3°:72 °C 1 minuto 15 segundos

Al final: 72 °C 15 minutos

Se utilizó como gen control el de la ciclofilina por su expresión constitutiva.

Se obtuvieron las condiciones óptimas en cuanto a cantidad de ciclos para cada gen y para cada región [Figura 3] y se seleccionó aquél número de ciclos donde se encontrara una relación lineal con la D.O.

FIGURA 3: Optimización de ciclos para PCR.

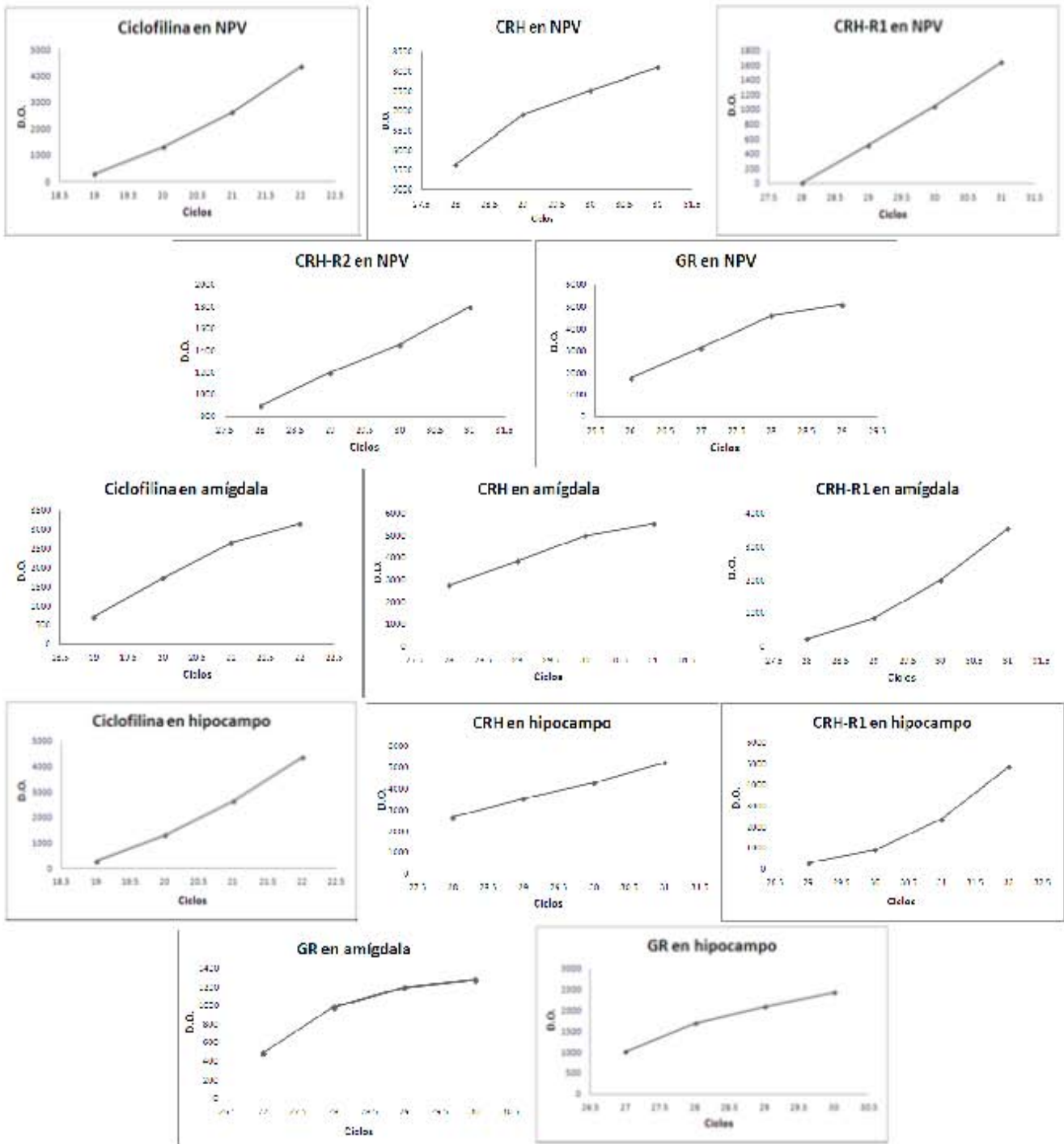


Figura 3: Se muestran el número de ciclos de PCR con respecto a la densidad óptica obtenida para cada gen, en cada región de interés.

Número de ciclos de PCR:

	NPV	AMÍGDALA	HIPOCAMPO	Peso molecular del producto (Pares de bases)
CRH	28	29	30	350
CRH-R1	30	31	32	242
CRH-R2	30	-	-	489
GR	27	30	29	692
CYC	21	21	21	259

Los productos de la PCR se separaron utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se tiñeron con bromuro de etidio (0.25 %) para medir la D.O. por medio del software Advanced American Biotech Imaging.

Los resultados se obtuvieron dividiendo la D.O. del gen de interés entre la de ciclofilina.

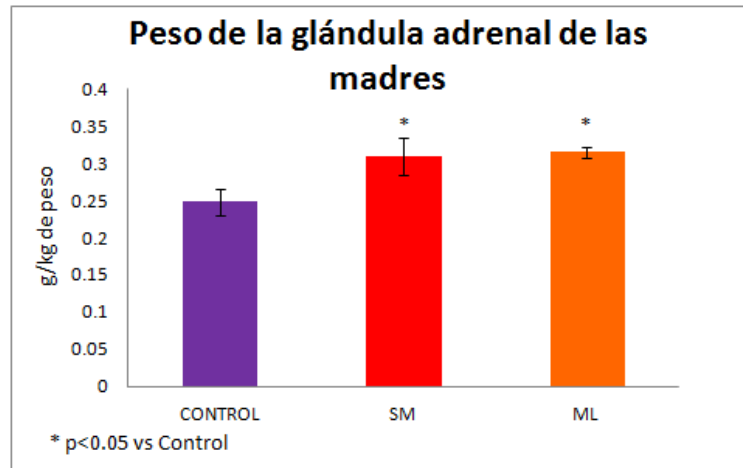
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de peso y consumo de alimento de las madres y las crías durante la lactancia o hasta la adultez fueron estudiados por análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías (tiempo-tipo de estrés). El peso de la glándula adrenal, la concentración de corticosterona y vasopresina séricas así como la expresión génica fueron analizados por ANOVA de 1 vía (Tipo de estrés). Cuando el análisis de varianza arrojó un valor de $p < 0.05$, se realizó una prueba post-hoc de Fisher para identificar entre qué grupos existió diferencia significativa. Se utilizó el software Stat View, SAS Institute.

RESULTADOS

MADRES

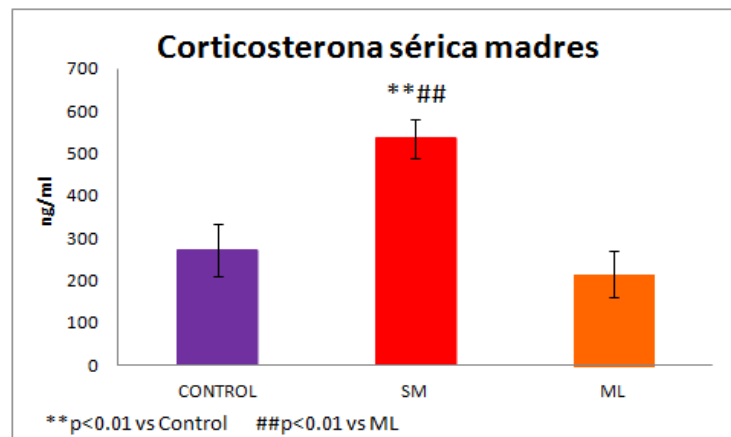
En ambos paradigmas de estrés las madres presentaron incrementos en el peso de la glándula adrenal de 24% en SM y 27% en ML comparados con el grupo sin estrés, lo que indicó que estuvieron sujetas a estrés crónico (Gráfica 1).



Gráfica 1

Los resultados se expresan como gramos/kg de peso corporal. Se representa la media y el error estándar (\pm EEM). Análisis ANOVA de 1 vía Tipo de estrés: $F_{(2,15)}=4.03$ $p<0.05$. Se utilizó la prueba post-hoc de Fisher, diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control $n=12$, SM $n=6$, ML $n=6$).

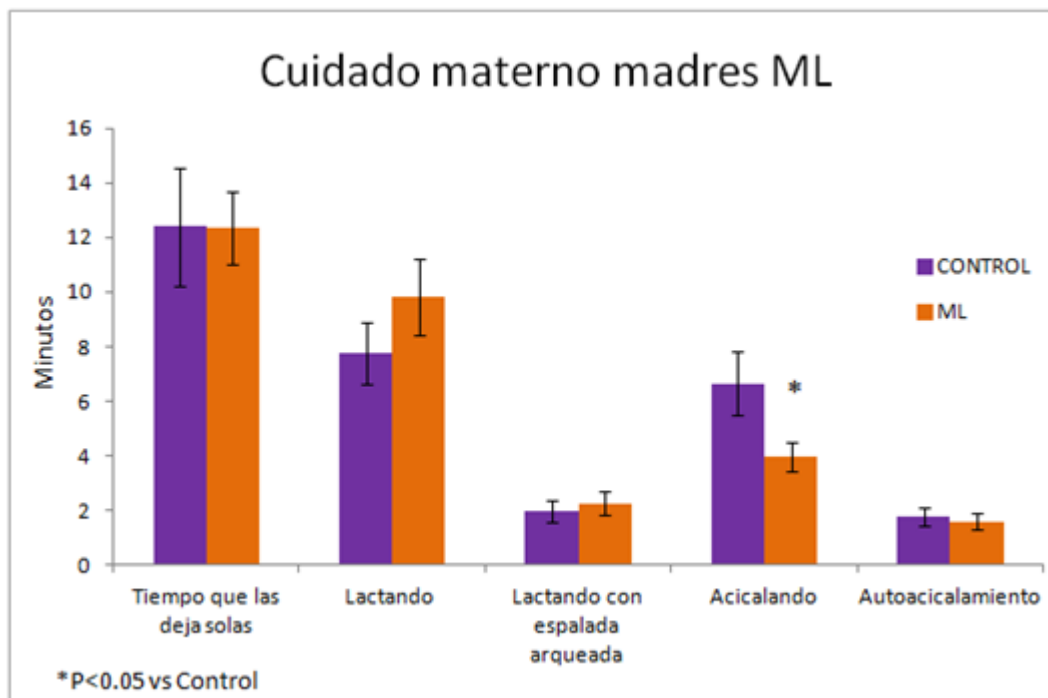
El incremento en el peso adrenal, no llevó a las madres de ML a presentar aumento en la concentración de corticosterona sérica, lo cual sí se observó en las madres con SM que tuvieron 97% de incremento en la corticosterona circulante vs controles (100%) y 149% vs ML (Gráfica 2).



Gráfica 2

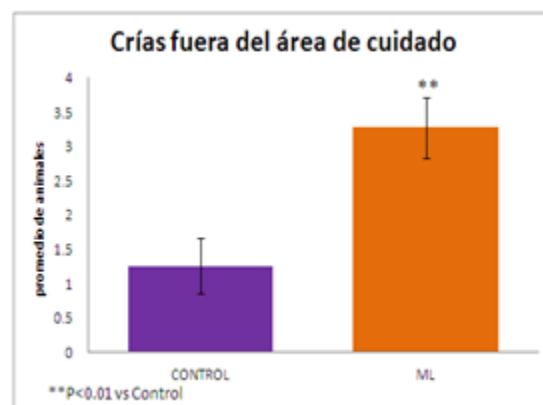
Los resultados se expresan como ng/ml de suero. Se representa la media \pm EEM. Análisis ANOVA de 1 vía Tipo de estrés: $F_{(2,11)}=9.65$ $p<0.001$. Diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control $n=12$, SM $n=6$, ML $n=6$).

Al analizar los videos de conducta materna no se observó ningún cambio en el tiempo que las madres ML dejan a las crías solas, se acicalan cerca de la camada ni cuando llevan a cabo conductas como lactar con y sin la espalda arqueada. Sin embargo, dejaron en promedio más crías fuera de la zona de cuidado y disminuyó en un 60% el tiempo que pasaron acicalando a sus crías, lo que indica un cuidado materno errático (Gráficas 3 y 4).



Gráfica 3

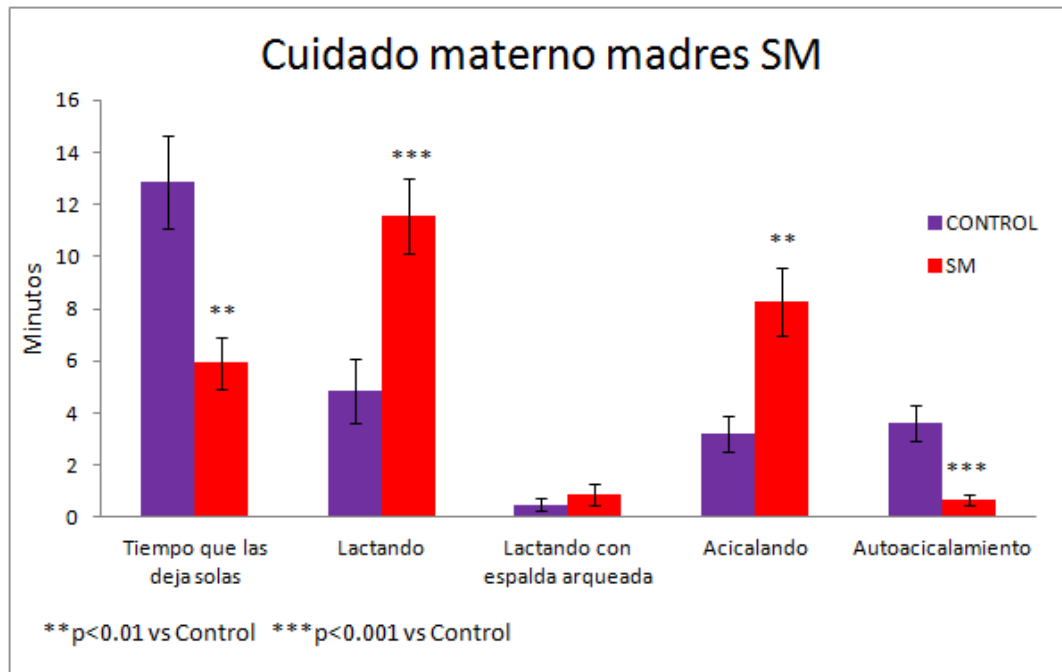
Los resultados se expresan como minutos realizando la conducta. Se representa la media \pm EEM. Se utilizó la prueba t de student para grupos, diferencias significativas cuando $p < 0.05$. (Control $n=6$, ML $n=6$).



Gráfica 4

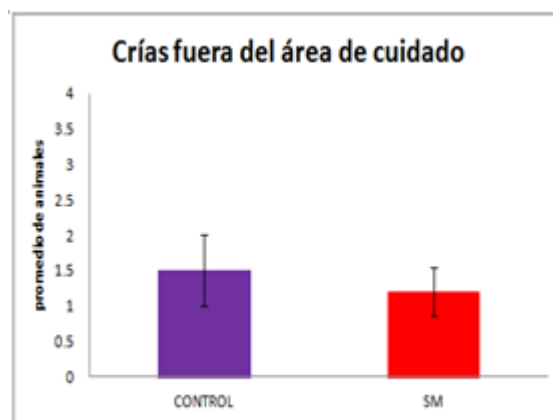
Los resultados se expresan como el número de crías fuera del área de cuidado. Se representa la media \pm EEM. Se utilizó la prueba t de student para grupos, diferencias significativas cuando $p < 0.05$. (Control $n=6$, ML $n=6$).

En el cuidado materno de animales con estrés post-natal por SM se presentó incremento en las conductas relacionadas con mayor cuidado durante los 15 minutos posteriores a la reunión con sus crías comparado con los mismos comportamientos de madres control al ser separadas sólo 5 minutos (Gráficas 5 y 6). Hubo incrementos de 140% y 160% del tiempo que pasaron lactando y acicalando a sus crías respectivamente y disminución de 190% en el tiempo que se acicaló a sí misma y de 50% en el tiempo que las dejó solas.



Gráfica 5

Los resultados se expresan como minutos realizando la conducta. Se representa la media \pm EEM. Se utilizó la prueba t de student para grupos, diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control n=6, ML n=6).

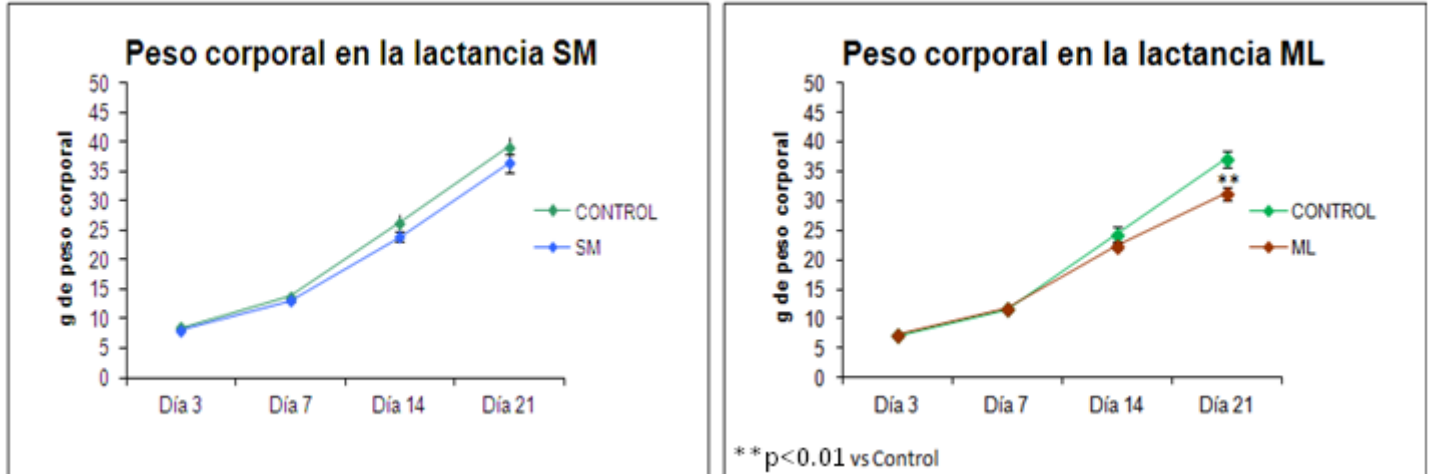


Gráfica 6

Los resultados se expresan como el número de crías fuera del área de cuidado. Se representa la media \pm EEM. Se utilizó la prueba t de student para grupos, diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control n=6, ML n=6).

CRÍAS AL DESTETE

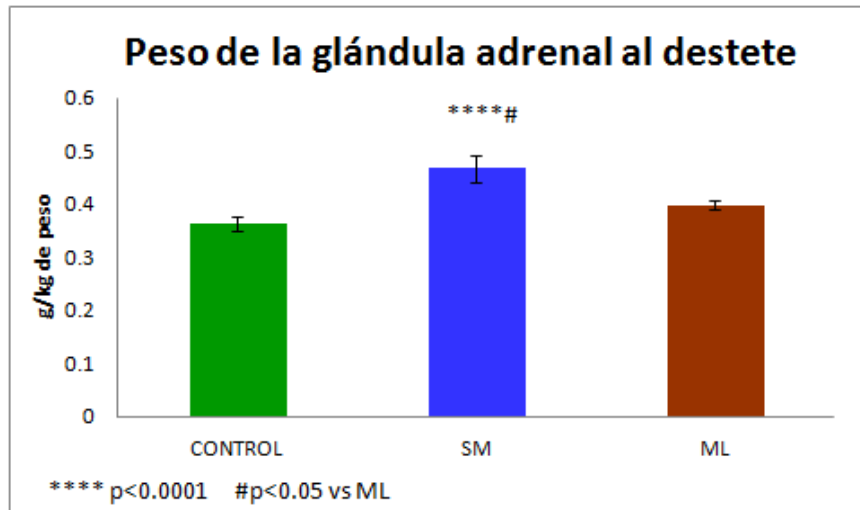
El peso corporal de las crías con ML disminuyó en 17% al día 21 post-natal contra su grupo control y no se observaron cambios en los de SM (Gráficas 7 y 8).



Gráficas 7 y 8

Los resultados se expresan como gramos de peso corporal ganados con respecto al peso al día 3. Se representa la media \pm EEM. Análisis prueba t de student, diferencias significativas cuando $p < 0.05$. (Control $n=15$, ML $n=16$, SM $n=18$).

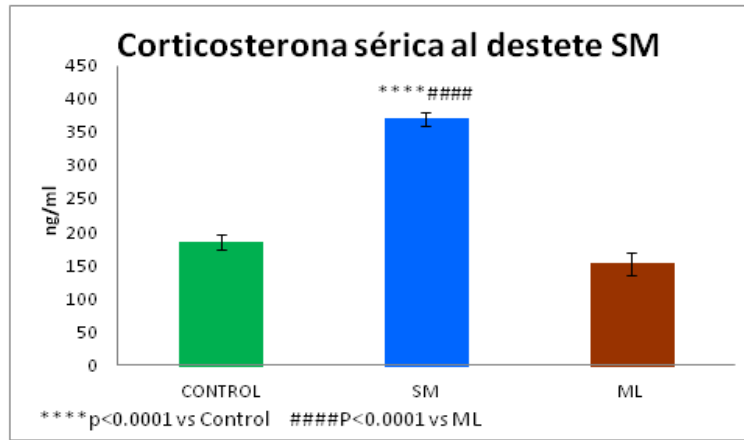
A diferencia de lo que se observó en las madres, las crías con SM presentaron hipertrofia de la glándula adrenal (32% y 17%) con respecto al grupo control y ML respectivamente; mientras que en las crías con ML no cambió comparada con el grupo sin estrés (Gráfica 9).



Gráfica 9

Los resultados se expresan como gramos/kg de peso corporal. Se representa la media \pm EEM. Análisis ANOVA de 1 vía Tipo de estrés: $F_{(2,26)}=9.86$ $p < 0.001$. Diferencias significativas cuando $p < 0.05$. (Control $n=21$, SM $n=7$, ML $n=4$).

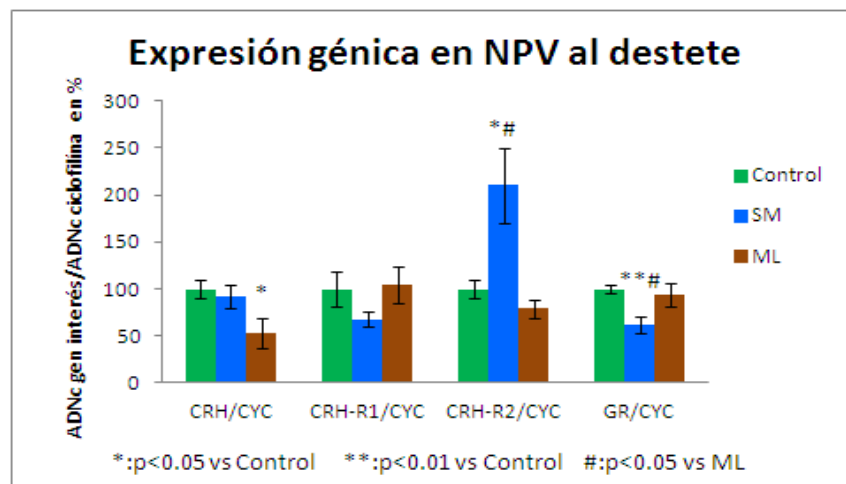
De igual forma, el grupo SM presentó un incremento del 99% en la concentración de corticosterona sérica comparando con el grupo control y de 142% contra los animales con ML que no presentaron cambio contra los controles (Gráfica 10).



Gráfica 10

Los resultados se expresan como ng/ml de suero. Se representa la media y el error estándar (\pm EEM). Análisis ANOVA de 1 vía Tipo de estrés: $F_{(2,7)}=66.17$ $p<0.0001$. Diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control $n=4$, SM $n=4$, ML $n=4$).

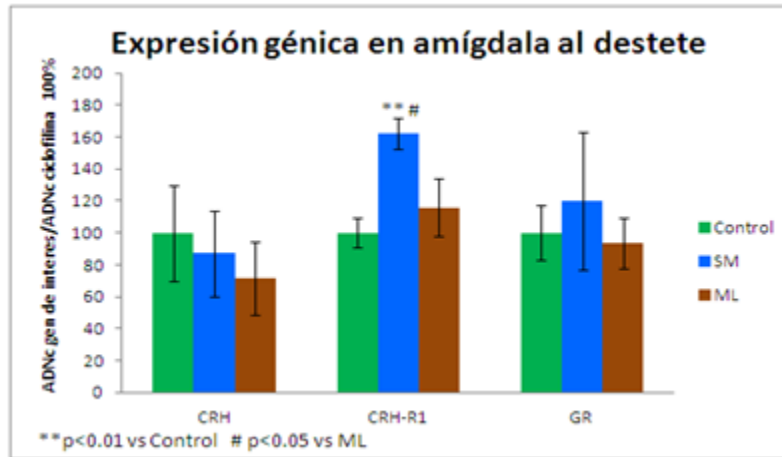
En la determinación de los ARNm de CRH, sus receptores CRH-R1, CRH-R2 y de glucocorticoides en el NPV de animales con SM sacrificados al destete se observó un incremento en la expresión de CRH-R2 y una disminución en la de GR comparado con los controles y los de ML. Las crías con ML presentaron expresión disminuida de CRH vs controles, mientras que ningún paradigma modificó la de CRH-R1 (Gráfica 11).



Gráfica 11

Los resultados se expresan como ADNc del gen de interés/ADNc de ciclofilina en porcentaje con respecto al grupo control. Se representa la media \pm EEM. Análisis ANOVA de 1 vía para tipo de estrés CRH: $F_{(2,7)}=3.79$ $p<0.05$. CRH-R1: $F_{(2,14)}=1.7$ $p:0.22$. CRH-R2: $F_{(2,11)}=6.07$ $p<0.05$. GR: $F_{(2,12)}=6.06$ $p<0.05$. Diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control $n=4$, SM $n=4$, ML $n=4$).

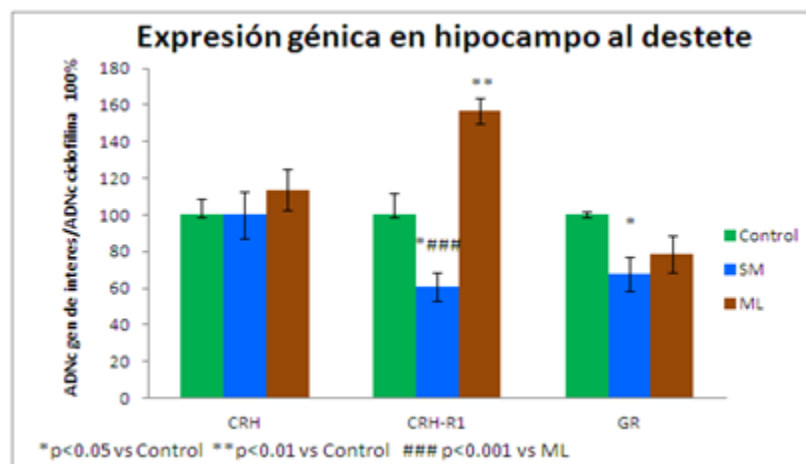
En la amígdala de animales SM recién destetados se observó un incremento en el ARNm de CRH-R1 vs controles y ML. En los de ML, no hubo cambios vs controles (Gráfica 12).



Gráfica 12

Los resultados se expresan como ADNc del gen de interés/ADNc de ciclofilina en porcentaje con respecto al grupo control. Se representa la media \pm EEM. Análisis ANOVA de 1 vía para tipo de estrés CRH: $F_{(2,6)}=0.16$ $p:0.86$. CRH-R1: $F_{(2,14)}=1.7$ $p:0.22$. GR: $F_{(2,12)}=6.06$ $p<0.05$. Diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control $n=4$, SM $n=4$, ML $n=4$).

En el hipocampo de animales ML recién destetados se observó un incremento en la expresión del CRH-R1; en cambio en animales SM, encontramos inhibida la expresión del CRH-R1 y del GR comparada con la de su control y del CRH-R1 también contra ML (Gráfica 13).



Gráfica 13

Los resultados se expresan como ADNc del gen de interés/ADNc de ciclofilina en porcentaje con respecto al grupo control. Se representa la media \pm EEM. Análisis ANOVA de 1 vía para tipo de estrés CRH-R1: $F_{(2,7)}=20.67$ $p<0.01$. GR: $F_{(2,6)}=3.69$ $p<0.05$. Diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control $n=4$, SM $n=4$, ML $n=4$).

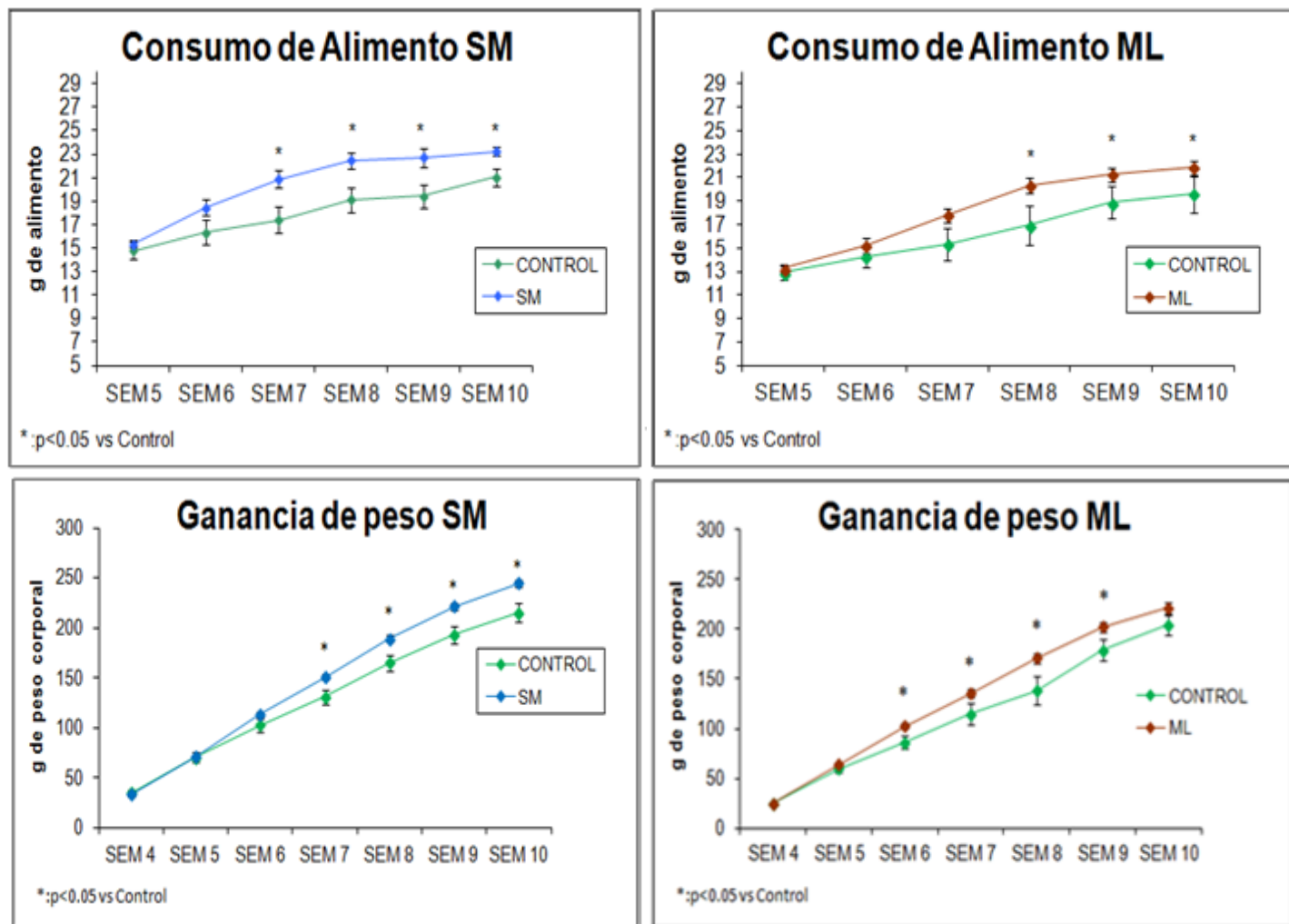
TABLA 1: Resumen de resultados al destete

	Variable	SM	ML
	Peso corporal	=	↓
	Peso adrenal	↑	=
	Corticosterona sérica	↑	=
NPV	ARNm de CRH	=	↓
NPV	ARNm de CRH-R1	=	=
NPV	ARNm de CRH-R2	↑	=
NPV	ARNm de GR	↓	=
Amígdala	ARNm de CRH	=	=
Amígdala	ARNm de CRH-R1	↑	=
Amígdala	ARNm de GR	=	=
Hipocampo	ARNm de CRH	=	=
Hipocampo	ARNm de CRH-R1	↓	↑
Hipocampo	ARNm de GR	↓	=

Sin cambio (=), aumento (↑) o disminución (↓) vs Control.

ADULTOS

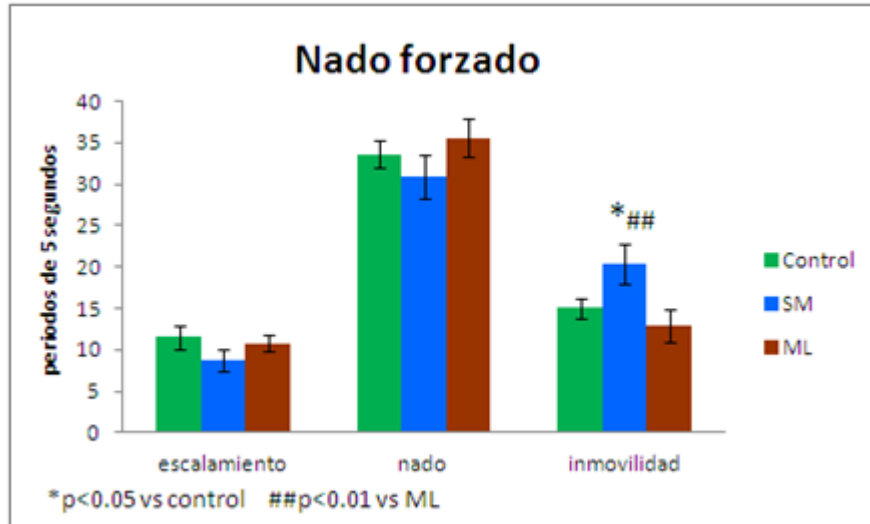
Los animales adultos que estuvieron sujetos tanto a SM como a ML mostraron un incremento en su consumo de alimento (SM 10%, ML18%) y en la ganancia de su peso corporal del destete a la adultez comparado con sus respectivos grupos control (SM 14% ML 11%)(Gráficas 14-17).



Gráficas 14, 15, 16 y 17

Los resultados se expresan como gramos de alimento consumido en promedio (14 y 15) y gramos de peso corporal ganados con respecto al peso al destete (16 y 17). Se representa la media \pm EEM. Análisis por prueba t de student, diferencias significativas cuando $p < 0.05$. (Control n=24, ML n=12, SM n=12).

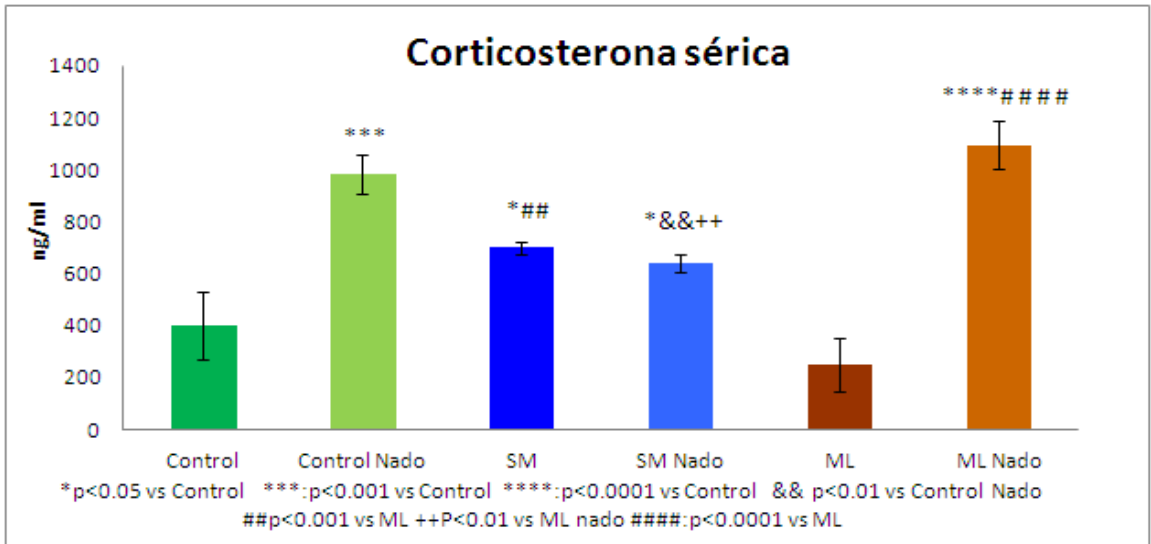
El único grupo de animales que en la adultez presentó un incremento de 36% y 58% en el tiempo de inmovilidad al realizar la prueba de nado forzado, fue el grupo de SM comparado con el control y el de ML (Gráfica 18).



Gráfica 18

Los resultados se expresan como frecuencia de conducta (periodos de 5 segundos). Se representa la media \pm EEM. ANOVA de 1 vía inmovilidad tipo de estrés: $F_{(2,47)}=3.96$ $p<0.05$. Diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control $n=16$, ML $n=8$, SM $n=8$).

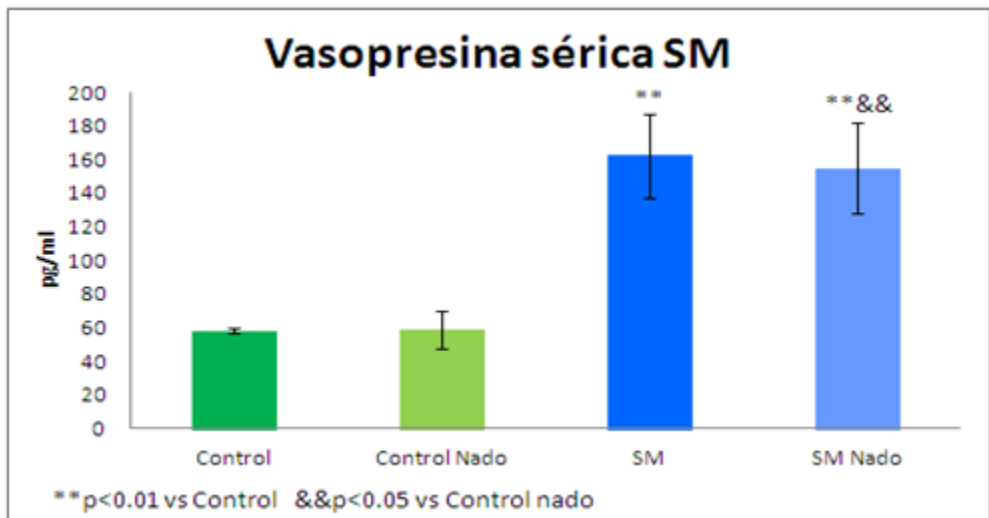
La realización de la prueba de nado en los animales control incrementó su concentración de corticosterona sérica 246% vs. aquéllos que no nadaron; el grupo de animales ML al pasar por la prueba la incrementaron en un 440% vs. la del estado basal. En el caso del grupo SM, la concentración basal (antes del nado) ya se encontraba incrementada un 75% vs. la del grupo sin estrés, pero la realización de la prueba fue incapaz de elevar aún más la concentración de corticosterona, condición que evidenció los efectos del estrés crónico en ese grupo (Gráfica 19).



Gráfica 19

Los resultados se expresan como ng/ml de suero. Se representa la media \pm EEM. ANOVA de 1 vía tipo de estrés Grupos: $F_{(5,21)}=13.57$ $p<0.0001$. Diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control n=5, Control Nado n=5, SM n=5, SM Nado n=5, ML n=5, ML Nado n=5).

La prueba de nado forzado no incrementó la concentración de vasopresina en el grupo control o SM al comparar con los respectivos grupos que no nadaron. En cambio, la concentración de la hormona en los grupos con SM incrementó significativamente a 280% al comparar con los del grupo control. No se realizó la determinación en el grupo ML porque sólo se espera un cambio en vasopresina en aquellos animales con estrés crónico, que fueron los de SM (Gráfica 20).

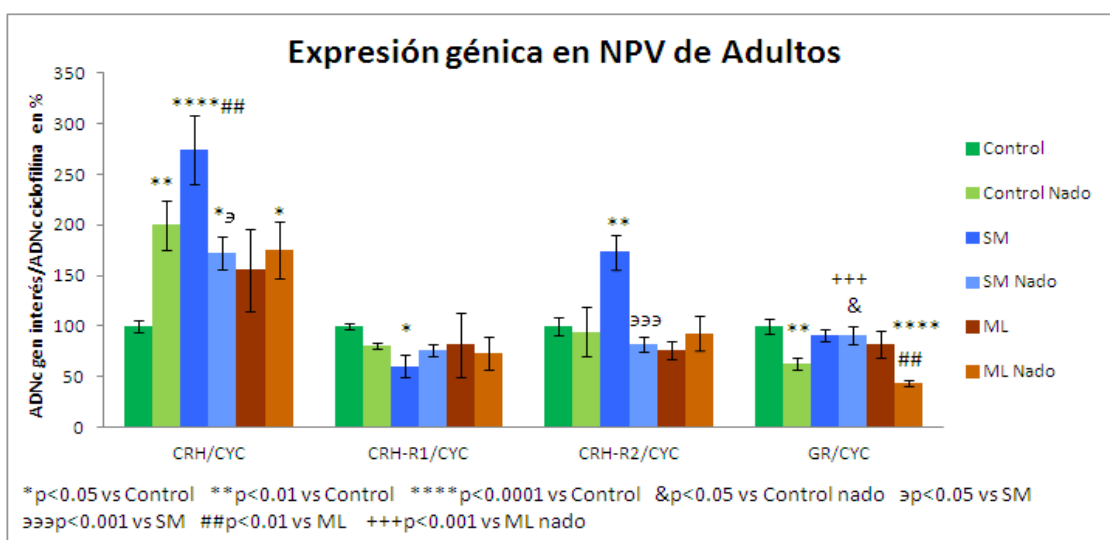


Gráfica 20

Los resultados se expresan como pg de vasopresina/ml de suero. Se representa la media \pm EEM. ANOVA de 1 vía tipo de estrés: $F_{(3,10)}=8.17$ $p<0.01$. Diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control n=5, Control Nado n=5, SM n=5, SM Nado n=5).

La prueba de nado provocó en el grupo control que la expresión de ARNm de la CRH del NPV se incrementara vs. la del grupo que no nadó y que disminuyera la expresión de GR. Aunque la expresión de la CRH en el grupo de ML no cambió al compararla contra los animales que no nadaron, sí incremento con respecto al control basal y de la misma forma que el control, la expresión de GR disminuyó con el nado.

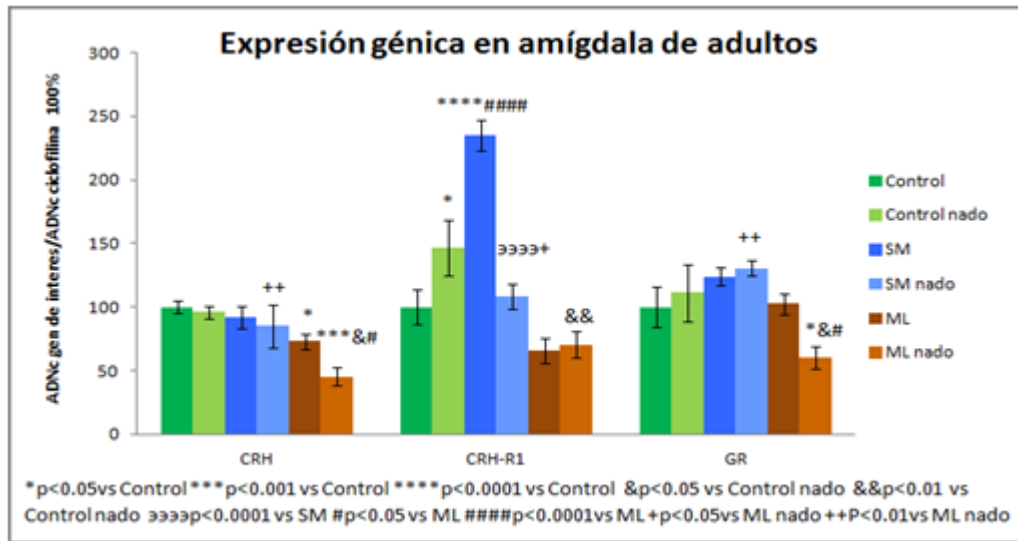
En los animales SM el nado provocó que la síntesis de la CRH disminuyera vs el grupo SM sin nado, que tuvo mayor expresión del péptido que el grupo control y el de ML sin nado; en cuanto a la expresión de los receptores CRH-R1 y CRH-R2 de esta región, únicamente se modificaron con el estrés por SM, disminuyendo el CRH-R1 e incrementando el CRH-R2; en ambos casos el nado en los animales SM normalizó la síntesis de los receptores (Gráfica 21).



Gráfica 21

Los resultados se expresan como ADNc del gen de interés/ADNc de ciclofilina en % con respecto al grupo control. Se representa la media \pm EEM. Análisis ANOVA de 1 vía tipo de estrés CRH: $F_{(5,32)}=4.3$ $p<0.01$. CRH-R1: $F_{(5,32)}=0.98$ $p:0.45$. CRH-R2: $F_{(5,15)}=62.4$ $p<0.0001$. GR: $F_{(5,33)}=7.1$ $p<0.001$. Diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control $n=4$, Control Nado $n=4$, SM $n=4$, SM Nado $n=4$, ML $n=4$, ML Nado $n=4$).

El paso por la prueba incrementó el contenido de ARNm del CRH-R1 en la amígdala del grupo control; mientras que lo normalizó en el de SM (que estaba elevada antes de la prueba comparada tanto con el grupo control como ML sin nado). El grupo con ML sin nado presentó menor expresión de la CRH en la amígdala vs el grupo control sin nado y la prueba disminuyó más esa expresión, así como la del GR; lo que no se presentó en el grupo con SM y nado (Gráfica 22).



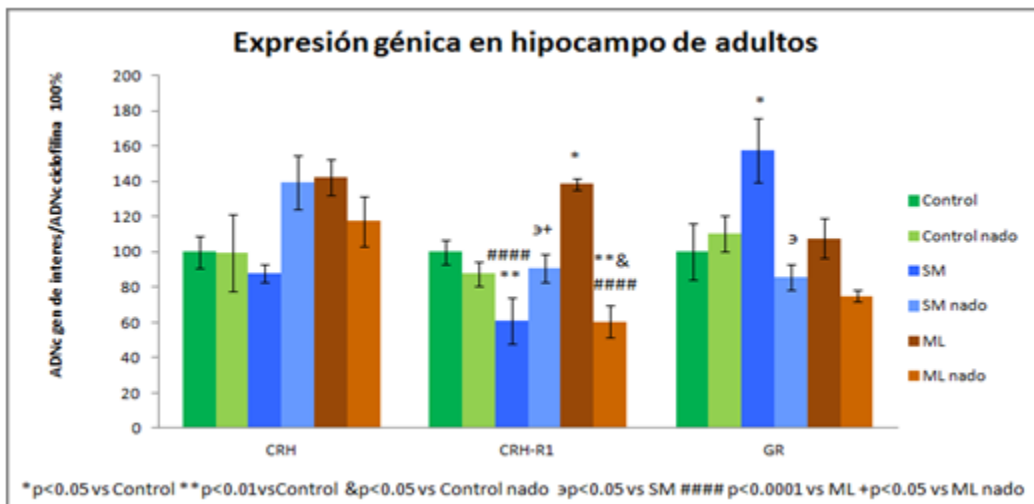
Gráfica 22

Los resultados se expresan como ADNc del gen de interés/ADNc de ciclofilina en % con respecto al grupo control. Se representa la media \pm EEM. Análisis ANOVA de 1 vía Tipo de estrés CRH: $F_{(5,13)}=5.31$ $p<0.01$. CRH-R1: $F_{(5,14)}=21.68$ $p<0.0001$. GR: $F_{(5,13)}=4.1$ $p<0.05$. Diferencias significativas cuando $p<0.05$. (Control n=4, Control Nado n=4, SM n=4, SM Nado n=4, ML n=4, ML Nado n=4).

En el hipocampo, la expresión de la CRH no se modificó en ninguna de las condiciones de estrés.

La naturaleza del estrés post-natal cambió diferencialmente la expresión del CRH-R1 en esta región: en el grupo con SM, disminuyó comparado con el grupo control y ML, normalizándose con el nado; mientras que en el grupo de ML, aumentó y con el nado disminuyó vs. ML sin nado, el control y el grupo de SM con nado.

Asimismo, la síntesis del GR fue incrementada sólo en SM vs. el control, normalizándose con el nado (Gráfica 23).



Gráfica 23

Los resultados se expresan como ADNc del gen de interés/ADNc de ciclofilina en % con respecto al grupo control. Se representa la media \pm EEM. Análisis ANOVA de 1 vía Tipo de estrés CRH: $F_{(5,14)}=0.6$ p:0.7. CRH-R1: $F_{(5,17)}=9.13$ p<0.001. GR: $F_{(5,13)}=2.6$ p<0.05. Diferencias significativas cuando p<0.05. (Control n=4, Control Nado n=4, SM n=4, SM Nado n=4, ML n=4, ML Nado n=4).

TABLA 2: Resumen de resultados de animales adultos

	Variable	<u>Control</u> <u>nado</u>	SM	<u>SM</u> <u>nado</u>	ML	<u>ML</u> <u>nado</u>
	Consumo de alimento		↑		↑	
	Peso corporal		↑		=	
	Conducta depresiva			↑		=
	Corticosterona sérica	↑	↑	↓	=	=
	Vasopresina sérica	=	↑	↑		
NPV	CRH	↑	↑	=	=	=
NPV	CRH-R1	=	↓	=	=	=
NPV	CRH-R2	=	↑	=	=	=
NPV	GR	↓	=	↑	=	=
Amígdala	CRH	=	=	=	↓	↓
Amígdala	CRH-R1	↑	↑	=	=	↓
Amígdala	GR	=	=	=	=	↓
Hipocampo	CRH	=	=	=	=	=
Hipocampo	CRH-R1	=	↓	=	↑	↓
Hipocampo	GR	=	↑	=	=	=

Sin cambio (=), aumento (↑) o disminución (↓) vs Control.

Sin cambio (=), aumento (↑) o disminución (↓) vs Control Nado.

DISCUSIÓN

Existe un fuerte vínculo entre la susceptibilidad a padecer un trastorno psiquiátrico como la depresión en la adultez y el estrés sufrido en la niñez por situaciones como abuso o descuido (86;90). Esto determina la importancia del estudio de dicha asociación para contribuir a identificar algunos de los mecanismos involucrados.

Debido a que el periodo de vida de la rata es mucho más corto que el del humano, el uso de modelos de estrés post-natal en animales de laboratorio puede reflejar situaciones de estrés en la infancia temprana de humanos.

El presente trabajo busca comparar el efecto de 2 modelos animales de estrés crónico en la etapa post-natal sobre la respuesta del eje adrenal ante un nuevo estímulo adverso y relacionarlo con alteraciones en la vía de CRH del sistema límbico y con cambios en la conducta depresiva y alimentaria.

Comparando 2 modelos de estrés; ML en el cual no se había estudiado previamente la conducta depresiva y SM en donde se ha reportado que sí se presenta (79), se trató de identificar una posible relación entre esta conducta y una expresión génica alterada de la CRH, los GR y el CRH-R1 en el NPV, la amígdala y el hipocampo. Así mismo, puesto que tanto el estrés como la depresión en adultos afectan el apetito en ambos sentidos (96;100;112) se examinó si existe una relación entre los cambios en el consumo de alimento y peso corporal en ambos modelos, y alteraciones en la expresión del CRH-R2 del NPV, cuya función está vinculada a la inhibición del consumo de alimento por el péptido CRH (48).

MADRES

Aunque en ambos modelos se observaron alteraciones en el cuidado materno; la SM provocó que las madres incrementaran el tiempo de conductas como acicalamiento y tiempo de lactancia después de regresarlas a la caja.

En estudios previos se reporta mayor cuidado materno las 4 h siguientes a su reunión con las crías, como un mecanismo compensatorio al tiempo que no estuvieron juntas, sin modificar el tiempo total de cuidado entre las madres que se

sometieron a SM y las controles (113); no obstante, está demostrado que los periodos de ausencia de la madre sí provocan una activación del eje adrenal en las crías (114).

En cuanto al efecto del estrés por ML, lo reportado es la disminución en el tiempo de conductas como lactancia con la espalda arqueada e incremento en el tiempo que la madre deja solas a las crías (66;82). A pesar de que en este estudio no se observaron alteraciones en dichas conductas, un mayor número de crías fueron dejadas fuera de la zona de cuidado por la madre y ésta pasó menos tiempo acicalando a la camada comparada con las madres control. La interpretación es de mayor descuido y cuidado errático por parte de la madre por las condiciones del entorno a las que estuvo sometida.

En ambos modelos se evidenció el efecto del estrés. Por la separación de sus crías las madres con SM tuvieron aumento en la concentración sérica de corticosterona e hipertrofia de la glándula adrenal y las de ML también presentaron hipertrofia de la glándula adrenal que ya se ha descrito en las madres sometidas al modelo de ML desde el día post-natal 9, acompañada de un incremento de corticosterona en suero (82). Dado que en el presente estudio la determinación de la concentración de corticosterona y del peso adrenal fue realizada el día 21 post-natal, es posible que debido a esto no se observara el incremento de corticosterona, mientras que la hipertrofia de la glándula adrenal no es reversible (115), razón por la cual este parámetro provocado en la semana de estrés prevaleció.

Así, se puede establecer que ambos modelos provocaron estrés en las madres y era posible esperar la activación del eje adrenal en las crías (114).

CRÍAS AL DESTETE

Al analizar los cambios en el peso corporal derivados del estrés post-natal, se observó que la SM no modificó la ganancia de peso corporal durante la lactancia contrario al incremento reportado por Ryu et. al en 2008 (106). Sin embargo, se ha descrito que el paradigma de SM disminuye el peso corporal al destete cuando se aplica del día 2 al 14 post-natal por 4 horas (116) o por 3 horas pero durante los 21 días del periodo de lactancia (117).

Lo anterior parece indicar que la disminución en el peso corporal en estos 2 trabajos se debe a mayor tiempo de SM, lo que disminuye la disponibilidad de alimento de las crías y las conduce a una menor ganancia de peso. El incremento en la conducta de lactancia de las madres sometidas a SM al regresarlas con sus crías pareció normalizar el consumo de leche y de esta forma no se observó diferencia en el peso corporal al destete de crías con SM comparado con los controles.

Sin embargo, los parámetros de estrés no se normalizaron con el cuidado de la madre, ya que de acuerdo a lo reportado aunque el tiempo o frecuencia total de cada parámetro de cuidado no cambia en SM (113), el patrón de conducta secuencial de la madre sí se altera (94) generando incrementos en la concentración de corticosterona sérica (114). Así, el incremento del peso adrenal y de la corticosterona sérica de las crías, indicó que los animales con SM estuvieron estresados al destete. Esto es importante porque la lactancia es un periodo sensible para el desarrollo de la respuesta normal del eje HPA en los adultos (118).

En cuanto a la expresión génica en el NPV de los animales con SM, se observó una regulación normal de la retroalimentación negativa del eje HPA puesto que la expresión del GR disminuyó en respuesta al incremento de corticosterona (119); además, la expresión de la CRH fue igual a la del grupo control, lo que apoya la funcionalidad normal del eje a esta edad.

No obstante, la expresión génica del CRH-R2 en el NPV se incrementó comparada con los controles. Nuestros datos no sugieren que el cambio en la

expresión fuera debido a un contenido incrementado de la CRH en este núcleo, puesto que otros han mostrado que la inyección i.c.v. de la CRH no modifica la expresión del CRH-R2 en NPV (120). El posible efecto de los GC también es controversial puesto que el promotor del gen del CRH-R2 tiene elementos de respuesta al GR (121;122) pero ni la inyección de corticosterona, ni la adrenalectomía parecen aumentar su síntesis en el NPV(47).

Por lo tanto la activación de la expresión de este receptor pudo resultar de un proceso activo de desensibilización por la unión continua de la UCN-2, que por su mayor afinidad, parece ser el ligando específico para el CRH-R2 (35). Aunque no se conoce completamente el funcionamiento de este péptido, es sintetizado en el mismo NPV (52) y liberado con el estrés agudo de inmovilidad (55) por lo que podría ser un candidato responsable a la modificación de la síntesis del CRH-R2 observada.

La activación constante del receptor incrementa el contenido intracelular de AMPc, con la posterior estimulación de la actividad de la PKA (123), quien puede fosforilar a los receptores desensibilizándolos (35). Esto es importante porque el incremento en el contenido del ARNm de receptores unidos a proteínas G está relacionado con menor capacidad de unión a su ligando, tal como se ha descrito para el receptor de neurotensina {Souaze, 1997 155, por un proceso de desensibilización que involucra la internalización del receptor /id;de Gortari, 2009 67 /id}; además, dado que la región promotora del gen del CRH-R2 tiene un sitio para CREB fosforilado, el aumento en la actividad de la PKA puede fosforilar también a CREB permitiendo su unión al promotor y estimulando de esta forma la expresión del gen del CRH-R2(124).

La activación del CRH-R2 por la UCN-2 y la UCN-3 induce el incremento del contenido del RNAm de c-fos, de la CRH y de la vasopresina en neuronas parvocelulares del NPV, con un consecuente incremento en la concentración de la ACTH y la de corticosterona séricas (125).

El análisis del contenido de proteína CRH-R2 y de la unión a su ligando (UCN-2) proveería información acerca de la funcionalidad del receptor y de la posible

participación de la UCN-2 en la desensibilización e incremento en la expresión del CRH-R2 en el NPV.

Cuando se compararon los cambios observados entre las crías al destete de los 2 paradigmas, observamos que las crías con ML presentaron disminución en el peso corporal al día 21 lo que ya se había reportado previamente pero en el día 9 (81;126). Esto pudo deberse, a que las crías que quedaron fuera de la zona de cuidado no tuvieron la misma oportunidad de lactar y la desnutrición en este periodo no se revirtió el día del destete sino hasta periodos posteriores como se ha observado en otros trabajos (127). No obstante, ni la concentración de corticosterona sérica ni el peso de la glándula adrenal se incrementaron al destete aunque estos parámetros aumentan el día 9 post-natal (126); esto indica que el eje HPA se normalizó en los animales con ML y que funcionó de manera similar al del control el día 21 post-natal.

A diferencia de los animales con SM, en el grupo de ML la síntesis del CRH-R2 en el NPV no se modificó al destete, en tanto que la de la CRH disminuyó. Esta expresión a la baja se ha observado desde el día 9 aunque en este periodo se acompaña con incremento de corticosterona sérica y disminución en la expresión del GR en el NPV (126), lo que no se observa al día 21, por lo que otro factor parece favorecer la inhibición en la síntesis de la CRH del NPV. En este sentido, se ha propuesto a la hiperactivación del CRH-R1 del hipocampo como responsable (104) porque genera liberación de glutamato (128;129) hacia neuronas GABAérgicas de los núcleos basales de la *stria terminalis* cuyas proyecciones a neuronas CRHérgicas del NPV inhiben la síntesis de la hormona (24). En el presente trabajo la expresión del CRH-R1 del hipocampo resultó incrementada lo que favorecería su participación en la inhibición de la síntesis de la CRH del NPV.

Los cambios observados en la vía de la CRH del sistema límbico también fueron diferentes dependiendo del modelo de estrés utilizado. En los animales con ML la amígdala, que tiene proyecciones al NPV no mostró cambios, mientras que en los de SM hubo expresión a la alta de CRH-R1 que se ha relacionado con

comportamiento ansioso en animales adultos sometidos a estrés crónico incluyendo el pre-natal (130;131) así como en la abstinencia de animales con dependencia al alcohol y a cocaína (que están más ansiosos que en condiciones basales) (132;133) en los que se ha reportado un incremento en la expresión de CRH-R1 en la amígdala, que se relaciona con mayor activación del receptor. Un posible efector del aumento de CRH-R1 es el glutamato, ya que la estimulación de la vía glutamatérgica de la amígdala por estrés, induce mayor expresión del receptor asociado a conductas ansiosas (133); esto pudo ocurrir en los animales con SM.

De manera opuesta, en el hipocampo de los animales expuestos a SM disminuyó la expresión del CRH-R1 y como se mencionó anteriormente incrementó en los animales con ML.

Aunque la expresión de la CRH no se modificó en el hipocampo bajo ningún paradigma de estrés, el contenido de la hormona no se determinó y la inhibición en la expresión del CRH-R1 hipocampal, se propone como un mecanismo neuroprotector a los efectos excito-tóxicos de la CRH cuando se presenta estrés psicosocial en adultos (66) acompañado de disminución en el número de receptores (134), similar a lo observado en SM; esto podría derivar del incremento en la concentración de GC (135) puesto que el promotor de CRH-R1 tiene secuencias consenso para la unión del GR (GRE) (35).

Por otro lado, si dicha inhibición no estuvo presentándose, la hiperactivación del receptor CRH-R1 se ha asociado a alteraciones en la memoria y aprendizaje observadas en el modelo de ML (84) puesto que la administración de un antagonista a este receptor (NBI 30775) del día 10 al 17 revierte dichas alteraciones aún en la adultez (136). No podemos definir cuál fue el mecanismo o el factor involucrado en el cambio de expresión del CRH-R1, podría ser por una excesiva liberación de la CRH del hipocampo la cual, actúa localmente en la remodelación dendrítica (29). Por lo tanto la determinación del contenido de la CRH y la unión de los receptores CRH-R1 hipocampales en los 2 modelos facilitaría la interpretación de dichos cambios en la expresión génica de la vía CRHérgica del hipocampo de los animales al destete.

El GR del hipocampo, cuya activación también forma parte de la retroalimentación negativa del eje HPA disminuyó su expresión en el grupo con SM y permaneció similar al control en los de ML, probablemente como respuesta al contenido diferencial de corticosterona sérica entre los dos grupos con estrés (119) incrementada únicamente en SM.

Por lo anterior podemos resumir que aunque ambos modelos de estrés post-natal provocaron cambios en la vía de la CRH al destete, éstos fueron diferenciales dependiendo del paradigma utilizado: El de SM provocó activación del eje adrenal sin alterar la retroalimentación negativa provocando inhibición de la síntesis del GR y la CRH del hipotálamo y el sistema límbico, aunque los sujetos sometidos a este paradigma podrían presentar ansiedad derivada de los cambios en los CRH-R1 de la amígdala y alteraciones en el consumo de alimento derivadas del incremento en la expresión del CRH-R2 del NPV. En cambio, el modelo de ML provocó disminución del peso corporal e inhibición de la síntesis de la CRH en el NPV hipotalámico, probablemente relacionada con activación en la retroalimentación negativa del hipocampo por la estimulación del CRH-R1.

ADULTEZ

Inicialmente analizamos los cambios que sufre el eje HPA y la expresión de la CRH, sus receptores y el de GC en la respuesta al estrés agudo por nado forzado en el grupo control, en donde se observaron: el incremento esperado en la concentración de corticosterona sérica, con la consecuente disminución en la expresión del GR en el NPV al estar incrementado su ligando (119) y el incremento en la síntesis de la CRH en el NPV lo cual puede representar un mecanismo compensatorio a la liberación del péptido (137). Es decir, el sacrificio de los animales fue temporalmente anterior a que fuera efectiva la retroalimentación negativa de la corticosterona sobre la CRH.

A pesar de que el estrés agudo eleva la liberación de la vasopresina en el hipotálamo, no es efectivo para incrementar su concentración sérica (138). Esto explica por qué los animales sometidos a nado no tuvieron aumentados los niveles de vasopresina en sangre.

La prueba de nado forzado no modificó la expresión de los receptores a la CRH en el NPV. La administración de la CRH i.c.v. incrementa la expresión del CRH-R1 (120), mientras que los GC la inhiben (135), juntos pudieron haber anulado su efecto en el NPV similar a lo observado en animales sometidos a estrés agudo por inmovilidad (135).

La expresión del CRH-R2 del NPV tampoco se modifica por la CRH i.c.v. o corticosterona (120;135), lo que concuerda con nuestros resultados.

En la amígdala, la síntesis de la CRH o la del GR no cambió en animales control sometidos al nado; esto es similar a otros reportes que describen que el estrés agudo incrementa la liberación de la CRH pero no su expresión en esta región (21;139;140); además, se conoce que la expresión del GR en la amígdala disminuye con la administración de corticosterona crónica (141) e incrementa con una exposición prolongada a estrés severo (142) pero no se sabe cómo se modifica con un estrés moderado como el nado forzado.

La expresión del CRH-R1 que aumentó en la amígdala de los animales control con nado, pudo deberse a la estimulación por el factor de transcripción nuclear NF- κ B (143), cuya actividad se incrementa en la amígdala (y no en el hipocampo) de

animales ante situaciones de miedo condicionado (144). El promotor del gen del CRH-R1 tiene tres secuencias consenso para NF- κ B (143), por lo que aunque es especulativo, las dos sesiones de nado pudieron estimularlo y afectar la expresión del CRH-R1 en la amígdala.

Similar a lo reportado por Drolet y Rivest (140), no se modificó la expresión de la CRH ni del CRH-R1 del hipocampo, aún cuando se reporta aumento en la liberación del péptido lo que favorece cambios plásticos en el aprendizaje y la adaptación al estrés (29). La síntesis del GR tampoco cambió, en contraste con la disminución descrita en animales con estrés agudo por inmovilidad (119). Aunque, se sabe que la naturaleza del estrés es determinante para los cambios del GR (145) y las dos sesiones de nado, el tiempo que duraron y la intensidad del estrés difieren de los modelos de estrés por inmovilidad.

De los 2 paradigmas de estrés post-natal analizados se encontró que el de SM provocó más alteraciones en la expresión de los genes de interés y en la concentración sérica de hormonas en animales adultos; mientras que el de ML modificó de manera particular la expresión génica en el sistema límbico de los animales sometidos a la prueba de nado.

Estrés por SM

Situaciones de estrés en la infancia como abuso o la pérdida de un padre, se han relacionado con el desarrollo de alteraciones psiquiátricas en la adultez, dentro de las cuales se encuentran depresión, ansiedad, abuso de sustancias, trastornos de personalidad y alimentarios (146;147). Para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados se ha utilizado el modelo de SM en roedores y se ha observado que reproduce comportamientos depresivos (79), ansiosos (148) e incluso hiperfagia en animales adultos (106).

La hiperfagia de los animales con SM se ha vinculado con respuestas atenuadas a estímulos de recompensa por una estimulación constante del eje adrenal (149); que también se presenta en pacientes con ansiedad y depresión (90). La liberación de la CRH y la activación de sus receptores en el sistema límbico se ha

asociado con mayor liberación de dopamina del núcleo accumbens (150), que provoca la desensibilización de receptores D2 (151); de tal modo, que en estas condiciones los animales carecen de la señal de terminación de una comida o de estar saciados (149). Los dos receptores a la CRH se han asociado con los efectos del péptido en la liberación de dopamina(150), pero es al CRH-R2 al que se ha vinculado con el efecto anorexigénico del mismo.

La estimulación del CRH-R2 en el HVM se ha relacionado a hipofagia (35;45). En el NPV no se ha establecido su función, pero la expresión de este receptor permaneció incrementada en el NPV de las ratas adultas con SM (desde el destete). Otros no encuentran cambio ni en la expresión ni en la unión de la CRH al CRH-R2 en el NPV de ratas adultas con SM (94), aunque la expresión, determinada por hibridación *in situ* es menos sensible que la de PCR punto final utilizada aquí.

Como se había mencionado previamente este aumento en la expresión del CRH-R2 observado desde el destete, puede interpretarse como desensibilización porque de manera inversa, ratas con anorexia que presentan menor síntesis del receptor, comen un poco más tras la inyección en NPV de un antagonista específico de éste, por lo que la menor síntesis del receptor implicaría mayor actividad del mismo (48) contrario a lo encontrado con la SM.

Se plantea que la desensibilización del CRH-R2 podría ser por la unión de la UCN-2 que se sintetiza en el NPV respondiendo al estrés (55) y a la administración de GC (152) y es más potente que la CRH inhibiendo la actividad del receptor tipo 2 (153). Es factible que el aumento en la síntesis del CRH-R2 con inhibición en su funcionalidad tuviera relación con la hiperfagia de SM; que es lo opuesto a lo observado en ratas con anorexia (48).

Lo anterior apoya la participación de este receptor en el efecto anorexigénico de la CRH no sólo en el HVM (45) sino también en el NPV en donde la administración de la CRH también inhibe el consumo de alimento (154) y el receptor que se expresa con mayor densidad en este núcleo hipotalámico es el CRH-R2 (123).

La expresión del otro receptor (CRH-R1) disminuyó en el NPV de SM, lo que se ha observado tanto por el estrés crónico (inmovilidad) (155), como por la administración de corticosterona por 14 días (156). Esto sugiere que el modelo de SM fue efectivo y pudo prolongar el estado estresado del animal hasta la adultez.

La inhibición de la expresión del receptor por los GC en el NPV y en la pituitaria forma parte de la regulación negativa normal del eje (157).

Otros parámetros de estrés crónico que encontramos en los animales con SM y que se habían reportado previamente, son el incremento en la expresión de la CRH en el NPV (87) y mayor concentración de corticosterona sérica basal (158), evidenciando un bloqueo de la retroalimentación negativa.

También se ha reportado incremento en el ARNm de la vasopresina en NPV y aunque no se determinó la expresión de vasopresina, el grupo con SM presentó incremento en su concentración sérica. Esto concuerda con el hecho de que el estrés crónico incrementa la liberación de vasopresina de las terminales nerviosas de las neuronas parvocelulares del NPV a la circulación portahipofisiaria (138) en donde actúa junto con la CRH estimulando la liberación de la ACTH al unirse a su receptor V1b en la pituitaria (159) manteniendo incrementada la actividad del eje adrenal (138;160).

Puesto que los animales adultos con SM no presentaron disminuida expresión del GR en el NPV como sucedió en el destete, es posible que exista un bloqueo de la retroalimentación negativa del eje HPA por GC a través del GR.

En la amígdala del grupo con SM se mantuvo incrementada la expresión del CRH-R1 observada desde el destete. Como se mencionó previamente esto se relaciona con ansiedad de los animales (130;132) (131), conducta que se presenta en adultos con SM cuando son sometidos a la prueba de laberinto elevado en cruz (148).

El hipocampo de los animales con SM también mantuvo disminuida la síntesis del CRH-R1 quizá como efecto del aumento en corticosterona (35;135); por lo que el efecto de la SM sobre la expresión del CRH-R1 pareció región-específico.

El estrés crónico generalmente provoca disminución de la síntesis del GR del hipocampo (2); sin embargo, en los animales con SM la expresión del GR resultó incrementada y aunque no se ha estudiado en adultos, la administración de leptina en neonatos incrementa la síntesis del GR en el giro dentado del hipocampo y en el NPV (161). Como los animales con SM presentaron mayor ganancia de peso, es factible suponer que tuvieran mayor concentración sérica de leptina, la cual favorecería la síntesis del GR hipocampal y del NPV región en la que se encontró igual a la del grupo control aún cuando SM presentó incremento de corticosterona que debería inhibir su expresión(119)

SM con nado

La prueba de nado forzado permite analizar e identificar el comportamiento tipo depresivo en modelos animales (107) y representa un estímulo estresante agudo (162); en donde se evidencian las adaptaciones que previamente se dieron con el estrés crónico, ya que en ocasiones no se presenta la respuesta esperada del eje.

En animales adultos con SM que han sufrido modificaciones en el funcionamiento del eje, aumenta la concentración de la ACTH basal (antes de un nuevo estímulo estresante) y se observa menor respuesta al estrés agudo por inmovilidad (148).

Algo similar ocurrió con el nado ya que en los animales con SM no se presentó mayor concentración de corticosterona o vasopresina séricas, y la expresión de la CRH del NPV disminuyó posterior al nado, al comparar estos parámetros con los de SM sin nado.

Esto podría resultar de la desensibilización del eje por las concentraciones elevadas de GC y la alteración de la retroalimentación negativa por el GR (148;163).

La conducta de SM en la prueba de nado fue interpretada como depresiva o de desesperanza pues tuvo mayor frecuencia de inmovilidad que el grupo control (107). Este tipo de conducta se ha relacionado con menor cantidad de la proteína de los receptores a la CRH en la pituitaria por estrés crónico (164;165) y por estrés psicosocial (134). De igual forma pacientes deprimidas presentan concentraciones incrementadas de la CRH y la vasopresina en fluido cerebroespinal y una

respuesta atenuada de la ACTH a la administración de la CRH exógena (166) lo que indica una alteración en la respuesta a un nuevo estrés.

La expresión del CRH-R1 aunque no difiere de la del control con nado, tampoco es diferente de la de SM sin nado, que estuvo disminuida contra la del control. Así, no se puede describir un aumento en la síntesis del receptor por el nado en SM, puesto que no difiere de la de ningún grupo.

En cuanto a la participación del CRH-R2 del NPV en la conducta depresiva presente en los animales con SM y cuya expresión regresó a niveles control posterior al nado, es factible suponer que estuvo desensibilizado en estado basal; animales knock-out para el CRH-R2 presentan conducta depresiva (167;168) al igual que los administrados i.c.v. con oligonucleótidos antisentido al CRH-R2 (169) y, en contraste la administración i.c.v. de la UCN-2 y la UCN-3 tiene efectos antidepresivos (170).

La probable inhibición del CRH-R2 parece correlacionarse con la funcionalidad del eje adrenal, ya que su expresión disminuida por la inyección de oligonucleótidos antisentido atenúa la estimulación del CRH sobre el eje HPA (171). Por lo que si esta vía se encontrara efectivamente inhibida, explicaría en parte la inhibición de la respuesta al estrés, aunque en estado basal estuvieran estresados.

Estos factores hacen relevante el estudio del efecto en la inhibición del CRH-R2 del NPV con un antagonista específico (asv30) sobre la conducta alimentaria y depresiva de ratas adultas.

Por otro lado, en el sistema límbico (amígdala e hipocampo), ninguno de los parámetros evaluados se modificó en SM-nado al comparar con los animales control-nado. Sin embargo, la expresión del CRH-R1 disminuyó en la amígdala y aumentó en el hipocampo de animales sometidos a la prueba, comparado con SM basal. En ese sentido, pareciera que un nuevo estímulo agudo restablece el funcionamiento del sistema permitiendo la respuesta ante retos posteriores (131) (172) aunque la vulnerabilidad del animal al comportamiento ansioso y depresivo permanece.

Estrés por ML

Este grupo tuvo al igual que el de SM mayor consumo de alimento después del destete y mayor ganancia de peso que el grupo control aunque se normalizó hacia el final del experimento. Se propone que el incremento en el consumo de alimento se presentó en respuesta al bajo peso que tenían al destete y favoreció transitoriamente la ganancia de peso; este mismo modelo de estrés post-natal aplicado en ratones también disminuye el peso corporal en el periodo temprano y se normaliza en la adultez (173). También es factible que fuera un estancamiento momentáneo y que si el experimento fuera más largo, se siguiera evidenciando el mayor peso vs. los controles, o que presentaran mayor susceptibilidad al aumento de peso comparado con los no estresados si se les ofreciera a ambos grupos una alimentación alta en grasa o muy palatable (174;175) que es un efecto observado en animales adultos con estrés crónico.

Ni la expresión génica de proteínas relacionadas con la vía de la CRH en el NPV, ni la concentración sérica de la corticosterona de los animales con ML fue diferente de la del grupo control; lo cual nos permite señalar que el eje adrenal de los animales adultos estuvo normal en estado basal y por lo tanto el estrés por ML tuvo menos consecuencias a largo plazo que el de SM en el periodo post-natal.

Sin embargo, en la amígdala hay menor síntesis de la CRH y en el hipocampo se mantuvo el incremento en la síntesis del CRH-R1 observado desde el destete.

Ambos factores son capaces de alterar procesos de consolidación de la memoria (176) observados en animales con ML (66;104)

La disminuida síntesis de CRH de la amígdala podría relacionarse con una inhibida estimulación por corticosterona (141;177) debido a que, aunque no fue significativo, la concentración sérica de esta hormona tuvo la tendencia a disminuir vs los controles. La menor expresión de la CRH en la amígdala podría participar en el incrementado consumo de alimento de ML, puesto que la inyección de la CRH a la amígdala disminuye el consumo de alimento y si éste no se sintetiza ni libera, podría generar mayor ingesta alimentaria (178).

Por lo que aunque ambos modelos de estrés post-natal provocaron incremento del consumo de alimento, los mecanismos parecen ser diferentes.

ML con nado

Puesto que en ratones sometidos a ML hay hiperreactividad del eje adrenal (173) y ésta se relaciona con la patogénesis de depresión en otros modelos (81) pretendíamos encontrar un comportamiento depresivo en los animales adultos con ML; sin embargo, éste no se presentó ni tampoco la hiperreactividad del eje, ya que los cambios observados en respuesta al estrés agudo por nado fueron similares a los del grupo control con nado y diferentes a los de SM con nado que no respondieron al estrés. Estos cambios fueron: aumento de la corticosterona sérica, inhibición en la expresión del GR e incremento en la de la CRH en el NPV.

Un factor determinante que participó en la normalización de la respuesta de estos animales al estrés agudo, fue un estado de inhibición de la respuesta de la amígdala. Esto lo sugirió el hecho de que no hubo incremento en la síntesis de CRH vs el basal que ya estaba disminuida, y que suele responder al incremento de corticosterona. Aunque los mecanismos que favorecen la inhibición de la síntesis de la CRH en la amígdala de ML no se conocen, pudo existir una disminución en la señalización por PKC que en la amígdala, se ha vinculado con menor expresión de la CRH (179) pero esto aún no se ha definido.

En cambio, podemos descartar una alterada señalización por el GR ya que sí pareció activo, debido a que disminuyó su expresión con el aumento de corticosterona.

En el hipocampo, el nado inhibió la expresión del CRH-R1 probablemente por la liberación de la CRH activándolo. Aunque la expresión de la CRH hipocampal no cambió, no conocemos si el contenido del péptido en esta estructura sí se modificó por el nado, inhibiendo la síntesis del receptor en los animales con ML que ya presentaban alteraciones en la síntesis y funcionalidad del receptor desde el destete.

CONCLUSIONES

Los modelos animales de estrés post-natal por SM y ML provocaron aumento en el consumo de alimento asociado al incremento en la expresión génica del receptor CRH-R2 del NPV en SM y a la inhibición de la síntesis de la CRH en la amígdala de los animales con ML. Las alteraciones en el funcionamiento del eje adrenal fueron diferenciales dependiendo del tipo de estrés aplicado, siendo más severo el de SM porque inhibió la respuesta de los animales adultos ante un nuevo estímulo estresante y provocó conducta depresiva.

Por el contrario el estrés por ML provocó adaptaciones que le permitieron al animal tener una respuesta normal al estrés y un eje HPA normal en condiciones basales.

PERSPECTIVAS

Las perspectivas de este trabajo son el análisis del efecto de la administración crónica del antagonista a CRH-R2 asv-30 intra-NPV en animales adultos para determinar el consumo de alimento y la conducta depresiva, caracterizando la participación de dicho receptor en estas conductas.

También se pretende determinar si la proteína CRH-R2 y su unión al ligando se encuentra alterada en el NPV de animales con el paradigma de SM, factores que estarían involucrados en el incremento de la síntesis del receptor y las alteraciones de su funcionalidad en la conducta alimentaria y depresiva.

REFERENCIAS

- (1) Coste SC, Murray SE, Stenzel-Poore MP. Animal models of CRH excess and CRH receptor deficiency display altered adaptations to stress. *Peptides* 2001 May;22(5):733-41.
- (2) Herman JP, Adams D, Prewitt C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology* 1995 Feb;61(2):180-90.
- (3) Whitnall MH. Stress selectively activates the vasopressin-containing subset of corticotropin-releasing hormone neurons. *Neuroendocrinology* 1989 Dec;50(6):702-7.
- (4) Palkovits M. Anatomy of neural pathways affecting CRH secretion. *Ann N Y Acad Sci* 1987;512:139-48.
- (5) Holsboer F, Barden N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev* 1996 Apr;17(2):187-205.
- (6) Nelson DH. Cushing's syndrome. *Endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.; 1989.

- (7) Zacharko RM, Bowers WJ, Kokkinidis L, Anisman H. Region-specific reductions of intracranial self-stimulation after uncontrollable stress: possible effects on reward processes. *Behav Brain Res* 1983 Aug;9(2):129-41.
- (8) Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, et al. International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev* 2006 Dec;58(4):782-97.
- (9) Joels M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 2009 Jun;10(6):459-66.
- (10) Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 1983;36(3):165-86.
- (11) Jacobson L, Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 1991 May;12(2):118-34.
- (12) Gray TS. Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. *Ann N Y Acad Sci* 1993 Oct 29;697:53-60.
- (13) Petrov T, Krukoff TL, Jhamandas JH. Branching projections of catecholaminergic brainstem neurons to the paraventricular hypothalamic nucleus and the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res* 1993 Apr 23;609(1-2):81-92.
- (14) Davis M, Whalen PJ. The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* 2001 Jan;6(1):13-34.
- (15) Duvarci S, Pare D. Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. *J Neurosci* 2007 Apr 18;27(16):4482-91.
- (16) Feldman S, Conforti N, Siegel RA. Adrenocortical responses following limbic stimulation in rats with hypothalamic deafferentations. *Neuroendocrinology* 1982;35(3):205-11.
- (17) CHAPMAN WP, SCHROEDER HR, GEYER G, BRAZIER MA, FAGER C, POPPEN JL, et al. Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man. *Science* 1954 Dec 3;120(3127):949-50.
- (18) Campeau S, Davis M. Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J Neurosci* 1995 Mar;15(3 Pt 2):2312-27.
- (19) Makino S, Gold PW, Schulkin J. Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 1994 Mar 21;640(1-2):105-12.
- (20) Shepard JD, Barron KW, Myers DA. Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. *Brain Res* 2000 Apr 10;861(2):288-95.
- (21) Merali Z, McIntosh J, Kent P, Michaud D, Anisman H. Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. *J Neurosci* 1998 Jun 15;18(12):4758-66.
- (22) Honkaniemi J, Peltto-Huikko M, Rechartd L, Isola J, Lammi A, Fuxe K, et al. Colocalization of peptide and glucocorticoid receptor immunoreactivities in rat central amygdaloid nucleus. *Neuroendocrinology* 1992 Apr;55(4):451-9.
- (23) Hannibal J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 2002 Jul;309(1):73-88.
- (24) Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci* 2007 Feb 21;27(8):2025-34.
- (25) De Groote L, Linthorst AC. Exposure to novelty and forced swimming evoke stressor-dependent changes in extracellular GABA in the rat hippocampus. *Neuroscience* 2007 Sep 7;148(3):794-805.

- (26) Herman JP, Schafer MK, Young EA, Thompson R, Douglass J, Akil H, et al. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neurosci* 1989 Sep;9(9):3072-82.
- (27) Sapolsky RM, Zola-Morgan S, Squire LR. Inhibition of glucocorticoid secretion by the hippocampal formation in the primate. *J Neurosci* 1991 Dec;11(12):3695-704.
- (28) Bradbury M, Dallman MF. Effects of hippocampal type 1 and type 2 glucocorticoid antagonists on ACTH levels in the PM. In "Program of the 19th Annual Meeting of the Society for Neuroscience,". Phoenix, AZ, .; 1989 p. 716.
- (29) Chen Y, Andres AL, Frotscher M, Baram TZ. Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system. *Front Cell Neurosci* 2012;6:13.
- (30) Blank T, Nijholt I, Eckart K, Spiess J. Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress: implications for hippocampus-dependent learning. *J Neurosci* 2002 May 1;22(9):3788-94.
- (31) Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, et al. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005 Dec;29(8):1214-24.
- (32) Goto Y, Otani S, Grace AA. The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective. *Neuropharmacology* 2007 Oct;53(5):583-7.
- (33) Gallagher JP, Orozco-Cabal LF, Liu J, Shinnick-Gallagher P. Synaptic physiology of central CRH system. *Eur J Pharmacol* 2008 Apr 7;583(2-3):215-25.
- (34) Potter E, Behan DP, Fischer WH, Linton EA, Lowry PJ, Vale WW. Cloning and characterization of the cDNAs for human and rat corticotropin releasing factor-binding proteins. *Nature* 1991 Jan 31;349(6308):423-6.
- (35) Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 2006 May;27(3):260-86.
- (36) Dautzenberg FM, Braun S, Hauger RL. GRK3 mediates desensitization of CRF1 receptors: a potential mechanism regulating stress adaptation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001 Apr;280(4):R935-R946.
- (37) Papadopoulou N, Chen J, Randeve HS, Levine MA, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. Protein kinase A-induced negative regulation of the corticotropin-releasing hormone R1alpha receptor-extracellularly regulated kinase signal transduction pathway: the critical role of Ser301 for signaling switch and selectivity. *Mol Endocrinol* 2004 Mar;18(3):624-39.
- (38) Grammatopoulos DK, Chrousos GP. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab* 2002 Dec;13(10):436-44.
- (39) Penalva RG, Flachskamm C, Zimmermann S, Wurst W, Holsboer F, Reul JM, et al. Corticotropin-releasing hormone receptor type 1-deficiency enhances hippocampal serotonergic neurotransmission: an in vivo microdialysis study in mutant mice. *Neuroscience* 2002;109(2):253-66.
- (40) Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, et al. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* 1998 Jun;19(2):162-6.
- (41) Heinrichs SC, Richard D. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides* 1999 Oct;33(5):350-9.
- (42) Liebsch G, Landgraf R, Gerstberger R, Probst JC, Wotjak CT, Engelmann M, et al. Chronic infusion of a CRH1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. *Regul Pept* 1995 Oct 20;59(2):229-39.
- (43) Vale W, Vaughan J, Perrin M. Corticotropin-releasing factor (CRF) family of ligands and their receptors. *The Endocrinologist* 1997;7:3S-9.
- (44) Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, et al. Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 2000 Apr;24(4):403-9.

- (45) Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 2000 Apr;24(4):410-4.
- (46) Pelley MA, Joppa M, Carmouche M, Cullen MJ, Brown B, Murphy B, et al. Role of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in the anorexic syndrome induced by CRF. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 Jun;293(3):799-806.
- (47) Makino S, Nishiyama M, Asaba K, Gold PW, Hashimoto K. Altered expression of type 2 CRH receptor mRNA in the VMH by glucocorticoids and starvation. *Am J Physiol* 1998 Oct;275(4 Pt 2):R1138-R1145.
- (48) de Gortari P, Mancera K, Cote-Velez A, Amaya MI, Martinez A, Jaimes-Hoy L, et al. Involvement of CRH-R2 receptor in eating behavior and in the response of the HPT axis in rats subjected to dehydration-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology* 2009 Feb;34(2):259-72.
- (49) Poulin AM, Lenglos C, Mitra A, Timofeeva E. Hypothalamic expression of urocortin 3 and the type 2 corticotropin-releasing factor receptor is regulated according to feeding state in lean but not obese Zucker rats. *Neuropharmacology* 2012 Jul;63(1):147-53.
- (50) Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, et al. Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 2000 Apr;24(4):415-9.
- (51) Reul JM, Holsboer F. On the role of corticotropin-releasing hormone receptors in anxiety and depression. *Dialogues Clin Neurosci* 2002 Mar;4(1):31-46.
- (52) Hashimoto K, Nishiyama M, Tanaka Y, Noguchi T, Asaba K, Hossein PN, et al. Urocortins and corticotropin releasing factor type 2 receptors in the hypothalamus and the cardiovascular system. *Peptides* 2004 Oct;25(10):1711-21.
- (53) Ozawa M, Oki Y, Watanabe F, Iino K, Masuzawa M, Iwabuchi M, et al. Effect of urocortin and its interaction with adrenocorticotropin (ACTH) secretagogues on ACTH release. *Peptides* 1998;19(3):513-8.
- (54) Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, et al. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Feb 27;98(5):2843-8.
- (55) Tanaka Y, Makino S, Noguchi T, Tamura K, Kaneda T, Hashimoto K. Effect of stress and adrenalectomy on urocortin II mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 2003 Jul;78(1):1-11.
- (56) Chen P, Vaughan J, Donaldson C, Vale W, Li C. Injection of Urocortin 3 into the ventromedial hypothalamus modulates feeding, blood glucose levels, and hypothalamic POMC gene expression but not the HPA axis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010 Feb;298(2):E337-E345.
- (57) Joels M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ. Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol* 2007 Aug;28(2-3):72-96.
- (58) Arase K, York DA, Shimizu H, Shargill N, Bray GA. Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol* 1988 Sep;255(3 Pt 1):E255-E259.
- (59) Suarez M, Fiol de CM, Vincenti L, Ruiz RD. Changes in corticosterone levels and sperm functional activity by chronic stress in rats. *Arch Physiol Biochem* 1996;104(3):351-6.
- (60) Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Horsley CJ, Milligan ED, Bhatnagar S, et al. Interactions among chronic cold, corticosterone and puberty on energy intake and deposition. *Stress* 1999 Dec;3(2):131-46.
- (61) Werder Kv. Pituitary response to stress in Cushing's disease. *ACTA Endocrinologica* 1971;1(67):127-40.
- (62) Chrousos GP. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000 Jun;24 Suppl 2:S50-S55.
- (63) Gyengesi E, Liu ZW, D'Agostino G, Gan G, Horvath TL, Gao XB, et al. Corticosterone regulates synaptic input organization of POMC and NPY/AgRP neurons in adult mice. *Endocrinology* 2010 Nov;151(11):5395-402.

- (64) Kaplan Z, Iancu I, Bodner E. A review of psychological debriefing after extreme stress. *Psychiatr Serv* 2001 Jun;52(6):824-7.
- (65) Sandi C, Loscertales M, Guaza C. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur J Neurosci* 1997 Apr;9(4):637-42.
- (66) Brunson KL, Kramar E, Lin B, Chen Y, Colgin LL, Yanagihara TK, et al. Mechanisms of late-onset cognitive decline after early-life stress. *J Neurosci* 2005 Oct 12;25(41):9328-38.
- (67) Welberg LA, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol* 2001 Feb;13(2):113-28.
- (68) Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Dev Neurosci* 1998 Jun;16(3-4):149-64.
- (69) Vazquez DM. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 1998 Oct;23(7):663-700.
- (70) Avishai-Eliner S, Eghbal-Ahmadi M, Tabachnik E, Brunson KL, Baram TZ. Down-regulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (mRNA) precedes early-life experience-induced changes in hippocampal glucocorticoid receptor mRNA. *Endocrinology* 2001 Jan;142(1):89-97.
- (71) Meaney MJ, Aitken DH. The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Brain Res* 1985 Oct;354(2):301-4.
- (72) Eghbal-Ahmadi M, Avishai-Eliner S, Hatalski CG, Baram TZ. Differential regulation of the expression of corticotropin-releasing factor receptor type 2 (CRF2) in hypothalamus and amygdala of the immature rat by sensory input and food intake. *J Neurosci* 1999 May 15;19(10):3982-91.
- (73) van Oers HJ, de Kloet ER, Whelan T, Levine S. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J Neurosci* 1998 Dec 1;18(23):10171-9.
- (74) Levine S, Huchton DM, Wiener SG, Rosenfeld P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev Psychobiol* 1991 Dec;24(8):547-58.
- (75) Schmidt M, Enthoven L, van Woezik JH, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *J Neuroendocrinol* 2004 Jan;16(1):52-7.
- (76) Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res* 2002 Sep 20;950(1-2):52-63.
- (77) Meaney MJ, Aitken DH, Bhatnagar S. Postnatal handling attenuates neuroendocrine, anatomical, and cognitive impairments related to the aged hippocampus. *Science* 1988;238:766-8.
- (78) Molina SM, Suarez MM, Rivarola MA. Behavioral and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to anterodorsal thalamic nuclei lesions and variable chronic stress in maternally separated rats. *Int J Dev Neurosci* 2006 Aug;24(5):319-26.
- (79) Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, et al. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res* 2007 May;58(1):32-9.
- (80) Heim C, Owens MJ, Plotsky PM. Endocrine factors in the pathophysiology of mental disorders: persistent changes in corticotropin-releasing factor systems due to early life stress: relationship to the pathophysiology of major depression and post-traumatic stress disorder. *Psychopharmacol* 1997;33:185.
- (81) Gilles EE, Schultz L, Baram TZ. Abnormal corticosterone regulation in an immature rat model of continuous chronic stress. *Pediatr Neurol* 1996 Sep;15(2):114-9.
- (82) Ivy AS, Brunson KL, Sandman C, Baram TZ. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience* 2008 Jun 26;154(3):1132-42.
- (83) Fenoglio KA, Brunson KL, Baram TZ. Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. *Front Neuroendocrinol* 2006 Jul;27(2):180-92.

- (84) Ivy AS, Rex CS, Chen Y, Dube C, Maras PM, Grigoriadis DE, et al. Hippocampal dysfunction and cognitive impairments provoked by chronic early-life stress involve excessive activation of CRH receptors. *J Neurosci* 2010 Sep 29;30(39):13005-15.
- (85) UNICEF. State of the world's children 2006. UNICEF 2005.
- (86) Spinelli S, Chefer S, Suomi SJ, Higley JD, Barr CS, Stein E. Early-life stress induces long-term morphologic changes in primate brain. *Arch Gen Psychiatry* 2009 Jun;66(6):658-65.
- (87) Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1993 May;18(3):195-200.
- (88) Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, et al. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 1984 Dec 14;226(4680):1342-4.
- (89) Modell S, Yassouridis A, Huber J, Holsboer F. Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients. *Neuroendocrinology* 1997 Mar;65(3):216-22.
- (90) Holsboer F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 2001 Jan;62(1-2):77-91.
- (91) Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron* 2002 Mar 28;34(1):13-25.
- (92) Zobel AW, Nickel T, Kunzel HE, Ackl N, Sonntag A, Ising M, et al. Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J Psychiatr Res* 2000 May;34(3):171-81.
- (93) Bradley RG, Binder EB, Epstein MP, Tang Y, Nair HP, Liu W, et al. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Arch Gen Psychiatry* 2008 Feb;65(2):190-200.
- (94) Plotsky PM, Thiruvikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology* 2005 Dec;30(12):2192-204.
- (95) Uchoa ET, da Silva LE, de CM, Antunes-Rodrigues J, Elias LL. Corticotrophin-releasing factor mediates hypophagia after adrenalectomy, increasing meal-related satiety responses. *Horm Behav* 2010 Nov;58(5):714-9.
- (96) Roberts C, Troop N, Connan F, Treasure J, Campbell IC. The effects of stress on body weight: biological and psychological predictors of change in BMI. *Obesity (Silver Spring)* 2007 Dec;15(12):3045-55.
- (97) Kent A, Waller G, Dagnan D. A greater role of emotional than physical or sexual abuse in predicting disordered eating attitudes: the role of mediating variables. *Int J Eat Disord* 1999 Mar;25(2):159-67.
- (98) Pollice C, Kaye WH, Greeno CG, Weltzin TE. Relationship of depression, anxiety, and obsessiveness to state of illness in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 1997 May;21(4):367-76.
- (99) Bulik CM, Thornton L, Pinheiro AP, Plotnicov K, Klump KL, Brandt H, et al. Suicide attempts in anorexia nervosa. *Psychosom Med* 2008 Apr;70(3):378-83.
- (100) Bjerkeset O, Romundstad P, Evans J, Gunnell D. Association of adult body mass index and height with anxiety, depression, and suicide in the general population: the HUNT study. *Am J Epidemiol* 2008 Jan 15;167(2):193-202.
- (101) Macht M, Gerer J, Ellgring H. Emotions in overweight and normal-weight women immediately after eating foods differing in energy. *Physiol Behav* 2003 Nov;80(2-3):367-74.
- (102) Halligan SL, Herbert J, Goodyer I, Murray L. Disturbances in morning cortisol secretion in association with maternal postnatal depression predict subsequent depressive symptomatology in adolescents. *Biol Psychiatry* 2007 Jul 1;62(1):40-6.
- (103) Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 1999 Jan;160(1):1-12.
- (104) Brunson KL, Grigoriadis DE, Lorang MT, Baram TZ. Corticotropin-releasing hormone (CRH) downregulates the function of its receptor (CRF1) and induces CRF1 expression in hippocampal and cortical regions of the immature rat brain. *Exp Neurol* 2002 Jul;176(1):75-86.

- (105) Litvin Y, Tovote P, Pentkowski NS, Zeyda T, King LB, Vasconcellos AJ, et al. Maternal separation modulates short-term behavioral and physiological indices of the stress response. *Horm Behav* 2010 Jul;58(2):241-9.
- (106) Ryu V, Lee JH, Yoo SB, Gu XF, Moon YW, Jahng JW. Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Int J Obes (Lond)* 2008 Sep;32(9):1355-62.
- (107) Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1977 Oct;229(2):327-36.
- (108) Abel EL. Physiological correlates of the forced swim test in rats. *Physiol Behav* 1993 Aug;54(2):309-17.
- (109) Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 1995 Sep;121(1):66-72.
- (110) Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5 ed. USA: ELSEVIER Academic Press; 2005.
- (111) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 Apr;162(1):156-9.
- (112) Maniam J, Morris MJ. The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology* 2012 Jul;63(1):97-110.
- (113) Macri S, Mason GJ, Wurbel H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *Eur J Neurosci* 2004 Aug;20(4):1017-24.
- (114) McCormick CM, Kehoe P, Kovacs S. Corticosterone release in response to repeated, short episodes of neonatal isolation: evidence of sensitization. *Int J Dev Neurosci* 1998 Jun;16(3-4):175-85.
- (115) Kresiun VI, Rozhkovskii I. [Effect of psychotropic drugs on the structure and function of the adrenal glands of control and stressed animals]. *Probl Endokrinol (Mosk)* 1992 May;38(3):41-4.
- (116) Ruedi-Bettschen D, Feldon J, Pryce CR. Circadian- and temperature-specific effects of early deprivation on rat maternal care and pup development: short-term markers for long-term effects? *Dev Psychobiol* 2004 Sep;45(2):59-71.
- (117) McIntosh J, Anisman H, Merali Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res* 1999 Mar 12;113(1-2):97-106.
- (118) Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W. Effects of early life stress on brain activity: Implications from maternal separation model in rodents. *Gen Comp Endocrinol* 2012 Sep 29.
- (119) Noguchi T, Makino S, Matsumoto R, Nakayama S, Nishiyama M, Terada Y, et al. Regulation of glucocorticoid receptor transcription and nuclear translocation during single and repeated immobilization stress. *Endocrinology* 2010 Sep;151(9):4344-55.
- (120) Mansi JA, Rivest S, Drolet G. Regulation of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus by exogenous CRF. *Endocrinology* 1996 Nov;137(11):4619-29.
- (121) Chen A, Perrin M, Brar B, Li C, Jamieson P, Digruccio M, et al. Mouse corticotropin-releasing factor receptor type 2alpha gene: isolation, distribution, pharmacological characterization and regulation by stress and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 2005 Feb;19(2):441-58.
- (122) Catalano RD, Kyriakou T, Chen J, Easton A, Hillhouse EW. Regulation of corticotropin-releasing hormone type 2 receptors by multiple promoters and alternative splicing: identification of multiple splice variants. *Mol Endocrinol* 2003 Mar;17(3):395-410.
- (123) Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, et al. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Jan 31;92(3):836-40.
- (124) Nanda SA, Roseboom PH, Nash GA, Speers JM, Kalin NH. Characterization of the human corticotropin-releasing factor2(a) receptor promoter: regulation by glucocorticoids and the cyclic adenosine 5'-monophosphate pathway. *Endocrinology* 2004 Dec;145(12):5605-15.

- (125) Maruyama H, Makino S, Noguchi T, Nishioka T, Hashimoto K. Central type 2 corticotropin-releasing hormone receptor mediates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activation in the rat. *Neuroendocrinology* 2007;86(1):1-16.
- (126) Avishai-Eliner S, Gilles EE, Eghbal-Ahmadi M, Bar-El Y, Baram TZ. Altered regulation of gene and protein expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis components in an immature rat model of chronic stress. *J Neuroendocrinol* 2001 Sep;13(9):799-807.
- (127) Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, et al. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* 2008 Feb;149(2):470-5.
- (128) Liu J, Yu B, Neugebauer V, Grigoriadis DE, Rivier J, Vale WW, et al. Corticotropin-releasing factor and Urocortin I modulate excitatory glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* 2004 Apr 21;24(16):4020-9.
- (129) Chen Y, Brunson KL, Adelman G, Bender RA, Frotscher M, Baram TZ. Hippocampal corticotropin releasing hormone: pre- and postsynaptic location and release by stress. *Neuroscience* 2004;126(3):533-40.
- (130) Brunton PJ, Donadio MV, Russell JA. Sex differences in prenatally programmed anxiety behaviour in rats: differential corticotropin-releasing hormone receptor mRNA expression in the amygdaloid complex. *Stress* 2011 Nov;14(6):634-43.
- (131) Hishinuma T, Asakura M, Nagashima H, Sasuga Y, Fujii S, Tanaka D, et al. [Effect of chronic variable stress on limbic corticotropin-releasing hormone receptor]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 2005 Feb;25(1):19-24.
- (132) Sommer WH, Rimondini R, Hansson AC, Hippskind PA, Gehlert DR, Barr CS, et al. Upregulation of voluntary alcohol intake, behavioral sensitivity to stress, and amygdala *crhr1* expression following a history of dependence. *Biol Psychiatry* 2008 Jan 15;63(2):139-45.
- (133) Pollandt S, Liu J, Orozco-Cabal L, Grigoriadis DE, Vale WW, Gallagher JP, et al. Cocaine withdrawal enhances long-term potentiation induced by corticotropin-releasing factor at central amygdala glutamatergic synapses via CRF, NMDA receptors and PKA. *Eur J Neurosci* 2006 Sep;24(6):1733-43.
- (134) Fuchs E, Flugge G. Modulation of binding sites for corticotropin-releasing hormone by chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 1995;20(1):33-51.
- (135) Makino S, Tanaka Y, Nazarloo HP, Noguchi T, Nishimura K, Hashimoto K. Expression of type 1 corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus following restraint stress in CRH-deficient mice. *Brain Res* 2005 Jun 28;1048(1-2):131-7.
- (136) Fenoglio KA, Brunson KL, Avishai-Eliner S, Stone BA, Kapadia BJ, Baram TZ. Enduring, handling-evoked enhancement of hippocampal memory function and glucocorticoid receptor expression involves activation of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. *Endocrinology* 2005 Sep;146(9):4090-6.
- (137) Lightmans L, Harbuz MS. Expression of corticotropin releasing factor mRNA in response to stress. In *Corticotropin Releasing Factor*. Chichester: Wiley; 1993 p. 173-98.
- (138) Wotjak CT, Ganster J, Kohl G, Holsboer F, Landgraf R, Engelmann M. Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: new insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. *Neuroscience* 1998 Aug;85(4):1209-22.
- (139) Herringa RJ, Nanda SA, Hsu DT, Roseboom PH, Kalin NH. The effects of acute stress on the regulation of central and basolateral amygdala CRF-binding protein gene expression. *Brain Res Mol Brain Res* 2004 Nov 24;131(1-2):17-25.
- (140) Drolet G, Rivest S. Corticotropin-releasing hormone and its receptors; an evaluation at the transcription level in vivo. *Peptides* 2001 May;22(5):761-7.
- (141) Tran L, Greenwood-Van MB. Altered expression of glucocorticoid receptor and corticotropin-releasing factor in the central amygdala in response to elevated corticosterone. *Behav Brain Res* 2012 Oct 1;234(2):380-5.

- (142) Ganon-Elazar E, Akirav I. Cannabinoids and traumatic stress modulation of contextual fear extinction and GR expression in the amygdala-hippocampal-prefrontal circuit. *Psychoneuroendocrinology* 2013 Feb 20.
- (143) Zocco D, McMorro JP, Murphy EP. Histamine modulation of peripheral CRH receptor type 1alpha expression is dependent on Ca(2+) signalling and NF-kappaB/p65 transcriptional activity. *Mol Immunol* 2010 Apr;47(7-8):1426-37.
- (144) Yeh SH, Lin CH, Lee CF, Gean PW. A requirement of nuclear factor-kappaB activation in fear-potentiated startle. *J Biol Chem* 2002 Nov 29;277(48):46720-9.
- (145) Herman JP, Watson SJ, Spencer RL. Defense of adrenocorticosteroid receptor expression in rat hippocampus: effects of stress and strain. *Endocrinology* 1999 Sep;140(9):3981-91.
- (146) Rorty M, Yager J. Histories of childhood trauma and complex post-traumatic sequelae in women with eating disorders. *Psychiatr Clin North Am* 1996 Dec;19(4):773-91.
- (147) Furukawa TA, Ogura A, Hirai T, Fujihara S, Kitamura T, Takahashi K. Early parental separation experiences among patients with bipolar disorder and major depression: a case-control study. *J Affect Disord* 1999 Jan;52(1-3):85-91.
- (148) Daniels WM, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis* 2004 Jun;19(1-2):3-14.
- (149) Matthews K, Robbins TW. Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 2003 Jan;27(1-2):45-55.
- (150) Lemos JC, Wanat MJ, Smith JS, Reyes BA, Hollon NG, Van Bockstaele EJ, et al. Severe stress switches CRF action in the nucleus accumbens from appetitive to aversive. *Nature* 2012 Oct 18;490(7420):402-6.
- (151) Subramaniam S, Lucki I, McGonigle P. Effects of chronic treatment with selective agonists on the subtypes of dopamine receptors. *Brain Res* 1992 Feb 7;571(2):313-22.
- (152) Chen A, Vaughan J, Vale WW. Glucocorticoids regulate the expression of the mouse urocortin II gene: a putative connection between the corticotropin-releasing factor receptor pathways. *Mol Endocrinol* 2003 Aug;17(8):1622-39.
- (153) Gutknecht E, Hauger RL, Van dL, I, Vauquelin G, Dautzenberg FM. Expression, binding, and signaling properties of CRF2(a) receptors endogenously expressed in human retinoblastoma Y79 cells: passage-dependent regulation of functional receptors. *J Neurochem* 2008 Feb;104(4):926-36.
- (154) Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS, Morley JE. Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res* 1988 Mar 8;443(1-2):63-9.
- (155) Bonaz B, Rivest S. Effect of a chronic stress on CRF neuronal activity and expression of its type 1 receptor in the rat brain. *Am J Physiol* 1998 Nov;275(5 Pt 2):R1438-R1449.
- (156) Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, Gold PW. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology* 1995 Oct;136(10):4517-25.
- (157) Pozzoli G, Bilezikjian LM, Perrin MH, Blount AL, Vale WW. Corticotropin-releasing factor (CRF) and glucocorticoids modulate the expression of type 1 CRF receptor messenger ribonucleic acid in rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology* 1996 Jan;137(1):65-71.
- (158) Veenema AH, Neumann ID. Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. *Psychoneuroendocrinology* 2009 Apr;34(3):463-7.
- (159) Aguilera G, Subburaju S, Young S, Chen J. The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Prog Brain Res* 2008;170:29-39.
- (160) de Goeij DC, Kvetnansky R, Whitnall MH, Jezova D, Berkenbosch F, Tilders FJ. Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin-releasing factor in the median eminence of rats. *Neuroendocrinology* 1991 Feb;53(2):150-9.

- (161) Proulx K, Clavel S, Nault G, Richard D, Walker CD. High neonatal leptin exposure enhances brain GR expression and feedback efficacy on the adrenocortical axis of developing rats. *Endocrinology* 2001 Nov;142(11):4607-16.
- (162) Bilanz-Bleuel A, Ulbricht S, Chandramohan Y, De CS, Droste SK, Reul JM. Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response. *Eur J Neurosci* 2005 Oct;22(7):1691-700.
- (163) Ladd CO, Thirivikraman KV, Huot RL, Plotsky PM. Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology* 2005 Jul;30(6):520-33.
- (164) Hauger RL, Lorang M, Irwin M, Aguilera G. CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. *Brain Res* 1990 Nov 5;532(1-2):34-40.
- (165) Aguilera G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol Metab* 1998 Oct 1;9(8):329-36.
- (166) Newport DJ, Heim C, Owens MJ, Ritchie JC, Ramsey CH, Bonsall R, et al. Cerebrospinal fluid corticotropin-releasing factor (CRF) and vasopressin concentrations predict pituitary response in the CRF stimulation test: a multiple regression analysis. *Neuropsychopharmacology* 2003 Mar;28(3):569-76.
- (167) Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:525-57.
- (168) Todorovic C, Sherrin T, Pitts M, Hippel C, Rayner M, Spiess J. Suppression of the MEK/ERK signaling pathway reverses depression-like behaviors of CRF2-deficient mice. *Neuropsychopharmacology* 2009 May;34(6):1416-26.
- (169) Liebsch G, Landgraf R, Engelmann M, Lorsch P, Holsboer F. Differential behavioural effects of chronic infusion of CRH 1 and CRH 2 receptor antisense oligonucleotides into the rat brain. *J Psychiatr Res* 1999 Mar;33(2):153-63.
- (170) Tanaka M, Telegdy G. Antidepressant-like effects of the CRF family peptides, urocortin 1, urocortin 2 and urocortin 3 in a modified forced swimming test in mice. *Brain Res Bull* 2008 Mar 28;75(5):509-12.
- (171) Smagin GN, Howell LA, Ryan DH, De Souza EB, Harris RB. The role of CRF2 receptors in corticotropin-releasing factor- and urocortin-induced anorexia. *Neuroreport* 1998 May 11;9(7):1601-6.
- (172) O'Malley D, Dinan TG, Cryan JF. Neonatal maternal separation in the rat impacts on the stress responsivity of central corticotropin-releasing factor receptors in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)* 2011 Mar;214(1):221-9.
- (173) Rice CJ, Sandman CA, Lenjavi MR, Baram TZ. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology* 2008 Oct;149(10):4892-900.
- (174) Dallman MF, Warne JP, Foster MT, Pecoraro NC. Glucocorticoids and insulin both modulate caloric intake through actions on the brain. *J Physiol* 2007 Sep 1;583(Pt 2):431-6.
- (175) Zeeni N, Daher C, Fromentin G, Tome D, Darcel N, Chaumontet C. A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress* 2013 Mar;16(2):211-9.
- (176) Bernabeu R, Izquierdo I, Cammarota M, Jerusalinsky D, Medina JH. Learning-specific, time-dependent increase in [3H]phorbol dibutyrate binding to protein kinase C in selected regions of the rat brain. *Brain Res* 1995 Jul 10;685(1-2):163-8.
- (177) Yao M, Schulkin J, Denver RJ. Evolutionarily conserved glucocorticoid regulation of corticotropin-releasing factor expression. *Endocrinology* 2008 May;149(5):2352-60.
- (178) Jochman KA, Newman SM, Kalin NH, Bakshi VP. Corticotropin-releasing factor-1 receptors in the basolateral amygdala mediate stress-induced anorexia. *Behav Neurosci* 2005 Dec;119(6):1448-58.
- (179) Lesscher HM, McMahon T, Lasek AW, Chou WH, Connolly J, Kharazia V, et al. Amygdala protein kinase C epsilon regulates corticotropin-releasing factor and anxiety-like behavior. *Genes Brain Behav* 2008 Apr;7(3):323-33.