



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Farmacología

**Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la expresión de
receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales y la respuesta endocrina al
estrés en la rata**

TESIS

QUE PRESENTA

Susana Alejandra Mendoza Contreras

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

FARMACOLOGÍA

Director de Tesis

Dr. José Antonio Terrón Sierra

Este trabajo estuvo apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, a través del programa de Becas Nacionales 2014 en su segundo periodo, y fue realizado en el departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. José Antonio Terrón Sierra.

ÍNDICE

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES GENERALES.....	4
Estrés.....	4
Fisiología del estrés.....	6
Sistema nervioso simpático.....	7
Hipotálamo.....	7
Glándula pituitaria.....	10
Glándulas adrenales.....	12
Cortisol.....	12
Sistema de regulación del eje HPA.....	14
Sistema serotoninérgico.....	15
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	17
El sistema serotoninérgico como regulador del eje HPA.....	17
El estrés crónico como inductor de la desregulación del eje HPA.....	18
Papel de los receptores 5-HT ₇ en la sobreproducción de glucocorticoides bajo condiciones de estrés crónico.....	23
Posible papel de los glucocorticoides en las alteraciones del eje HPA y el sistema serotoninérgico.....	24
El tratamiento crónico con CORT como inductor de cambios en el sistema serotoninérgico.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS.....	30

OBJETIVOS.....	31
METODOLOGÍA.....	32
Animales.....	32
Tratamiento crónico con corticosterona.....	32
Perfusión intracardiaca.....	32
Inmunohistoquímica contra los receptores 5-HT₇.....	33
Inmunohistoquímica contra la 5-HT.....	33
Microscopía.....	34
Inducción de estrés agudo.....	34
Determinación del cambio en la ganancia del peso corporal y el tamaño del timo y las GA.....	35
Determinación de los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona.....	35
Cuantificación del receptor 5-HT₇ en las glándulas adrenales.....	35
Obtención de membranas.....	36
Western blot.....	36
Análisis estadístico.....	37
Fármacos.....	37
Diseño experimental.....	37
RESULTADOS.....	39
Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre las variables somatométricas.....	39
Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales.....	41
Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a 5-HT en las glándulas adrenales.....	42
Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la cantidad de proteína de los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales.....	44
Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona en presencia y ausencia de estrés agudo por restricción de movimiento.....	45
DISCUSIÓN.....	47
Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre los parámetros somatométricos.....	48
Posible relación entre los glucocorticoides y la expresión de receptores 5-HT₇ a nivel adrenocortical.....	50
Alteraciones en el sistema endócrino en respuesta al estrés agudo ocasionadas por el tratamiento crónico con corticosterona.....	52

Relación entre el aumento de los niveles circundantes de corticosterona y la expresión de receptores 5-HT₇ en la corteza adrenal.....	54
Alteraciones de la 5-HT inducidas por el tratamiento crónico con corticosterona.....	56
CONCLUSIÓN.....	57
PERSPECTIVAS.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindol acético
5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
8-OH-DPAT	8-hidroxi-dipropilaminotetralina
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADH	Hormona antidiurética
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BSA	Albúmina de suero bovino
cm	Centímetros
CRF	Factor liberador de corticotropina
CTRL	Control
CYP	Citocromo P-450
CYP17	17 α -hidroxiliasa
dL	Decilitros
DRE	Desordenes relacionados con el estrés
FSH	Hormona estimulante de los folículos ováricos
g	Gramos
GH	Hormona del crecimiento
h	Horas
HPA	Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal
IR	Inmunorreactividad
LH	Hormona luteinizante
M	Molaridad
mg	Miligramos

min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MSH	Hormona estimulante de los melanocitos
NPV	Núcleo paraventricular del hipotálamo
NPY	Neuropéptido Y
PBS	Solución estándar de fosfato-salina
PFA	Paraformaldehído
PKA	Proteína cinasa A
PRL	Prolactina
s	Segundos
s.c.	Subcutánea
SNS	Sistema nervioso simpático
T-5-HT	Transportador de serotonina
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
VEH	Vehículo
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Respuesta del sistema homeostático según su actividad.
- Figura 2.** Organización del sistema nervioso.
- Figura 3.** Núcleos y áreas hipotalámicas.
- Figura 4.** Comunicación entre el hipotálamo y la glándula pituitaria.
- Figura 5.** Esteroidogénesis.
- Figura 6.** Sistema de retroalimentación negativa del eje HPA.
- Figura 7.** Niveles basales de CORT después de doce sesiones de estrés crónico por derrota social.
- Figura 8.** Secreción de corticosterona en respuesta a estrés agudo por restricción de movimiento después de 14 días de EC por restricción de movimiento.
- Figura 9.** Secreción de ACTH en respuesta a estrés agudo por restricción de movimiento después de 14 días de estrés crónico por restricción de movimiento.
- Figura 10.** Efecto del estrés crónico sobre la inmunorreactividad a la 5-HT en glándulas adrenales de la rata.
- Figura 11.** Efecto del estrés crónico sobre la inmunorreactividad a la 5-HT₇ en glándulas adrenales de la rata.
- Figura 12.** Efecto del estrés crónico sobre la expresión de los receptores 5-HT₇ en glándulas adrenales de la rata.
- Figura 13.** Efecto de un antagonista de los receptores 5-HT₇, SB-656104, sobre la secreción de corticosterona en respuesta a estrés agudo por restricción de movimiento después de 14 días de estrés crónico por restricción de movimiento.
- Figura 14.** Inmunofluorescencia a Ki67, un indicador de división celular en glándulas adrenales de ratas sometidas a estrés crónico.
- Figura 15.** Inmunohistoquímica a los receptores 5-HT₇ en adenomas bilaterales causados por el síndrome de Cushing independiente de ACTH.
- Figura 16.** Efectos del tratamiento agudo y crónico con corticosterona sobre la unión a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}.
- Figura 17.** Protocolo experimental.
- Figura 18.** Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la ganancia de peso corporal.
- Figura 19.** Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a los receptores 5-HT₇ en la glándula adrenal izquierda.

- Figura 20.** Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a los receptores 5-HT₇ en la glándula adrenal derecha.
- Figura 21.** Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a la 5-HT en la glándula adrenal izquierda.
- Figura 22.** Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a la 5-HT en la glándula adrenal derecha.
- Figura 23.** Efecto del tratamiento crónico con corticosterona (CORT) en comparación con el vehículo (VEH) sobre la cantidad de proteína de los receptores 5-HT₇ en glándulas adrenales completas.
- Figura 24.** Secreción de ACTH en respuesta al estrés agudo por restricción de movimiento (restricción de movimiento) en animales sometidos a un tratamiento crónico con CORT y su vehículo (VEH).
- Figura 25.** Secreción de CORT en respuesta al estrés agudo por restricción de movimiento (restricción de movimiento) en animales sometidos a un tratamiento crónico con CORT y su vehículo (VEH).

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Funciones de los núcleos hipotalámicos.
- Tabla 2.** Tipos y funciones de los receptores serotoninérgicos
- Tabla 3.** Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre el peso relativo de las glándulas adrenales y el timo.

RESUMEN

La desregulación del eje hipotálmo-pituitaria-adrenal (HPA), principal sistema de control de la respuesta al estrés en el organismo, es una alteración clave en los desórdenes relacionados con el estrés (DRE), como la depresión, los desórdenes de ansiedad y las enfermedades cardiovasculares y metabólicas, entre otros. Se cree que el estrés crónico representa un factor clave en el desarrollo de la disfunción endocrina, la cual se caracteriza principalmente por la secreción exacerbada de las hormonas glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona [CORT] en roedores). Por otro lado, se ha documentado que la administración crónica de glucocorticoides induce alteraciones similares a las observadas bajo condiciones de estrés crónico. Recientemente, nuestro grupo demostró que la exposición repetida a estrés por restricción de movimiento en ratas (20 min/día durante 14 días) induce un estado de estrés crónico caracterizado por hipersecreción de CORT y disminución de la secreción de la hormona adrenocorticotropica (ACTH) en respuesta al estrés agudo por restricción de movimiento. La secreción de CORT bajo tales condiciones es mediada por receptores a la serotonina (5-HT) del tipo 5-HT₇, cuya expresión aumentó marcadamente en las glándulas adrenales, aparentemente a nivel de la corteza, con respecto de lo observado en animales control. En concordancia con estas observaciones, existen datos clínicos que indican que en tumores adrenales humanos hipersecretorios de glucocorticoides, la elevada producción de estas hormonas se asocia con la expresión ectópica de receptores 5-HT₇ en la corteza adrenal y una elevada potencia de la 5-HT para estimular su secreción vía la activación de dichos receptores. Con base en lo anterior, planteamos la hipótesis de que la exposición crónica a niveles elevados de glucocorticoides promueve la expresión de mecanismos ectópicos adrenocorticales hiperproductores de glucocorticoides los cuales son independientes, al menos en parte, de la secreción de ACTH. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de un tratamiento crónico de CORT (50 mg/kg/día durante 14 días) en ratas sobre 1) la inmunoreactividad a los receptores 5-HT₇ (IR-5-HT₇) y a la 5-HT (IR-5-HT) en las glándulas adrenales; 2) la cantidad de proteína de los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales; y 3) los niveles circulantes de ACTH y CORT en ausencia y presencia de estrés agudo. Dos grupos de ratas Wistar macho (180 a 220 g de peso corporal) recibieron tratamiento crónico con vehículo (VEH; 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina al 20%; 1 ml/kg, s.c.) y CORT (50 mg/kg, s.c.), respectivamente, durante 14 días. Un día después de finalizados los tratamientos (día 15), los animales de ambos grupos fueron subdivididos para: a) ser

perfundidos con paraformaldehído al 4% vía la aorta ascendente para la realización posterior de ensayos de inmunohistoquímica contra los receptores 5-HT₇ y la 5-HT en cortes de las glándulas adrenales; y b) ser decapitados sin tratamiento adicional alguno (0 min) o inmediatamente después de recibir una sesión de estrés agudo por restricción de movimiento durante 10 y 30 min para la obtención de muestras de sangre del tronco y determinación posterior de los niveles de ACTH y CORT mediante kits de inmunoensayo (Elisa); las glándulas adrenales y el timo fueron extraídos para medir su peso, sirviendo las primeras para determinar la proteína de los receptores 5-HT₇ mediante ensayos de Western blot. El tratamiento crónico con CORT, a diferencia del VEH, produjo involución del timo así como una reducción significativa de la ganancia de peso corporal; sin embargo, a diferencia del estrés crónico, este tratamiento produjo involución de las glándulas adrenales. En concordancia relativa con lo reportado en animales sometidos a estrés crónico, la exposición crónica a niveles elevados de CORT produjo un aumento moderado de la IR-5-HT₇ y la IR-5-HT en la corteza de las glándulas adrenales; el aumento de la expresión de receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales fue confirmado por Western blot. Así mismo, el tratamiento crónico con CORT produjo una reducción significativa de los niveles circulantes de ACTH solamente en el grupo que recibió estrés agudo por restricción de movimiento durante 10 min; en los otros 2 grupos (0 y 30 min) se observó una tendencia a la baja como resultado del tratamiento con CORT. En cuanto a la secreción de CORT sin embargo, no se observó cambio alguno entre los tratamientos (VEH y CORT), excepto en el grupo sin estrés agudo (0 min) en el que los niveles de CORT fueron significativamente mayores en el grupo que recibió CORT, posiblemente como resultado de la última inyección del glucocorticoide el día anterior. Tomados en su conjunto, los resultados del presente trabajo dan cierto soporte a la hipótesis de que las alteraciones hormonales (ACTH y CORT) producidas por el estrés crónico, las cuales parecen ser causadas por la sobre expresión de receptores 5-HT₇ y el aumento de los niveles de 5-HT a nivel de la corteza adrenal, son dependientes de los glucocorticoides. Excepto en el caso de la hipertrofia de las glándulas adrenales, las alteraciones somatométricas producidas por el estrés crónico (involución del timo y reducción de la ganancia de peso corporal) parecen ser dependientes de los glucocorticoides.

ABSTRACT

Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which is the major stress response system of the body, is a common feature of stress-related disorders including affective diseases such as depression and anxiety, and systemic pathologies such as arterial hypertension and type II diabetes, among others. It is believed that chronic stress may play a key role in the development of endocrine dysfunction, which involves abnormal secretion of glucocorticoids (cortisol in humans and corticosterone [CORT] in rodents). It has also been documented that chronic administration of glucocorticoids induces a number of alterations closely resembling those observed in chronic stress conditions. Recently, we reported that chronic restraint stress (CRS) in rats (20 in/day for 14 days) induces a chronic stress state characterized by increased CORT secretion and decreased adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion in response to acute stress. Under these conditions, CORT release appears to be mediated by serotonin (5-HT) 5-HT₇ receptors as acute stress-induced secretion of this hormone was restored to that observed in control animals by pretreatment with a selective 5-HT₇ receptor antagonist. In addition, expression of 5-HT₇ receptors increased markedly in the cortex of adrenal glands with respect to that observed in control animals; similarly, 5-HT immunoreactivity in the adrenal cortex as well as 5-HT levels in whole AGs increased significantly with respect to corresponding measurements in control tissues. Remarkably, clinical data have reported ectopic expression of 5-HT₇ receptors in the cortex of cortisol hypersecreting adrenal adenomas and ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasias in humans. Interestingly, 5-HT exhibits a high potency to evoke cortisol secretion in these tissues via activation of 5-HT₇ receptors. On the basis of the above, we hypothesized that increased expression of adrenocortical 5-HT₇ receptors and 5-HT levels in the adrenal glands as well as the endocrine changes observed in chronically stressed animals are glucocorticoid-dependent. Therefore, the aim of the present work was to investigate the effect of a chronic treatment with high doses of CORT in rats on 1) 5-HT₇ receptor-like immunoreactivity (5-HT₇-RLI) and protein and 5-HT-like immunoreactivity (5-HT-LI) in the adrenal cortex; and 2) the endocrine response (ACTH y CORT) induced by acute restraint stress (0, 10 and 30 min). Two groups of male Wistar rats received a chronic treatment with vehicle (VEH; 1 ml/kg, s.c.) and CORT (50 mg/kg, s.c.), respectively, for 14 days. One day after completion of treatments (on day 15), animals from each group were subdivided into two subgroups for: a) perfusion with 4% paraformaldehyde via the ascending aorta and

subsequent performance of immunohistochemistry assays for 5-HT₇ receptors and 5-HT in the adrenal glands sections; and b) decapitation with no additional treatment (0 min) or immediately after an acute restraint stress session for 10 and 30 min in order to obtain trunk blood samples for measurement of ACTH and CORT levels by commercially available immunoassay kits (Elisa); adrenal glands and thymus were obtained, weighted and, in the case of the former, used for Western blot assays to measure the amount of 5-HT₇ receptor protein. chronic CORT treatment, unlike VEH, induced thymus involution and a significant reduction of body weight gain; nonetheless, unlike CRS, CORT treatment produced involution of adrenal glands. In support of our hypothesis, chronic CORT treatment induced a modest increase of 5-HT₇-RLI and 5-HT-LI in the adrenal cortex concomitant with an increase in the amount of 5-HT₇ receptor protein in whole adrenal glands. The magnitude of the above changes in 5-HT₇-LI and 5-HT-LI however was clearly lower as compared to that of CRS. Chronic CORT treatment on the other hand led to magnified restraint-induced ACTH secretion at 10 min of restraint only; a trend toward a decrease was noticed at 0 and 30 min of restraint. In the case of CORT secretion, CORT treatment produced no change of restraint-induced secretion (10 and 30 min) but led to a significant increase of CORT levels at baseline levels (0 min). The present data suggest that chronic stress-induced adrenocortical changes underlying hypercorticoemia (i.e. increase of 5-HT₇ receptors and 5-HT) and acute restraint-induced ACTH (but not CORT) secretion are partly dependent on glucocorticoids.

INTRODUCCIÓN

Se conoce como estrés al conjunto de respuestas que el organismo genera cuando su equilibrio se encuentra amenazado o cuando existe la percepción de que así es. Para hacer frente a la adversidad el organismo cuenta con una serie de recursos que incluyen al eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) que, al ser activado, promueve la liberación de diversos mediadores (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y citosinas, entre otros), cuya función es iniciar una serie de respuestas destinadas a reestablecer la homeóstasis (Chrousos, 2009). Sin embargo, la activación repetitiva del eje HPA por períodos prolongados de tiempo ocasiona una desregulación en su funcionamiento lo que conlleva a una serie de alteraciones y patologías conocidos como desórdenes relacionados con el estrés (DRE) (Nieuwenhuijsen y col., 2010). Entre estos destacan los desórdenes afectivos (como la depresión, la ansiedad, el trastorno obsesivo compulsivo y la anorexia nervosa), los desórdenes metabólicos (como la obesidad, la diabetes tipo 2 y la hipertensión arterial), así como la osteoporosis, las deficiencias inmunitarias y las cardiopatías, entre otros (Chrousos, 2000,2009).

Los DRE presentan como característica común una disfunción endocrina que consiste en la secreción anormal de hormonas glucocorticoides, sustancias con la capacidad de alterar la transcripción de más de doscientos genes (Tokarski y col, 2009), lo cual podría representar a su vez el sustrato de las alteraciones genéticas propias de cada padecimiento. Tanto en la práctica clínica como en estudios animales se ha reportado que la disfunción endocrina en estados relacionados con el estrés crónico puede involucrar una disociación entre la secreción de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona [CORT] en roedores) y la secreción de su precursor, la hormona adrenocorticotropica (ACTH) (Bornstein y col., 2008; García-Iglesias y col., 2013; Louiset y col., 2006). Tales observaciones han sugerido la existencia de vías alternas de producción de glucocorticoides, las cuales podrían operar de manera independiente a la secreción de ACTH vía mecanismos que parecen involucrar a los sistemas nervioso e inmune, entre otros (Bornstein y Chrousos, 1999).

Se sabe que la 5-HT ejerce una función reguladora sobre el eje HPA a través de la estimulación de la liberación de CRF y ACTH. Si bien no se sabe con certeza cuales son los

tipos de receptores involucrados en este mecanismo, los resultados de diversos estudios sugieren la

participación de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} y 5-HT₇ (Jørgensen y col., 1999; Pan y Gilbert, 1992; García-Iglesias y col., 2013).

Recientemente, nuestro grupo reportó que la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento (restricción de movimiento; 20 min/día, durante 14 días) produce un aumento significativo de la secreción de CORT inducida por estrés agudo, el cual se vio abolido por el tratamiento con un antagonista de los receptores 5-HT₇ (García-Iglesias y col., 2013). Asimismo, los animales con historial de estrés crónico presentaron un aumento de la inmunorreactividad a los receptores 5-HT₇ (IR-5-HT₇) y a la 5-HT (IR-5-HT) en la corteza de las glándulas adrenales, siendo el aumento de la expresión de los receptores 5-HT₇ y de los niveles de 5-HT en las glándulas adrenales confirmado por Western blot y HPLC, respectivamente (García-Iglesias y col., 2013). En concordancia con estas observaciones, estudios clínicos han demostrado que la expresión ectópica de receptores 5-HT₇ en la corteza adrenal en tumores adrenales humanos se relaciona con elevados niveles circulantes de cortisol (Louiset y col., 2006). No obstante de que estos cambios a nivel de las glándulas adrenales son sugerentes de una estrecha relación entre el estrés crónico, la expresión de receptores 5-HT₇ adrenocorticales y el desarrollo de la hipercorticoemia en los DRE, a la fecha se desconoce si tales alteraciones son dependientes de los glucocorticoides.

Desde el punto de vista experimental, la administración crónica de CORT busca emular la liberación exacerbada de glucocorticoides ocurrida durante el estrés crónico. Diversos estudios han demostrado la capacidad de los glucocorticoides, administrados en forma de tratamiento crónico, para promover afectaciones observadas en padecimientos como la depresión o la esquizofrenia, los cuales se asocian con niveles elevados de estas hormonas en el organismo (Czyrak y col., 2003; Fernandes y col., 1997). Sin embargo, a la fecha no se ha explorado el efecto de dicho tratamiento sobre los mecanismos adrenocorticales involucrados en la secreción de glucocorticoides. En particular, se desconoce el efecto de la administración crónica de glucocorticoides sobre la expresión de receptores 5-HT₇ y sobre los niveles de 5-HT en la corteza adrenal, siendo ambos posiblemente participantes críticos en el control de la secreción de glucocorticoides durante el estrés crónico (García-Iglesias y col., 2013; Terrón, 2014).

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo fundamental analizar el efecto de un tratamiento crónico con CORT sobre la cantidad y distribución de los receptores 5-HT₇ y la 5-HT en las glándulas adrenales, y sobre la respuesta endócrina (ACTH y CORT) inducida por la exposición a estrés agudo en ratas, La finalidad fue determinar si los glucocorticoides son responsables, al menos en parte, de las alteraciones adrenocorticales y endocrinas observadas previamente en animales con historial de estrés crónico (García-Iglesias y col., 2013).

ANTECEDENTES GENERALES

Estrés

Para que el organismo funcione de manera adecuada, una infinidad de parámetros deben ser controlados y mantenidos dentro de los límites fisiológicos normales. La presión arterial, el pH sanguíneo, la temperatura corporal y los niveles hormonales, entre muchas otras variables, se regulan a través de complejos sistemas biológicos cuyo objetivo es mantener al organismo en equilibrio, es decir, proporcionar a todas y cada una de las células que lo componen, las condiciones óptimas para realizar sus funciones de manera adecuada. A este equilibrio se le conoce como *homeóstasis*. Sin embargo, existen diversas situaciones en las que la homeostasis se ve alterada, ya sea por razones fisiológicas o psicológicas, como pueden ser una enfermedad, una herida, cambios en las condiciones meteorológicas, presión laboral o dificultades en las relaciones sociales. Así pues, el **estrés**, del latín “stringere”, y cuyo significado es apretar u oprimir, se define como un estado en el que el equilibrio del organismo es amenazado, o existe la percepción de que así ocurre. Los *estresores* son los factores que producen la alteración de la homeostasis.

Con la finalidad de contrarrestar el estrés y recuperar el estado de equilibrio, el organismo genera una serie de respuestas adaptativas que harán frente a la situación adversa. Aunque dichas respuestas incluyen cambios a nivel nervioso, hormonal e inmunitario, entre otros, no significa que resulten nocivas, pues gracias a ellas, las diferentes especies animales han podido evolucionar para adecuarse al medio ambiente que les rodea. Dependiendo de la intensidad del estresor y de su duración, así como de la susceptibilidad del individuo, puede lograrse una adaptación adecuada o deficiente. Para ejemplificar esta idea, la Figura 1 muestra una curva con forma de U invertida, en la cual se observa que a determinado nivel de actividad del sistema homeostático, se logra un estado óptimo en el equilibrio corporal (eustasis); sin embargo, una respuesta excesiva o deficiente al estrés se vuelve contraproducente a corto o a largo plazo, creándose así una adaptación anormal (alostasis o cacostasis) (Chrousos, 2009).

Después de años de investigación y gracias a la experimentación en animales, se logró establecer que la respuesta al estrés y la adaptación al mismo se produce en tres etapas, las cuales fueron descritas por vez primera en 1955 por el austrohúngaro Hans Selye:

1. **Reacción de alarma:** el organismo se prepara para desarrollar una vigorosa actividad que le ayudará a enfrentar al estresor. Esto resulta posible a través de diversos ajustes fisiológicos que le ayudarán a incrementar su capacidad de reacción, entre los que destacan el aumento de la presión arterial y del ritmo cardíaco, mayor oxigenación, movilización de los depósitos de energía y aumento del metabolismo; puesto que el organismo requiere concentrar su energía durante tal aumento de actividad, se produce también una inhibición de aquellas funciones que no son indispensables para hacer frente a la emergencia, las cuales son llamadas “vegetativas” e incluyen la reproducción, la alimentación y el crecimiento. En esta etapa la adaptación no ha sido adquirida (Selye, 1955).
2. **Etapa de resistencia:** el organismo es capaz de tolerar y resistir entornos debilitantes y adversos aún mayores que aquellos que causaron la reacción de alarma, pues aunque se recupera de la etapa inicial comienza a la vez una resistencia permanente cuya finalidad es la de recuperar la homeostasis. Se dice que en esta etapa la adaptación es óptima (Selye, 1955). Pero si el estresor resulta demasiado intenso o prolongado, y el organismo no puede superarlo, se genera la etapa de agotamiento.
3. **Etapa de agotamiento:** los recursos del organismo para hacer frente a la adversidad y recuperar la homeostasis se agotan, por lo que el equilibrio se rompe y el organismo se debilita propiciando la aparición de un gran número de padecimientos (Chrousos, 2009). Esto implica que la adaptación adquirida durante la resistencia se ha perdido, lo que resulta en los casos más severos en la muerte (Selye, 1955).

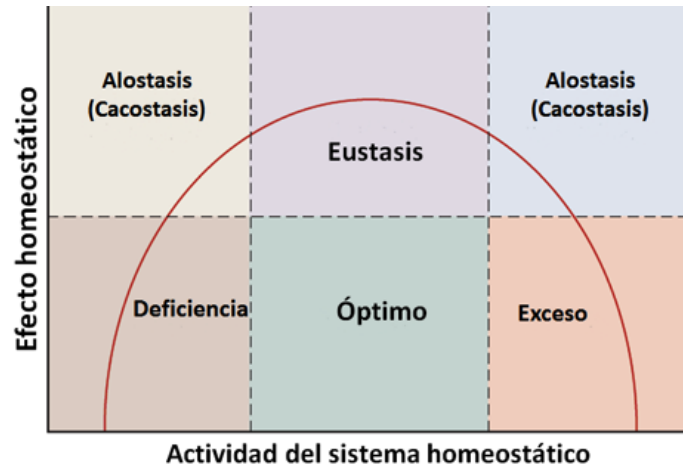


Figura 1. Respuesta del sistema homeostático según su actividad. La eustasis se encuentra en la parte media de la curva, o sea, el rango óptimo. Los efectos anormales (alostasis o cacostasis) pueden estar de ambos lados de la curva y llevar, a corto o largo plazo, a una adaptación deficiente (tomado de Chrousos, 2009).

Fisiología del estrés

Los cambios fisiológicos ocurridos a lo largo de las etapas de adaptación al estrés están regidos de manera primordial por el eje HPA y el sistema nervioso simpático (SNS). Como su nombre lo indica, el eje HPA está integrado por el hipotálamo y la glándula pituitaria, localizados en el cerebro, así como por las glándulas adrenales que se encuentran sobre el polo superior de los riñones. Se ha mencionado ya que ante estímulos estresores este eje se activa provocando en el organismo una serie de respuestas que le ayudarán a hacer frente a la situación adversa, siendo las hormonas liberadas en cada una estas estructuras, y también aquellas secretadas debido a la actividad del SNS, los principales mediadores de dichos efectos.

Sistema nervioso simpático

Al igual que el sistema nervioso parasimpático, forma parte del sistema nervioso autónomo (llamado también sistema neurovegetativo), encargado de regular las funciones involuntarias del organismo, y a su vez, es parte del sistema nervioso periférico. La función principal del SNS es la de preparar al organismo para responder a una situación de emergencia, ya que regula las actividades asociadas con el gasto de energía proveniente de las reservas del organismo, esto debido a que estimula la liberación de adrenalina y noradrenalina, sustancias que ocasionan la transformación de glucógeno en glucosa. Puesto que inerva, entre otras estructuras, al corazón, músculo liso, folículos pilosos y glándulas sudoríparas, es que en situaciones de estrés se presenta un aumento del ritmo cardíaco y la presión arterial, así como piloerección y sudoración. De igual modo, el SNS estimula la secreción de adrenalina y noradrenalina.



Figura 2. Organización del sistema nervioso.

Hipotálamo

Como ya se mencionó, el hipotálamo es la estructura principal encargada de la regulación del sistema nervioso autónomo. El hipotálamo es una pequeña estructura del cerebro, cuyo tamaño aproximado es el de una almendra, ubicada justo por encima de una de las cavidades características del hueso esfenoides, la *silla turca*. Entre algunas de las funciones que regula pueden mencionarse la actividad visceral y sus secreciones, el peristaltismo del aparato

digestivo, el control de los esfínteres y mantener el pH sanguíneo y la temperatura corporal dentro de los valores óptimos; resulta pues indispensable para mantener la homeostasis del organismo y para controlar los centros autónomos inferiores del tronco encefálico y la médula espinal.

Las células hipotalámicas se agrupan en conjuntos llamados *núcleos*, cada uno de los cuales tiene a su cargo el control de funciones determinadas. Del mismo modo, existen grupos neuronales cuyos límites no se encuentran bien definidos, razón por la cual se les conoce con el nombre de *áreas* (Fig. 3). Los núcleos hipotalámicos involucrados en el control de las funciones mencionadas con anterioridad se muestran en la Tabla 1. De acuerdo con una convención anatómica, el hipotálamo se suele dividir también en tres regiones: medial, lateral y periventricular. En la región lateral se da el relevo de la información proveniente de las estructuras cerebrales más rostrales hacia otras que están fuera del hipotálamo, mientras que las regiones medial y periventricular, nombre debido a su ubicación inmediata al tercer ventrículo, presentan la mayor parte de las fibras nerviosas y estructuras encargadas de la regulación del sistema endócrino (Yen y col., 2001).

Tabla 1. Funciones de los núcleos hipotalámicos.

Núcleo hipotalámico	Función presunta
Núcleo supraóptico y núcleo paraventricular (células magnocelulares)	Balance hídrico y electrolítico
Núcleo arqueado y núcleo paraventricular (células parvocelulares)	Secreción de factores de liberación
Área anterior y núcleo posterior	Regulación de temperatura
Área dorsal y núcleo posterior	Activación del SNS y secreción de hormonas de la médula suprarrenal
Hipotálamo lateral	Sensación de sed. Regulación de la ingestión de líquidos
Núcleo ventromedial y área hipotalámica lateral	Sensación de hambre y saciedad
Área anterior y preóptica	Regulación de la conducta sexual
Núcleo supraquiasmático	Ritmos circadianos

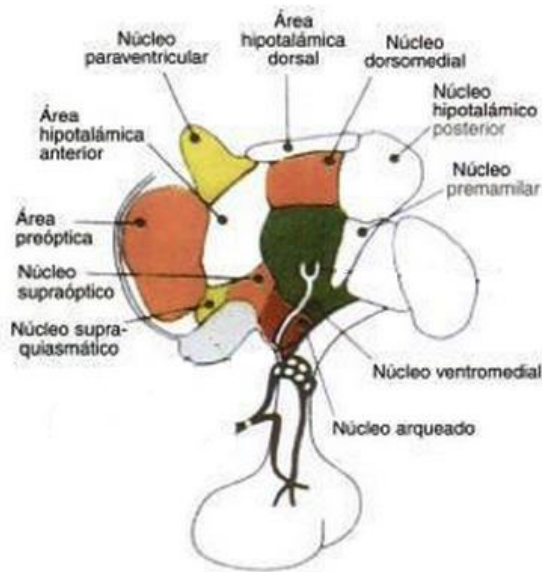


Figura 3. Núcleos y áreas hipotalámicas (Yen y col., 2001).

Entre los núcleos hipotalámicos es importante resaltar al núcleo paraventricular (NPV), pues representa una pieza indispensable en el control de la homeostasis. Está formado por dos tipos de poblaciones de neuronas, conocidas como *magnocelulares* y *parvocelulares*. Las neuronas magnocelulares reciben ese nombre debido a su gran tamaño, además, fueron las primeras caracterizadas como neurosecretoras, es decir, células nerviosas en cuyos núcleos se producen péptidos que serán transportados por el axón hasta las terminales nerviosas, las cuales, debido a su proximidad con capilares sanguíneos, les permitirá alcanzar el torrente sanguíneo en forma ya de hormonas, después de una serie de transformaciones ocurridas dentro de la célula; las células magnocelulares se encuentran también en el núcleo supraóptico. Las neuronas parvocelulares, a pesar de ser de menor tamaño, son también neuronas neurosecretoras.

Ambas poblaciones de neuronas alcanzan una zona denominada *eminencia media* (las parvocelulares terminan en este punto y las magnocelulares tienen su terminación en la pituitaria posterior), la cual representa el punto de unión del hipotálamo con la pituitaria, en donde se llevará a cabo la secreción de hormonas y, gracias a ellas, puede establecerse la comunicación entre estas dos estructuras.

Una de las hormonas más importantes secretadas por las células parvocelulares en esta estructura es el factor liberador de corticotropina (CRF) que, como lo indica su nombre, promueve la liberación de corticotropina por parte de la glándula pituitaria en su región anterior.

Glándula pituitaria

La glándula pituitaria, también conocida como hipófisis, se localiza en la parte superior del hueso esfenoides, dentro de la pequeña depresión llamada silla turca o fosa hipofisaria. Está compuesta por dos partes:

1. **Hipófisis posterior o neurohipófisis.** Se dice que es un órgano neurohumoral puesto que posee una innervación de fibras nerviosas proveniente de los núcleos supraóptico y paraventricular. A dicho conjunto de fibras se le conoce como tracto hipotalámico-hipofisiario, y son estas las responsables de la secreción de las hormonas oxitocina y vasopresina (u hormona antidiurética) (ADH), la primera de las cuales tiene como función incrementar las contracciones del útero durante el parto y la estimulación de las glándulas mamarias en la lactancia, mientras que la segunda tiene propiedades vasoconstrictoras y aumenta la reabsorción de agua en el riñón.
2. **Hipófisis anterior o adenohipófisis.** Constituye la mayor parte de la glándula (alrededor del 75%). Se encuentra unida al hipotálamo por medio de un sistema vascular denominado sistema porta-hipofisiario. Consta de una serie de capilares situados en la eminencia media que se encuentran circundados por las terminaciones nerviosas de las células parvocelulares originadas en el área preóptica, núcleo ventromedial, núcleo arqueado, núcleo supraóptico y NPV. Las hormonas secretadas en esta parte de la hipófisis es controlada por hormonas hipotalámicas denominadas factores de liberación (-RF) o de inhibición (-IH) y de acuerdo a su función, estas hormonas pueden dividirse en dos grupos:
 - Hormonas con acción trófica:
 - THS (hormona estimulante de la tiroides)
 - LH (hormona luteinizante)

- FSH (hormona estimulante de los folículos ováricos)
- ACTH (hormona adrenocorticotrópica).
- Hormonas con acción directa sobre tejido no endócrinos:
 - GH (hormona del crecimiento)
 - PRL (prolactina)
 - MSH (hormona estimulante de los melanocitos).

La Figura 4 esquematiza la disposición de los elementos que permiten la comunicación entre el hipotálamo y la pituitaria.

La ACTH tiene como función principal estimular la liberación de glucocorticoides, andrógenos y mineralocorticoides en la corteza de las glándulas suprarrenales (o glándulas adrenales).

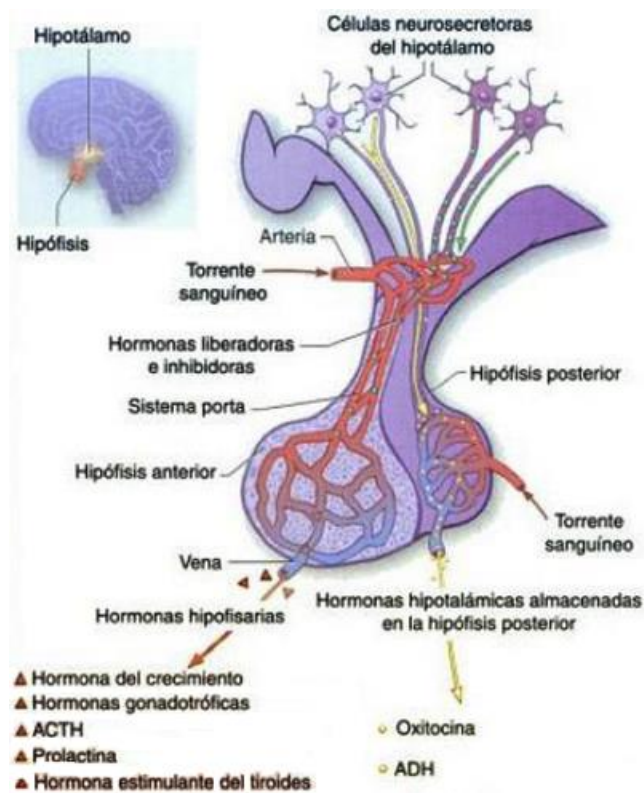


Figura 4. Comunicación entre el hipotálamo y la glándula pituitaria. Las hormonas gonadotróficas incluyen a la LH y a la FSH (Schnek y Massarini, 2008).

Glándulas adrenales

Estas glándulas endócrinas se encuentran en la parte superior de los riñones. Tienen forma piramidal y en su estructura pueden distinguirse dos regiones:

- ***Corteza.*** Constituye la mayor parte de la glándula y recubre por completo a la médula adrenal. A su vez, puede dividirse en tres zonas, según el tipo de sustancia que secreta:
 - Zona glomerular: es responsable de la liberación de mineralocorticoides, hormonas que intervienen en la regulación del balance hidroelectrico del cuerpo, siendo la aldosterona la más representativa (Schnek y Massarini, 2008).
 - Zona fascicular: en esta zona son secretaados los glucocorticoides, sustancias encargadas de promover la producción de glucosa a partir de lípidos y proteínas. El glucocorticoide más importante en el humano es el cortisol (Schnek y Massarini, 2008).
 - Zona reticular: es la encargada de la secreción de andrógenos, hormonas sexuales que participan en el desarrollo de vello en distintas partes del cuerpo, siendo el más representativo la dehidroepiandrosterona (Gal y col., 2007).
- ***Médula.*** Se dice que es una prolongación del SNS, pues contiene neuronas simpáticas agregadas en pequeños ganglios. Su composición es básicamente a base de células cromafines (neurosecretoras) y abundantes capilares sanguíneos. Aquí tiene lugar la secreción de catecolaminas, adrenalina en un 80% y noradrenalina en un 20% (Latarjet y Ruiz, 2005).

Las glándulas adrenales se encuentran cubiertas por una capa de tejido conjuntivo denominada cápsula, la cual se encuentra ricamente vascularizada (Kühnel, 2005).

Cortisol

El cortisol es la sustancia más representativa de un grupo de hormonas conocidas como glucocorticoides, las cuales tienen como función principal la regulación del metabolismo de carbohidratos, aunque intervienen también en el catabolismo de proteínas y en la regulación

de la respuesta inmune e inflamatoria (Mendoza-Patiño, 2008); estas hormonas se sintetizan a partir del colesterol almacenado en las células mediante un proceso denominado como esteroidogénesis, para el cual, el colesterol debe ser transportado hacia la mitocondria, en donde gracias a la acción de diversas enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P-450 (CYP), se forman los diversos glucocorticoides, así como también los mineralocorticoides y los esteroides sexuales (Fig. 5) (Velázquez, 2005).

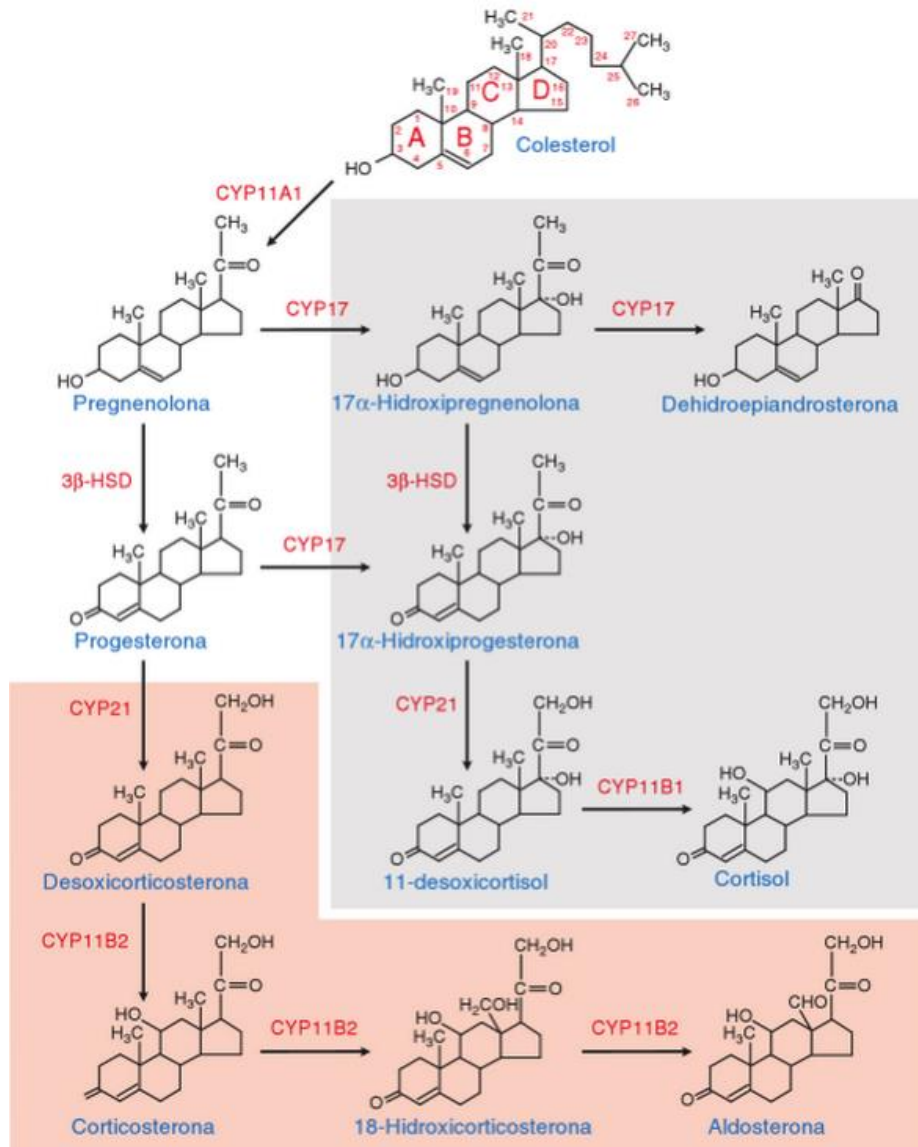


Figura 5. Esteroidogénesis (Goodman y Gilman, 2012).

De manera natural, la secreción de cortisol se da de acuerdo a un ciclo circadiano relacionado con los periódicos de sueño-vigilia, alcanzándose un pico que oscila entre 8-25 mg/dL entre las 6-9 h (Gillenwater y col, 2002). Ante situaciones de estrés, los glucocorticoides incrementan el proceso de gluconeogénesis en el hígado para que el organismo pueda disponer de energía suficiente para hacer frente a la adversidad.

Así como el cortisol es el glucocorticoide más representativo en los seres humanos, la corticosterona (CORT) lo es en las ratas y ratones, hecho que se debe a la ausencia de la enzima 17 α -hidroxilasa (CYP17), miembro de la familia de CYP (Keeney y col., 1995), la cual es indispensable para la formación del cortisol (Fig. 5).

Sistema de regulación del eje HPA

La regulación de la secreción de glucocorticoides, así como de CRF y ACTH, se logra gracias a los receptores para glucocorticoides distribuidos en el HPA, específicamente en el NPV y en la pituitaria (Fink, 2010), aunque también se sabe que estos receptores están presentes en el hipocampo (Fink, 2000); los niveles elevados de glucocorticoides producidos durante el estrés son detectados por estos receptores, deteniéndose así la liberación de sus hormonas precursoras, de este modo, los glucocorticoides pueden volver a sus valores habituales y el equilibrio en el organismo se recupera de manera paulatina. A este sistema se le conoce como de *retroalimentación negativa*, de cuyo funcionamiento otorga la Figura 6 una idea más clara.

Sin embargo, se ha observado que al estar sometido a estrés durante periodos prolongados de tiempo, el sistema de retroalimentación negativa se desregula, provocando una hipersecreción de glucocorticoides, hecho que se sabe, tiene diversas implicaciones en la salud, como por ejemplo, supresión de la producción de diversas células del sistema inmune, resistencia a la insulina, hipertensión, obesidad, así como el desarrollo de trastornos psiquiátricos como depresión o ansiedad (Chrousos, 2009). Reportes múltiples indican que en algunos de estos padecimientos, el funcionamiento del sistema serotoninérgico se ve alterado a consecuencia del fallo en el sistema de retroalimentación negativa del eje HPA.

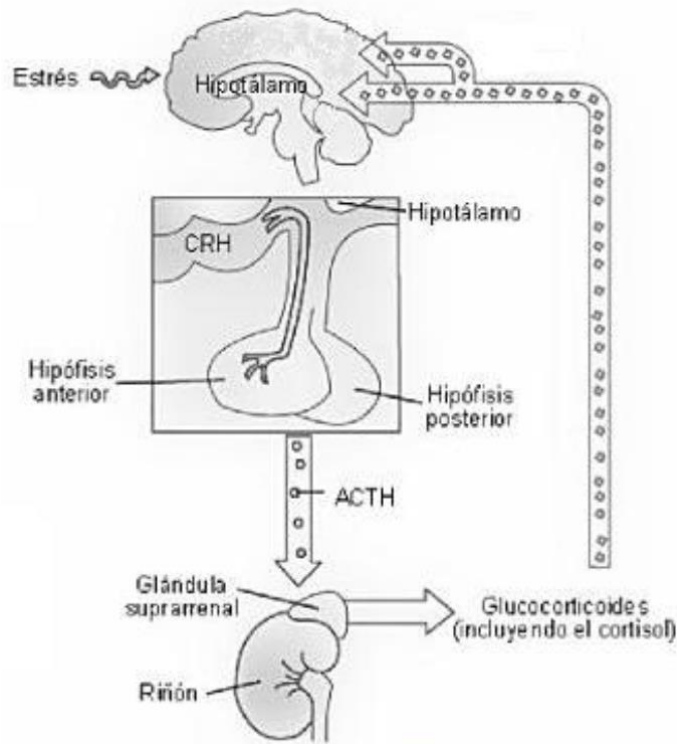


Figura 6. Sistema de retroalimentación negativa del eje HPA (Balada y col, 2012).

Sistema serotoninérgico

El sistema serotoninérgico es el encargado de la producción y distribución de la 5-HT en el organismo, una amina incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, pero que es sintetizada en el interior de las neuronas y liberada por excitación al espacio sináptico. Es uno de los neurotransmisores menos abundantes en el sistema nervioso central, pues solamente el 2% de la 5-HT se encuentra en el cerebro y más del 90% se halla localizada en el aparato gastrointestinal. Las neuronas serotoninérgicas del cerebro tienen sus cuerpos celulares en los núcleos del rafe y proyectan de manera difusa a todas las demás áreas del sistema nervioso central. La 5-HT cumple diversas funciones en el cuerpo humano, entre las que se cuentan la regulación del apetito, del comportamiento sexual, agresivo o emocional, la presión arterial y la termorregulación; el control de estas y otras funciones es llevada a cabo gracias a una gran cantidad de receptores distribuidos en todo el organismo (Velázquez, 2005). La tabla 2 muestra de manera general la localización y la respuesta que lleva a cabo cada uno de estos receptores, sin embargo, la evidencia que relaciona la disfunción del sistema serotoninérgico

con las alteraciones causadas por la desregulación del eje HPA ocasionada por el estrés crónico es cada día más abundante.

Tabla 2. Tipos y funciones de los receptores serotoninérgicos (Velázquez, 2005).

TIPO	LOCALIZACIÓN	RESPUESTA
5-HT _{1A}	Cerebro: sistema límbico, corteza y núcleos del rafé (autorreceptores)	Ansiólisis ↑ secreción (ACTH) Hipotermia
5-HT _{1B}	Cerebro: ganglios basales, estriado, corteza frontal, ganglio del trigémino Musculo liso vascular	Analgesia Hipofagia Hipotermia Vasoconstricción
5-HT _{1D}	Cerebro: ganglios basales, núcleo dorsal del rafé (autorreceptor), ganglio del trigémino (autorreceptor)	Analgesia ↓ Extravasación de proteínas plasmáticas ↓ Liberación de neuropéptidos
5-HT _{1E}	Cerebro: corteza frontal	¿?
5-HT _{1F}	Cerebro: núcleo dorsal del rafé, hipocampo, corteza, estriado, tálamo e hipotálamo Mesenterio Útero	Analgesia
5-HT _{2A}	Cerebro: corteza, ganglios basales Músculo liso vascular, uterino y bronquial Plaquetas	↑ Secreción hormonal: ACTH, CORT, oxitocina, renina y prolactina Hipotermia
5-HT _{2B}	Fundus gástricos Musculo liso vascular y no vascular Válvulas cardiacas Médula espinal Cerebro: cerebelo, hipotálamo, septum	Ansiólisis Hiperfagia ↑ Motilidad intestinal
5-HT _{2C}	Cerebro y plexo coroideo Médula espinal	Hipofagia Hipoactividad Ansiedad Erección
5-HT ₃	Neuronas entéricas Neuronas sensitivas nociceptivas	Emesis, náuseas Regulación de motilidad y secreción intestinales
5-HT ₄	Tubo digestivo Corazón Cerebro Suprarrenales	↑ Motilidad y secreción intestinales ↑ Secreción de aldosterona
5-HT ₆	Cerebro: estrado, amígdala, núcleo <i>accumbens</i> , hipocampo y corteza	↑ Neurotransmisión colinérgica central
5-HT ₇	Musculo liso vascular y no vascular Cerebro: sistema límbico, tálamo, corteza	Relajación de músculo liso vascular y del aparato gastrointestinal

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

El sistema serotoninérgico como regulador del eje HPA

El sistema serotoninérgico ejerce un papel de regulación sobre el eje HPA a través de las proyecciones que los núcleos dorsal y medial del rafe envían hacia el NPV (Larsen y col., 1996; Sawchenko y col., 1983), específicamente a las células parvocelulares encargadas de la secreción de CRF (Liposits, y col., 1987). Reportes previos indican que la 5-HT controla la liberación de CRF (Jones y col., 1976; Holmes y col., 1982) y de ACTH (Jørgensen y col., 1999) de una manera dependiente de la dosis. En concordancia con estos reportes, se ha documentado que la secreción de CRF y ACTH se ve aumentada tras la administración de agonistas de los receptores a la 5-HT y disminuye en presencia de antagonistas, siendo los subtipos 5-HT_{1A} (Pan y Gilbert, 1992; Jørgensen y col., 1999) y 5-HT_{2A/2C} (Jørgensen y col., 1999) los más relevantes. Por otro lado, se ha sugerido que los receptores 5-HT₇ pueden promover la liberación de CORT en ratas, esto a través de la administración del agonista inespecífico, 5-carboxamidotriptamina (Jørgensen y col., 1999). De manera similar, el 8-hidroxi-dipropilaminotetralina (8-OH-DPAT), un agonista serotoninérgico con alta afinidad por los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇, promueve también la secreción de CORT. Resulta interesante que la secreción de la hormona inducida por el fármaco no se ve completamente abolida al administrar un antagonista específico de los receptores 5-HT_{1A} sugiriendo así la posible participación de los receptores 5-HT₇ (Vicentic y col., 1998).

Los receptores 5-HT₇ se expresan en el hipotálamo, el hipocampo y la amígdala, por lo que se ha propuesto su participación en la regulación de los ciclos circadianos y en los mecanismos involucrados en un gran número de desórdenes psiquiátricos como la ansiedad o la depresión, además de un posible papel en la regulación del eje HPA (Varnäs y col, 2004). La prueba de nado forzado, técnica diseñada para evaluar la eficacia de sustancias antidepresivas, consiste en introducir a un roedor en un tanque de agua para medir los movimientos relacionados con el escape; el grado de inmovilidad del animal se relaciona con la conducta depresiva (Can y col., 2012). De acuerdo con la evidencia, los receptores 5-HT₇ podrían ser parte importante del mecanismo por el cual la depresión se desarrolla. Diversos grupos de investigación han reportado que el SB-269970, un antagonista específico de los receptores 5-HT₇, reduce el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado,

comportamiento asociado a la depresión en roedores (Hedlund y col., 2005; Wesołowska y col., 2007). Es sabido también que los antagonistas de los receptores 5-HT₇ potencian el efecto terapéutico de fármacos antidepresivos como la imipramina y la desipramina (Wesołowska y col., 2007). Puesto que la depresión es uno de los DRE en los que la disfunción endócrina ha sido mejor documentada, se cree que los receptores 5-HT₇ podrían ser un componente importante en el proceso de desregulación del eje HPA bajo condiciones de estrés crónico.

El estrés crónico como inductor de la desregulación del eje HPA

Como se ha mencionado anteriormente, la exposición a estrés crónico conlleva a una desregulación del eje HPA. Son pocos los estudios que han reportado tal fenómeno en modelos animales de estrés crónico; uno de ellos es el de Keeney y col. (2006) quienes utilizaron el modelo de estrés por derrota social en ratones, enfrentando los animales de conducta pasiva con otros de comportamiento dominante produciéndose en los ratones sumisos, como resultado de la exposición repetida a diferentes ratones dominantes, una alteración en el funcionamiento del eje HPA. Como puede observarse en la Figura 6, después del primer día, en los animales sometidos al enfrentamiento se libera mayor cantidad de CORT que en los animales CTRL, lo que refleja la respuesta habitual del eje HPA. Después de 4 y 8 sesiones, los niveles de la hormona se mantienen regulados, es decir que los valores de CORT alcanzados son menores que los registrados después de la experiencia de estrés agudo (primera derrota), hecho debido probablemente a una adaptación a corto plazo del eje HPA y al funcionamiento del sistema de retroalimentación negativa de los glucocorticoides. Sin embargo, después de la última (12^a) sesión, la activación de un mecanismo de naturaleza desconocida conduce a la secreción exacerbada de CORT (Fig. 7).

Otro estudio que ha reportado disfunción del eje HPA bajo condiciones de estrés crónico es el que realizó García-Iglesias y col. (2013). Utilizando el modelo de restricción de movimiento por 20 min al día durante 14 días en ratas, se observó un aumento significativo de la secreción de CORT en respuesta al estrés agudo por restricción de movimiento (0, 10, 30, 60, 120 min) con respecto del observado en animales CTRL (Fig. 8). En el caso particular de los niveles basales de esta hormona, el grupo de estrés crónico presentó un descenso significativo en comparación con los animales CTRL (Fig. 7), hecho que ha sido reportado con anterioridad en otros estudios (Sánchez y col., 1998; Malkesman y col., 2006). Después de 10 y 30 minutos de

restricción de movimiento, y posteriormente a los 120 minutos, los niveles de CORT alcanzados por los animales sometidos a estrés crónico fueron significativamente mayores con respecto de sus controles (Fig. 8), lo que sugiere que la sensibilización a una situación estresante puede darse aún si se trata de estresores homotípicos (Orr y col., 1990; Figueiredo y col., 2003).

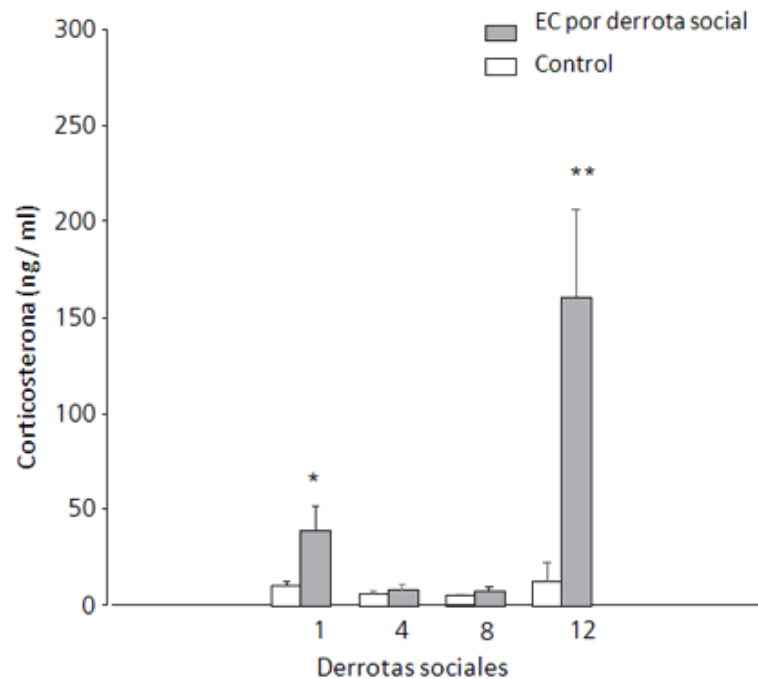


Figura 7. Efecto del estrés crónico por derrota social sobre los niveles circulantes de CORT. La obtención de plasma se realizó 24 h después de 1, 4, 8 o 12 sesiones de derrota social. Las barras oscuras representan al grupo sometido a estrés y las barras blancas al grupo control. *P < 0.05, **P < 0.01 con respecto al grupo control (n= 8 por grupo) (Keeney y col., 2006).

Adicionalmente, los resultados de dicho estudio sugieren que la secreción excesiva de CORT parece estar dissociada de la secreción de ACTH, pues los niveles de esta hormona obtenidos en los animales sometidos a estrés crónico son, con excepción del tiempo 0 y 60, significativamente menores que sus respectivos controles (Fig. 9). A pesar de que diversos estudios han reportado una disminución en la secreción de ACTH después de un periodo de estrés crónico (Bhatnagar y col., 2002; Gray y col., 2010), el mecanismo por el cual se produce esta aparente disociación no ha sido esclarecido. Sin embargo, actualmente se acepta que diversos factores como neuropéptidos, neurotransmisores o células del sistema inmune son

capaces de regular la secreción de glucocorticoides en las glándulas adrenales de manera independiente de la ACTH proveniente de la pituitaria mediante el establecimiento de mecanismos locales a nivel de la corteza adrenal (Bornstein y col., 2008). En este sentido, resulta relevante que la secreción exacerbada de CORT inducida por estrés agudo en los animales con historial de estrés crónico se vio acompañada de cambios notables a nivel de la corteza adrenal, que incluyen un marcado aumento de la inmunorreactividad (IR) a la 5-HT (Fig. 10) y a los receptores 5-HT₇ (Fig. 11) en sitios anatómicos que coinciden con la localización de las células productoras de glucocorticoides, específicamente la *zona fasciculata* y la *zona glomerulosa* (García-Iglesias y col., 2013). En concordancia con lo anterior, mediante determinaciones por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución, por sus siglas en inglés) se observó que los niveles de 5-HT y su principal metabolito, el ácido 5-hidroxi_indolacético (5-HIAA; por sus siglas en inglés), así como la relación entre ambos (5-HIAA/5-HT, cociente que refleja indirectamente el proceso de recambio de la 5-HT), aumentaron significativamente en las glándulas adrenales (pero no en el NPV del hipotálamo) de animales sometidos a estrés crónico (García-Iglesias y col., 2013). Del mismo modo, por medio de análisis de Western blot fue posible observar un aumento en la expresión de los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales (Fig. 12). Estas observaciones sugieren que los mecanismos productores de glucocorticoides en el estrés crónico, los cuales parecen ser independientes de la secreción de ACTH, involucran al menos en parte el desarrollo de un sistema serotoninérgico intra-adrenal cuyo funcionamiento depende de la expresión y activación de los receptores 5-HT₇.

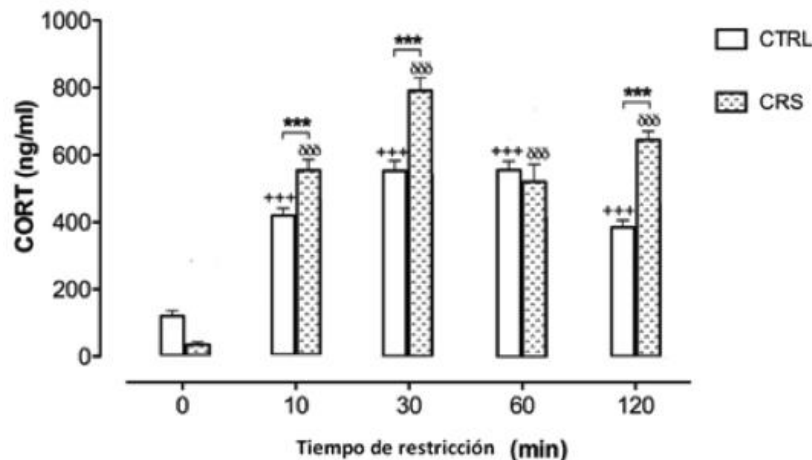


Figura 8. Secreción de corticosterona en respuesta a estrés agudo por restricción de movimiento en animales control (CTRL) y sometidos a estrés crónico por restricción de movimiento (CRS). +++P<0.001 vs nivel basal (0 min); δδδP<0.001 vs nivel basal (0 min); *P<0.001 (García-Iglesias y col., 2013).**

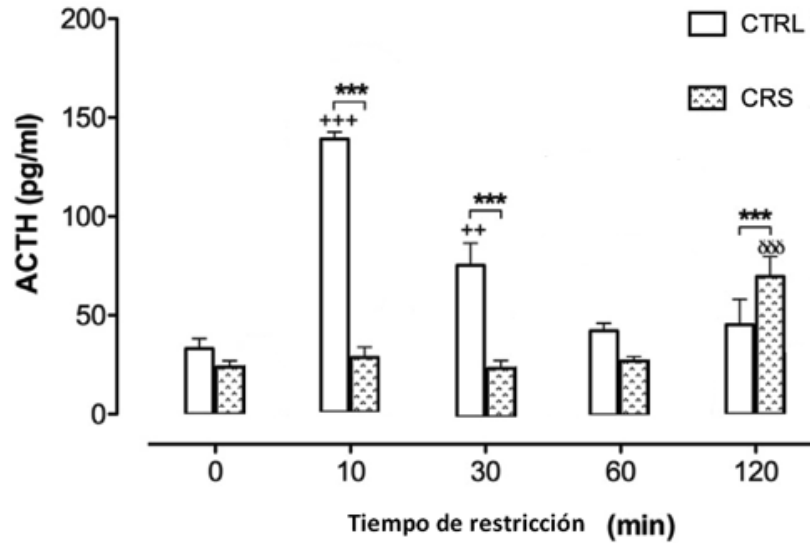


Figura 9. Secreción de ACTH en respuesta a estrés agudo por restricción de movimiento en animales control (CTRL) y sometidos a estrés crónico por restricción de movimiento (CRS). +++P<0.001 vs nivel basal (0 min); ++P<0.01 vs nivel basal (0 min); $\delta\delta\delta$ P<0.001 vs nivel basal (0 min); ***P<0.001 (tomado de García-Iglesias y col., 2013).

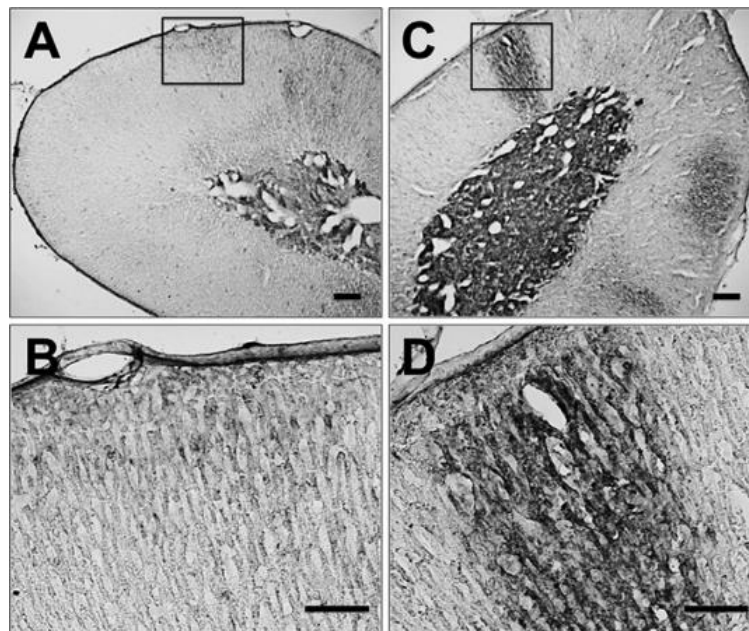


Figura 10. Efecto del estrés crónico sobre la inmunorreactividad a la 5-HT en las glándulas adrenales de la rata. A y B corresponden a los animales sometidos a estrés crónico por restricción de movimiento (20 min/día durante 14 días) mientras que C y D representan a sus respectivos controles, animales que fueron únicamente levantados por la cola por 20 s los 14 días respectivos. La IR-5-HT en los animales sometidos a estrés crónico es fuertemente visible en islotes corticales, los cuales coinciden con la zona glomerulosa y la zona fasciculata, mientras que en los animales CTRL, la señal se presenta débil y dispersa a lo largo de la corteza. (García-Iglesias y col., 2013).

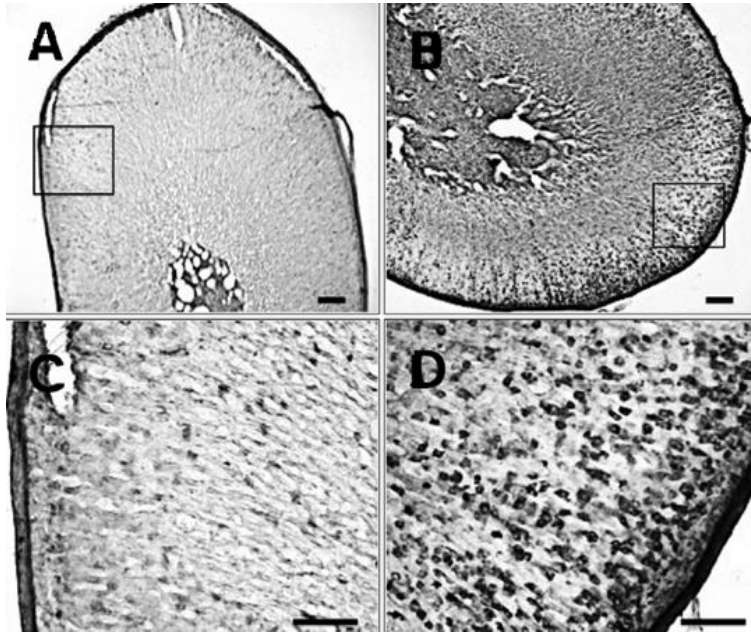


Figura 11. Efecto del estrés crónico sobre la inmunorreactividad a la 5-HT₇ en las glándulas adrenales de la rata. A y B corresponden a los animales sometidos a estrés crónico por restricción de movimiento (20 min/día durante 14 días) mientras que C y D representan a sus respectivos controles, animales que fueron únicamente levantados por la cola por 20 s los 14 días respectivos. Se observa en la corteza adrenal de los animales CTRL poca IR-5-HT₇, en cambio, en los animales sometidos a estrés crónico la señal se intensifica en la *zona glomerulosa* y la *zona fasciculata* (García-Iglesias y col., 2013).

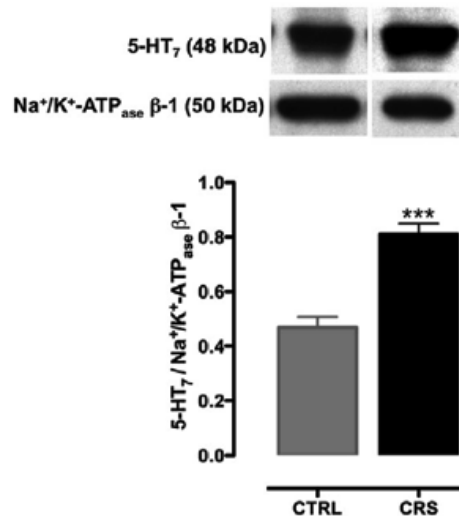


Figura 12. Efecto del estrés crónico sobre la expresión de los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales de la rata. El contenido de los receptores 5-HT₇ fue medido por Western blot, con respecto a la proteína Na⁺/K⁺-ATPase β-1, en las AG totales. En animales sometidos a estrés crónico se presenta un incremento en la expresión de estos receptores con respecto a los animales CTRL. CTRL = control; CRS = estrés crónico por restricción de movimiento (chronic restraint stress). ***P < 0.001 vs CTRL (tomado de García-Iglesias y col., 2013).

Papel de los receptores 5-HT₇ en la sobreproducción de glucocorticoides bajo condiciones de estrés crónico

Además del aumento de la IR-5-HT₇ (y de la proteína) en las zonas corticales responsables de la producción de glucocorticoides en animales sometidos a estrés crónico respecto de sus respectivos controles (García-Iglesias y col. 2013), se ha reportado que la administración de un antagonista de los receptores 5-HT₇, el SB-656104 (vía intraperitoneal, 60 min antes del estrés agudo), el incremento en la secreción de CORT registrado en ratas con historial de estrés crónico después del estímulo de estrés agudo (Fig. 8) se vio abolido después de 30, 60 y 120 min de restricción de movimiento, en comparación con aquellos animales que presentaban de igual modo un historial de estrés crónico pero que fueron administrados sólo con el VEH correspondiente; únicamente en el tiempo 0, el grupo tratado con el SB-656104 obtuvo valores mayores de CORT que su VEH. En la caso de los animales CTRL, sólo al tiempo 60 se registró una disminución en la secreción de CORT. La Figura 13 muestra una clara interacción entre el tratamiento farmacológico, el tiempo de restricción de movimiento y el protocolo de estrés crónico de los diferentes grupos experimentales. Con respecto de la secreción de ACTH, el antagonista produjo una disminución solamente en el grupo CTRL después de 10 min de restricción de movimiento (García-Iglesias y col., 2013).

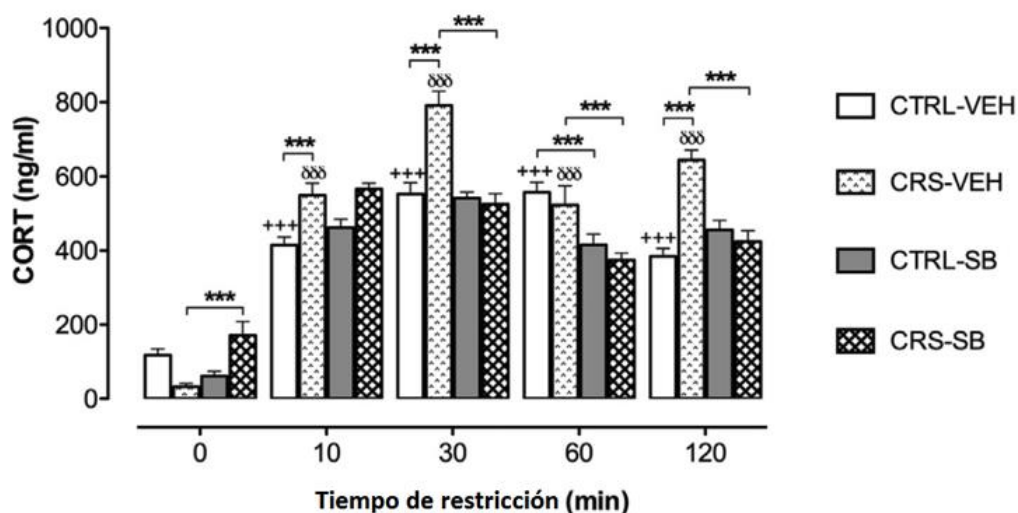


Figura 13. Efecto del antagonista de los receptores 5-HT₇, SB-656104 (SB), con respecto del vehículo (VEH) sobre la secreción de corticosterona (CORT) inducida por estrés agudo por restricción de movimiento en animales control (CTRL) y sometidos a estrés crónico por restricción de movimiento (CRS). +++P<0.001 vs nivel basal (0 min); δδδP<0.001 vs nivel basal (0 min); *P<0.001 (tomado de García-Iglesias y col., 2013).**

Los resultados anteriores apoyan la idea de que los receptores 5-HT₇, bajo condiciones de estrés crónico, pueden estar involucrados en un mecanismo de sobreproducción de glucocorticoides.

Por otra parte, en tejidos humanos se ha reportado la expresión ectópica de receptores 5-HT₇ en adenomas que producen grandes cantidades de cortisol de manera independiente de la secreción de ACTH (Louiset y col. 2006). En estos tumores se observa abundante IR-5-HT₇ en la región subcapsular de la corteza adrenal, en las zonas centrales del nódulo hiperplásico, como los espongocitos, en la *zona fasciculata*, y en las células compactas de la *zona reticularis*, además de las paredes vasculares; en un tejido sano dicha señal se encuentra ausente (Fig. 15). Resulta interesante que en el mismo estudio se observó que la 5-HT estimula la secreción de cortisol de una manera dependiente a la dosis en cultivos de células adrenocorticales sanas y también aquellas provenientes de adenomas. En estas últimas células, la liberación de la hormona fue inhibida por un antagonista de los receptores 5-HT₂/5-HT₇, el LY 215840. Tales resultados apoyan la hipótesis de que estos receptores pueden mediar el control de las células esteroideogénicas a través de un mecanismo serotoninérgico intra-adrenal (Louiset y col., 2006).

La evidencia anterior señala entonces a los receptores 5-HT₇ como importantes blancos terapéuticos para el tratamiento de diversos trastornos relacionados con el estrés. Cabe destacar que diversos fármacos antidepresivos y antimigrañosos presentan una afinidad relativamente elevada por estos receptores (Yu-Chen y col., 2009; Terrón, 2002).

Posible papel de los glucocorticoides en las alteraciones del eje HPA y el sistema serotoninérgico

El hipocampo es una estructura que posee una vasta cantidad de cantidad de receptores a glucocorticoides (Yau y col., 2001), además, su participación en la regulación de la retroalimentación negativa del eje HPA a nivel del hipotálamo ha sido sugerida a través de la secreción de precursores de la secreción de ACTH (Jacobson y Sapolsky, 1991). También se ha demostrado que una alta exposición a glucocorticoides disminuye tanto la afinidad de sus receptores (Phillips y col., 2006), como su densidad, pues la exposición aguda (2 semanas) y crónica (3 meses) a CORT exógena (5 mg/día) disminuye la cantidad de receptores a GR en el hipocampo (Sapolsky y col., 1985).

Se sabe además que en el hipocampo es expresado el receptor 5-HT₇ (Gustafson y col., 1996), el cual parece tener un importante papel de regulación sobre el eje HPA (Terrón, 2014). No solamente se ha comprobado que la activación de estos receptores aumentan la excitabilidad de neuronas en el hipocampo (Kusek y col., 2015), sino también que en cultivos de células hipocámpales, la 5-carboxamidotriptamina, potente agonista de los receptores 5-HT₇, aumenta tanto los niveles de unión de los GR, así como su expresión (Laplante y col., 2002). Sin embargo, la relación entre el sistema serotoninérgico y el eje HPA, particularmente con los niveles de glucocorticoides liberados por éste, no es aún comprendida del todo. Por ejemplo, después de una adrenalectomía, la expresión de los receptores 5-HT₇ se ve aumentada en el hipocampo, mientras que el tratamiento con el glucocorticoides exógeno, dexametasona, disminuye su expresión (Le Corre y col., 1997; Shimizu y col., 1997); por otro lado, la exposición al estrés crónico por restricción de movimiento provoca una disminución en la expresión del receptor 5-HT₇ en el NPV del hipotálamo, y en estructuras periféricas como las glándulas adrenales, la cantidad de estos receptores aumenta (García-Iglesias y col., 2013). La evidencia indica que estos cambios son producidos por los elevados niveles de glucocorticoides, pues está comprobado que la activación de los receptores de estas hormonas puede alterar la expresión de más de 200 genes (Tokarski y col., 2009), entre los que se cuentan citosinas (Barnes, 2011), células inmunitarias (Galon y col., 2002), factores de crecimiento y enzimas (Kadmiel y Cidlowski, 2013), por mencionar algunos.

Uno de los cambios observados después de un tratamiento de estrés crónico, en el que los niveles de glucocorticoides se encuentran elevados por encima de los valores normales, es el aumento de tamaño de las glándulas adrenales. 14 días de estrés crónico variable demostraron ser suficientes para inducir un aumento en el contenido total de DNA y RNA en las glándulas adrenales, así como para promover la división celular (Fig. 14) (Ulrich-Lai y col., 2006), hecho que refleja una función génica alterada. Otro de los órganos que sufren un cambio en su fisiología normal es el timo, el cual presenta una involución ante altas concentraciones de glucocorticoides, pues estos ocasionan una disminución en el número de células inmunitarias y una fragmentación del DNA total del timo (Tarcic y col., 1998).

Del mismo modo, uno de los cambios característicos influenciados por los altos niveles de glucocorticoides es la disminución en la ganancia de peso corporal, lo cual ha sido reportado tanto por diversos protocolos de estrés crónico (Kim y col., 2006; Harris y col., 2004; Wang y col., 2010) como por tratamientos crónicos con CORT (Crupi y col., 2010; Donner y col., 2012;

Lee y col., 2013). Se sabe que el metabolismo y la ingesta de alimento se ven alterados por los glucocorticoides, ya que estos aumentan la proteólisis en los músculos (Tomas y col., 1979; Becker, 2001; Martí y col., 1994) y además, la administración de 40 mg/kg de CORT, durante 21 días, ha demostrado el aumento en la IR a CRF (Lee y col., 2013), sustancia que inhibe la liberación del neuropéptido Y (NPY) (Martí y col., 1994; Heinrichs y col., 1993), un estimulante

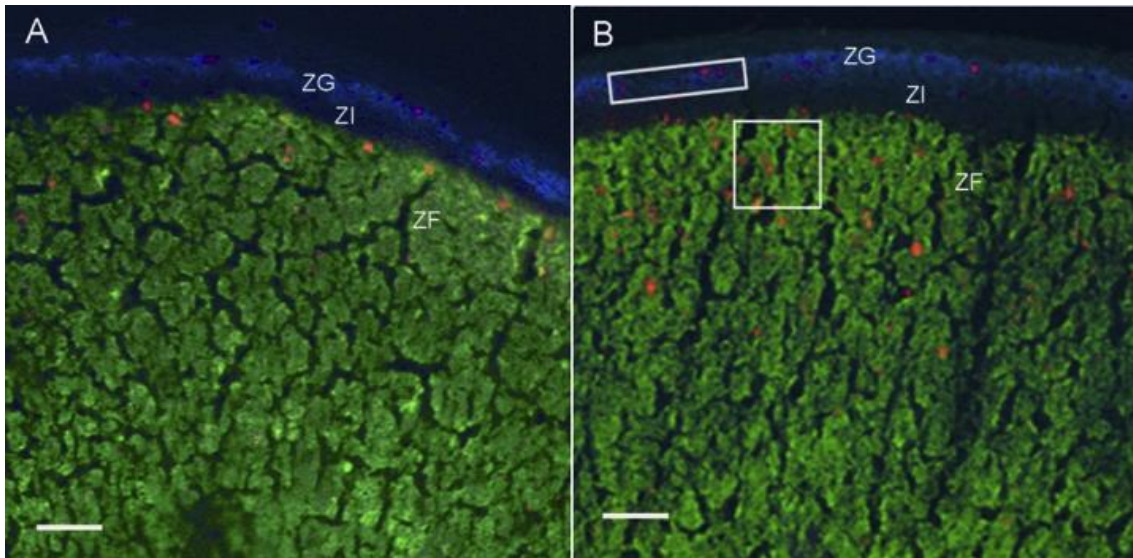


Figura 14. Inmunofluorescencia a Ki67, un indicador de división celular en glándulas adrenales de ratas sometidas a EC. Los puntos rojos corresponden a Ki67, un indicador de la división celular. En los animales sometidos a estrés crónico variable (B) se observa un aumento en la inmunofluorescencia hacia Ki67, con respecto a los animales CTRL (A), en la corteza de las glándulas adrenales. ZF, zona fasciculata; ZG, zona glomerulosa, ZI, zona intermedia (Escala de barras, 100 μ m) (tomado de Ulrich-Lai y col., 2006).

El tratamiento crónico con CORT como inductor de cambios en el sistema serotoninérgico

Diversas investigaciones han apuntado a las hormonas esteroideas como una pieza importante en la regulación de la función serotoninérgica, hecho que resulta interesante al considerar la hipercortisolemia típica de los desórdenes afectivos. Entre los distintos subtipos de receptores a 5-HT han sido señalados como blancos farmacológicos potenciales están los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}, pues se cree pueden jugar un papel fundamental en la patología de la depresión, a través de un funcionamiento alterado en la transmisión neuronal (Takao y col., 1997). Se ha demostrado que la hipercortisolemia produce cambios en la función neural serotoninérgica en ratas, afectando los sistemas de 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}.

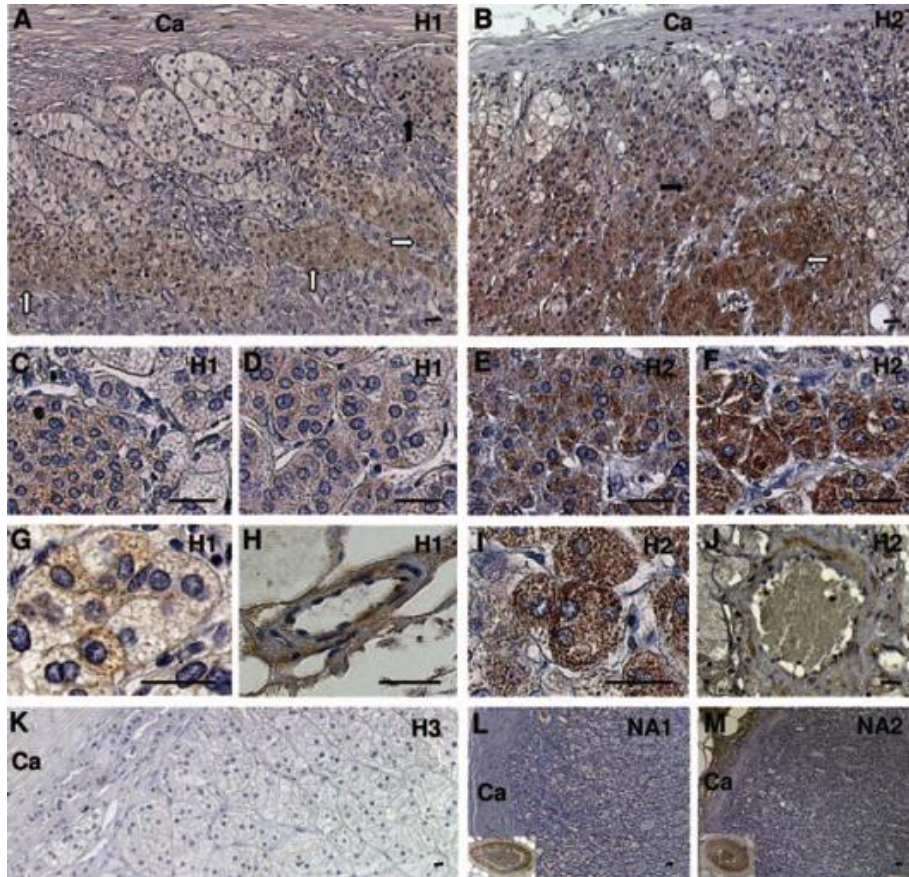


Figura 15. Inmunohistoquímica a los receptores 5-HT₇ en adenomas bilaterales causados por el síndrome de Cushing independiente de ACTH. A y B, IR-5-HT₇ en espongocitos (⇔) y células compactas (→) de la región subcapsular del paciente 1 (H1; A-H1) y el paciente 2 (H2; B-H2). C-F, racimos de 5-HT₇ dispuestos (D-H1; F-H2) o no (C-H1; E-H2) en nódulos en la región central del tejido hiperplásico. G-J, microfotografías que muestran la presencia de receptores 5-HT₇ en el citoplasma y la periferia de los espongocitos (G-H1; I-H2), o bien en vasos sanguíneos (H-H1; J-H2). K, ausencia de IR-5-HT₇ en la corteza del paciente 3 (H3). L y M, ausencia de IR-5-HT₇ en la corteza de tejido adrenal normal (NA1 y NA2). Ca, cápsula. Escala de barras, 25 μm (Louiset y col., 2006).

Mediante estudios de autorradiografía cuantitativa se ha determinado que diversos protocolos de administración crónica con CORT (implantación de un pellet de liberación prolongada con 100 mg, durante una semana [Fernandes y col., 1997]; 10 mg/kg, vía s.c., dos veces al día por 7 días [Czyrak y col., 2002; Czyrak y col., 2003]; 50 mg/kg, vía s.c., por 14 días [Takao y col., 1997]) pero no aguda, produce una disminución en la unión de los receptores 5HT_{1A} con su agonista específico 8-OH-DPAT en el hipocampo (homogenizado total [Fig. 16; Takao y col., 1997], giro dentado [Czyrak y col., 2002; Czyrak y col., 2003; Fernandes y col., 1997], y parte ventral de la zona CA1 [Czyrak y col., 2002; Czyrak y col., 2003]) mientras que

dicha unión se ve incrementada en el núcleo medial del rafe (Fernandes y col., 1997); en cambio, se presenta un aumento en la unión del receptor 5-HT_{2A} con su antagonista específico ketanserina en las áreas 1, 3 y 4 de la corteza parietal (Fernandes y col., 1997) y en la corteza frontal (homogeneizado total [Fig. 16; Takao y col., 1997]).

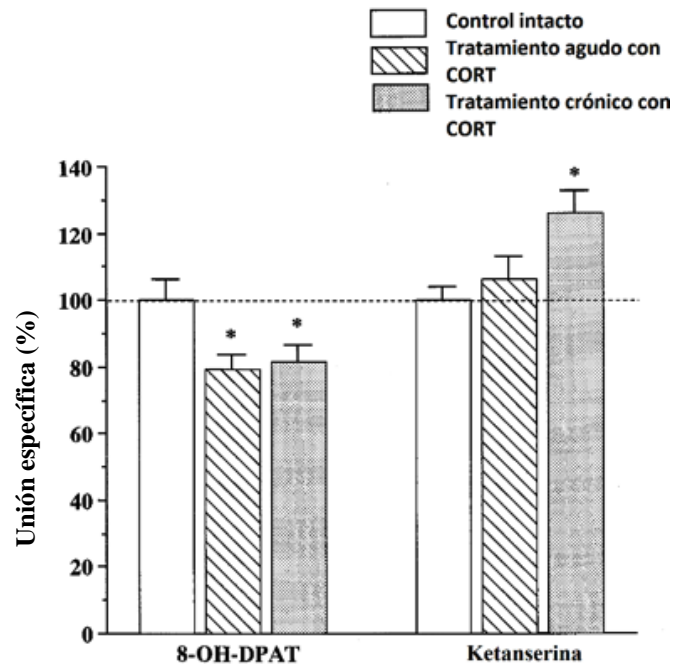


Figura 16. Efectos del tratamiento agudo y crónico con corticosterona sobre la unión a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}. El 8-OH-DPAT, agonista específico de los receptores 5-HT_{1A}, y la ketanserina, antagonista específico de los receptores 5-HT_{2A}, fueron utilizados para medir la unión a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en un homogeneizado total de hipocampo y de corteza frontal respectivamente. *P < 0.05 (Takao y col., 1997).

Los cambios antes mencionados en la función de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} se han asociado también a comportamientos asociados a depresión en pruebas conductuales, tales como disminución en la interacción social y disminución de la actividad motora en la prueba del laberinto elevado (Fernandes y col., 1997).

Considerando la evidencia anterior, es posible que los glucocorticoides ejerzan también cambios en el sistema serotoninérgico a nivel de los receptores 5-HT₇, sin embargo, no existe hasta la fecha un estudio que reporte tales datos.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la incidencia de los desórdenes relacionados con el estrés, así como de muchos otros padecimientos sobre los cuales se acepta al estrés crónico como un factor importante de predisposición, se ha incrementado de manera notable. La evidencia que refiere la disociación entre los glucocorticoides y la ACTH en condiciones de estrés crónico como un indicador de la desregulación del eje HPA, sugiere la existencia de un mecanismo alternativo de producción de glucocorticoides que posiblemente se encuentre regulado por el sistema nervioso. Por otro lado, diversos estudios reportan que el tratamiento crónico con CORT produce cambios en el sistema serotoninérgico de la rata, entre los que se cuentan cambios en la función y expresión de diversos receptores. Debido a los reportes que apuntan la participación de la serotonina y su receptor 5-HT₇ como un factor importante en el mecanismo alternativo de producción de glucocorticoides, y dado que no existe aún un estudio que refiera el efecto directo de la administración de CORT exógena sobre este subtipo de receptor a 5-HT, el presente trabajo busca aportar evidencia que ayude a determinar si el tratamiento crónico con CORT es suficiente para inducir los cambios propios del estrés crónico que se piensa son mediados por el sistema serotoninérgico. A futuro, los resultados obtenidos podrían ser de gran importancia en la investigación sobre los mecanismos y efectos del estrés y coadyuvar a mejorar los tratamientos terapéuticos.

HIPÓTESIS

La administración crónica de CORT (50 mg/kg, s.c.) durante 14 días promoverá un aumento de la expresión de los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales, en comparación con el tratamiento de VEH (1 mL/kg, s.c.), lo cual será visualizado como un aumento de la IR-5-HT₇ a nivel de la corteza adrenal y de la cantidad de proteína en glándulas adrenales completas; dicho incremento se verá asociado a un aumento de la inmunorreactividad a la 5-HT en la corteza adrenal. Así mismo, con relación al VEH el tratamiento crónico con CORT promoverá una disminución significativa de la secreción de ACTH y un aumento de la secreción de CORT en respuesta al estrés agudo por restricción de movimiento.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si el tratamiento crónico con corticosterona (50 mg/kg/día, durante 14 días) produce efectos similares a los ocasionados por el estrés crónico por restricción de movimiento (20 min/día, durante 14 días) sobre la expresión de los receptores 5-HT₇ en la corteza de las glándulas adrenales de la rata y sobre la respuesta endócrina (ACTH y CORT) al estrés agudo.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto del tratamiento crónico (14 días) con CORT (50 mg/kg, s.c.) sobre la inmunorreactividad a los receptores 5-HT₇ y a la 5-HT en la corteza de las glándulas adrenales.
2. Investigar el efecto del tratamiento crónico con CORT sobre la cantidad de proteína de los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales.
3. Determinar el efecto del tratamiento crónico (14 días) con CORT (50 mg/kg, s.c.) sobre los niveles plasmáticos de ACTH y CORT en ausencia y presencia de estrés agudo.

METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (170-180 g de peso corporal) provenientes de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (UPEAL-CINVESTAV). Los animales fueron alojados dentro de la UPEAL en cajas de acrílico bajo un ciclo de luz/oscuridad de doce horas y con libre acceso al agua y al alimento hasta el día de sacrificio.

Tratamiento crónico con corticosterona

Se administró a los animales una dosis de CORT de 50 mg/kg, utilizando como VEH una solución de β -ciclodextrina al 20% en solución salina, vía subcutánea durante 14 días consecutivos. Para el caso de los animales CTRL, únicamente se administró el VEH del fármaco.

Perfusión intracardiaca

La perfusión se llevó a cabo vía la aorta ascendente, por medio de una bomba peristáltica Masterflex. Primero se hizo pasar una solución de salina de fosfatos (PBS 0.1 M, pH = 7.4), a una velocidad de 11 ml/min durante 6 min. Posteriormente, se administró una solución de paraformaldehído (PFA), al 4% en PBS al 0.1 M, a una velocidad de 11 ml/min durante 40 min. Al terminar este procedimiento, las glándulas adrenales fueron removidas y colocadas en PFA al 4% en PBS 0.1 M durante 24 h. Concluido este periodo, las glándulas adrenales fueron traspasadas a una solución de sacarosa al 30% con 0.1 % de azida de sodio. Las glándulas adrenales fueron almacenadas en contenedores diferentes con el fin de distinguir entre la glándula izquierda y la glándula derecha.

Inmunohistoquímica contra los receptores 5-HT₇

Las glándulas adrenales se seccionaron en cortes de 20 µm de espesor utilizando un criostato (Leica CM1510) a -24 °C; los cortes fueron recuperados en un portaobjetos, mismos que se almacenaron en congelación (-20 °C) por una noche. Al día siguiente, los portaobjetos se dejaron temperar a temperatura ambiente por diez minutos para posteriormente realizar dos lavados de 5 min c/u con PBS 0.1 M, añadiendo una gota sobre cada corte. Al finalizar, se colocó una gota de buffer de citrato de sodio a 67 °C a cada corte, misma que se dejó actuar durante diez minutos. Después, se dieron tres lavados de 5 min c/u con PBS 0.1 M y se incubaron los tejidos con una solución de H₂O₂ al 3% en PBS 0.1 M durante 30 min, en una cámara húmeda. Terminado este tiempo, se realizó una incubación con solución bloqueadora universal diluida 1:10 en agua bidestilada por 30 min. Una vez concluido este tiempo, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario (Santa Cruz Biotechnology, SC-19160) diluido 1:200 en PBS 0.1 M con tritón al 0.02% durante una noche dentro de una cámara húmeda y refrigeración. Al día siguiente, se realizaron cuatro lavados con PBS 0.1 M (5 min c/u). Después, se añadió el anticuerpo secundario (Jackson Immunoresearch, 705-065-003) a una dilución 1:300 con PBS 0.1 M durante 2 h a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Al finalizar, cuatro lavados con PBS 0.1 M (5 min c/u) fueron realizados. Concluido este tiempo, se incubó con el complejo avidina-biotina (kit comercial VESTASTAIN ABC) en PBS 0.1 M por 2 h., para realizar posteriormente cuatro lavados con PBS 0.1 M (5 min c/u). Después, se procedió a revelar con el revelador de diaminobenzidina, DAB (kit VESTASTAIN DAB) por aproximadamente 1 minuto, o hasta alcanzar la coloración deseada; una vez lograda, se detuvo la reacción añadiendo agua bidestilada. Los tejidos se dejaron secar por alrededor de 2 h para sellarlos con un cubreobjetos y Entellan (Merk) para su posterior observación al microscopio.

Inmunohistoquímica contra la 5-HT

Las glándulas adrenales se seccionaron en cortes de 20 µm de espesor utilizando un criostato (Leica CM1510) a -24 °C; los cortes fueron recuperados en un portaobjetos, mismos que se almacenaron en congelación (-20 °C) por una noche. Al día siguiente, los portaobjetos se dejaron temperar a temperatura ambiente por diez minutos para después realizar dos lavados de 5 min c/u con PBS para eliminar el exceso de grasa del tejido, posteriormente, se

realizó una incubación de 30 min en una solución de peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich) al 3% en PBS 0.1 M a temperatura ambiente y bajo agitación constante. Al cumplirse este plazo, las secciones se incubaron con una solución bloqueadora (Power Block) a una dilución 1:10 en agua bidestilada durante toda la noche en refrigeración y agitación constante. A la mañana siguiente, se la solución bloqueadora fue reemplazada por el anticuerpo primario hecho en cabra (ImmunoStar, 20079) contra la 5-HT a una dilución de (1:1000) en PBS 0.1 M por 48 h en refrigeración y agitación constante. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 5 min c/u con PBS 0.1 M, para luego añadir el anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra hecho en burro (Jackson InmunoResearch, 705-065-003) a una dilución de 1:200 en PBS 0.1 M más BSA al 0.5%, en refrigeración y agitación constante durante una noche entera. Una vez concluido este tiempo, se realizaron 4 lavados de 5 min c/u con PBS 0.1 M, para posteriormente incubar con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, ABC (kit comercial de VESTASTAIN ABC) en PBS 0.1 M por 2 h en agitación constante. Para finalizar, las secciones se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, DAB (kit VESTASTAIN DAB) por aproximadamente 1 minuto (hasta obtener la coloración deseada), para realizar posteriormente 4 lavados de 5 min c/u con agua biotestilada. Los tejidos se dejaron secar por alrededor de 2 h para sellarlos con un cubreobjetos y Entellan (Merk) para su posterior observación al microscopio.

Microscopía

Los cortes de las glándulas adrenales sometidos a inmunohistoquímica fueron fotografiados utilizando una cámara Nikon DS-Ri1 acoplada a un microscopio Nikon Eclipse 80i, mediante el programa NIS-Elements versión AR.

Inducción de estrés agudo

En el día número 15, las ratas tratadas de manera crónica con CORT, así como el grupo administrado con VEH, fueron sometidos a estrés agudo por restricción de movimiento durante 10 y 30 min, esto es, introduciendo a los animales a un cilindro de área ajustable para impedirles el movimiento. Al finalizar este periodo, los animales fueron decapitados. Animales

de cada grupo sin ser sometidos a estrés agudo (0 min) fueron también incluidos en el estudio.

Determinación del cambio en la ganancia de peso corporal y el tamaño del timo y las glándulas adrenales

El cambio en diversas variables somatométricas, como la ganancia de peso corporal o el tamaño del timo y las glándulas adrenales, son indicadores de la disfunción del eje HPA. El peso corporal fue registrado diariamente a lo largo del tratamiento crónico con CORT y su respectivo vehículo (14 días) y se reporta como el porcentaje de cambio de peso por día, con respecto al día número 1. En el día número 15, las glándulas adrenales y el timo de los animales sometidos a estrés agudo fueron obtenidos y pesados, para reportarse el resultado del cambio en su peso como peso relativo, es decir, mg de tejido/100g de peso corporal.

Determinación de los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona

Para la obtención del plasma, la sangre colectada después de la decapitación fue centrifugada a 3000 rpm y almacenada a -80 °C hasta el momento de ser utilizadas. Los niveles plasmáticos de CORT y ACTH se determinaron mediante una prueba de ELISA, utilizando los kits comerciales Enzo Life Science (ADI-900-097) y Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (EK-001-21), respectivamente.

Cuantificación del receptor 5-HT₇ en las glándulas adrenales

Con el objeto de corroborar las observaciones realizadas en los ensayos de inmunohistoquímica, las cuales son consistentes con un posible aumento de la expresión de los receptores 5-HT₇ en la corteza adrenal como resultado del tratamiento con CORT, se procedió a cuantificar, mediante la técnica de Western blot, la cantidad de proteína de estos receptores en glándulas adrenales completas obtenidas de animales que recibieron ambos tratamientos (VEH y CORT). Un día después de finalizados los tratamientos (día 15), animales de ambos grupos fueron decapitados sin estímulo adicional alguno (0 min). Las glándulas adrenales fueron congeladas por inmersión en nitrógeno líquido y mantenidas en el Revco a -70°C hasta el día del experimento. El día del ensayo, los tejidos fueron colocados en buffer

Krebs-Henseleit frío y homogenizados 10 veces a una velocidad de 400-500 rpm con un politron.

Obtención de membranas

Para la obtención de las membranas las muestras homogenizadas se balancearon con 10 mL de Buffer Tris-HCl EGTA 10 mM/1 mM y fueron centrifugadas durante 15 min a 4500 rpm a 4°C; después de desechar el sobrenadante se balanceó nuevamente con Buffer Tris-HCl EGTA para luego centrifugar a 20000 G durante 25 min. Las membranas así obtenidas fueron resuspendidas en RIPA con inhibidores de proteasas y luego se colocaron en hielo durante 15 min. Las muestras se sonicaron añadiendo después 200 µL de buffer de muestra (buffer Laemly 450 µL y 50 µL de β mercaptoetanol) y 10 µL de urea al 10%. Luego se procedió a desnaturalizar las proteínas calentando las muestras a 100°C durante 10 min. Posteriormente las muestras se colocaron en hielo para ser luego separadas en alícuotas de 100 µl; una de estas muestras se utilizó para la determinación de proteínas por el método de Lowry.

Western blot

Cantidades iguales de proteína (35 µg) se cargaron sobre un gel de electroforesis de poliacrilamida dodecil-sulfato de sodio al 10% (H₂O, acrilamida al 30%, Tris, SDS 10%, persulfato de amonio 10%, TEMED), en el cuarto pozo se colocó 7µl del marcador de peso molecular (Dual-color; Bio-Rad), fueron separadas por electroforesis a 90 Volts durante 2 horas, después se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinildieno por 1 hora a 12 Volts utilizando un transblot semiseco (BioRad). Se bloquearon las membranas por 2 h a temperatura ambiente en una solución de lavado de leche baja en grasa al 5% y BSA 3% sobre un agitador; transcurrido el tiempo, se desechó la leche y se le agregó el anticuerpo policlonal de conejo contra el receptor serotoninérgico 5-HT₇ (48 kDa, Novus Biologicals), o anticuerpo policlonal de conejo contra la subunidad β1 de la Na⁺/K⁺ ATPasa (50 kDa; Millipore, Santa, USA), diluciones 1:1000, en solución de lavado de PBS 0.1M con 2% de gelatina, sobre un agitador durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día se desechó la solución y se realizaron 3 lavados con solución TBS 2% sobre un agitador durante 10 min a temperatura ambiente, a su término se incubaron con el anticuerpo secundario HRP-Goat Anti Rabbit (Invitrogen, USA) conjugado con peroxidasa de rábano dilución 1:10,000 sobre un agitador, por una hora a temperatura ambiente, y fueron lavadas en 3 ocasiones con solución de lavado (TBS 2%). Las

membranas fueron incubadas con sustrato de blotting de quimioluminiscencia (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) de acuerdo con el protocolo del fabricante y expuestas a un film para su revelado inmediato.

Análisis estadístico

Los datos en el texto, las Figuras y las Tablas se muestran como la media \pm el error estándar de la media. Los datos obtenidos en los grupos de animales tratados con VEH y CORT fueron comparados mediante pruebas t no pareadas (peso relativo de las glándulas adrenales y del timo), ANOVA bifactorial de medidas repetidas (ganancia de peso corporal) y ANOVA bifactorial convencional (niveles circulantes de ACTH y CORT), siendo el peso y el tiempo por un lado, y el tratamiento farmacológico (VEH y CORT) y el tiempo de estrés agudo (0, 10 y 30 min) por el otro lado, los factores intergrupales independientes. Las pruebas estadísticas y las gráficas fueron realizadas utilizando el programa SigmaStat y GraphPad Prism 5.0, respectivamente.

Fármacos

Los fármacos utilizados en los presentes experimentos fueron la corticosterona (Sigma-Aldrich) y la 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (2-HP- β -CD; Sigma-Aldrich), siendo esta última utilizada como VEH.

Diseño experimental

Se utilizaron dos grupos experimentales que recibieron tratamiento crónico con CORT y con VEH, respectivamente, durante 14 días. En el día número quince, un grupo de animales de cada tratamiento fue perfundido para obtener las glándulas adrenales y realizar la inmunohistoquímica contra los receptores 5-HT₇ y contra la 5-HT. Un día después de finalizados los tratamientos, otros grupos de animales fueron utilizados para la obtención de muestras sanguíneas en ausencia (0 min) y presencia de estrés agudo por restricción de movimiento (10 y 30 min). Para ello, los animales fueron decapitados sin estímulo adicional alguno (0 min) o inmediatamente después de concluida la sesión de estrés agudo por restricción de movimiento a los 10 y 30 min. Las glándulas adrenales y el timo fueron

extraídos de estos animales, sirviendo las primeras, provenientes de los animales sin estímulo de estrés agudo, para la realización de los ensayos de Western Blot con el propósito de determinar la cantidad de proteína de los receptores 5-HT₇ (Fig. 17).

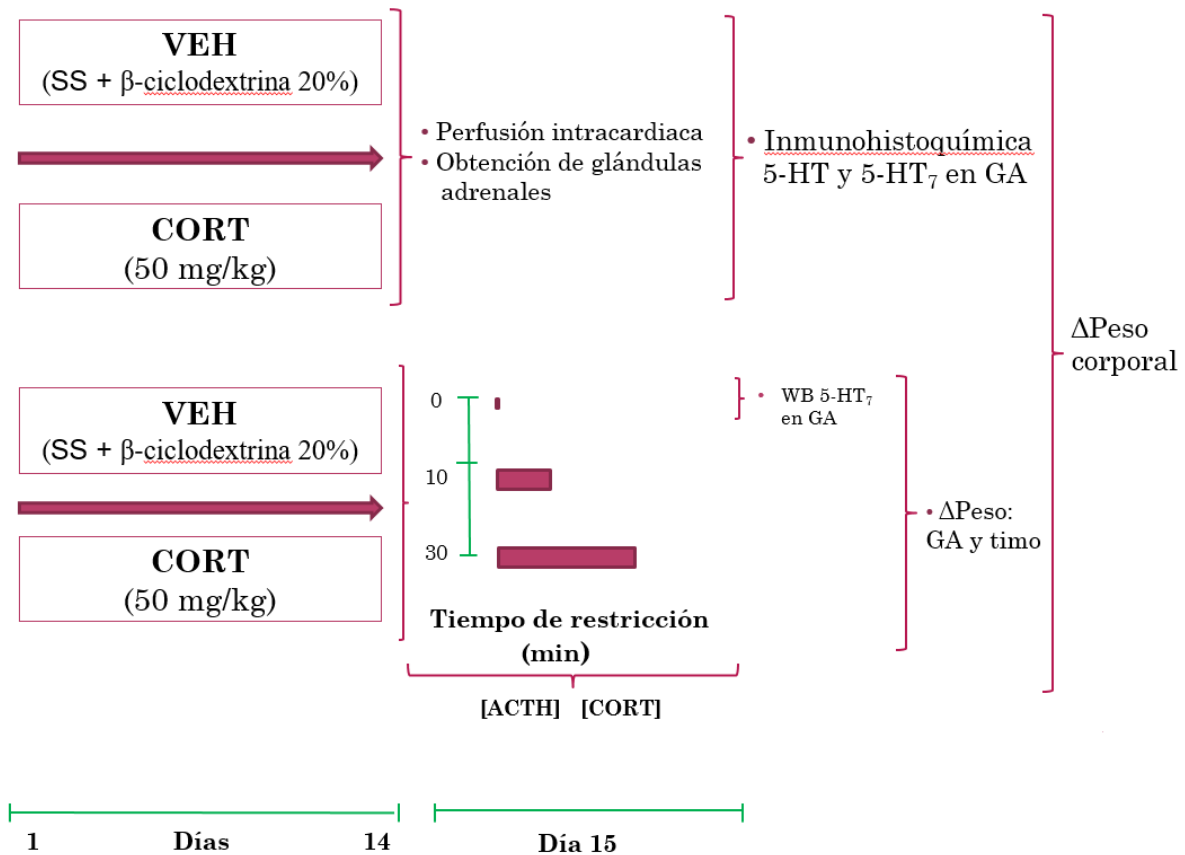


Figura 17. Diseño experimental. GA = glándulas adrenales.

RESULTADOS

Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre las variables somatométricas

Diversos estudios han demostrado que el estrés crónico produce un efecto significativo sobre algunas variables somatométricas como la ganancia de peso corporal, el peso absoluto y relativo de las glándulas adrenales y del timo. En el presente estudio, el tratamiento crónico con CORT produjo una reducción significativa de la ganancia de peso corporal expresada como porcentaje de ganancia de peso corporal por día, con respecto al día 1 (Fig. 18). El efecto del tratamiento crónico con CORT sobre el peso relativo (mg de tejido/100g de peso corporal) de las glándulas adrenales y del timo se muestra en la Tabla 3

Como se puede observar en la figura 18, el efecto del tratamiento crónico con CORT (50 mg/kg por 14 días) produjo una reducción de la ganancia de peso corporal con respecto del tratamiento con VEH, la cual fue estadísticamente significativa a partir del cuarto día de tratamiento (n = 54; Vh = 27, CORT = 27).

En el caso de las glándulas adrenales, de manera contraria a lo reportado en animales sometidos a estrés crónico, el tratamiento crónico con CORT produjo una involución de estos órganos la cual se reflejó como una reducción de su peso relativo con respecto del observado en las adrenales de los animales que recibieron VEH (Tabla 2); tal efecto fue estadísticamente significativo únicamente en el caso de la glándulas adrenales derecha (Tabla 2). Finalmente, al igual que lo reportado en animales sometidos a estrés crónico, el peso relativo del timo fue significativamente menor en los animales tratados crónicamente con CORT en comparación con los que recibieron VEH (Tabla 3).

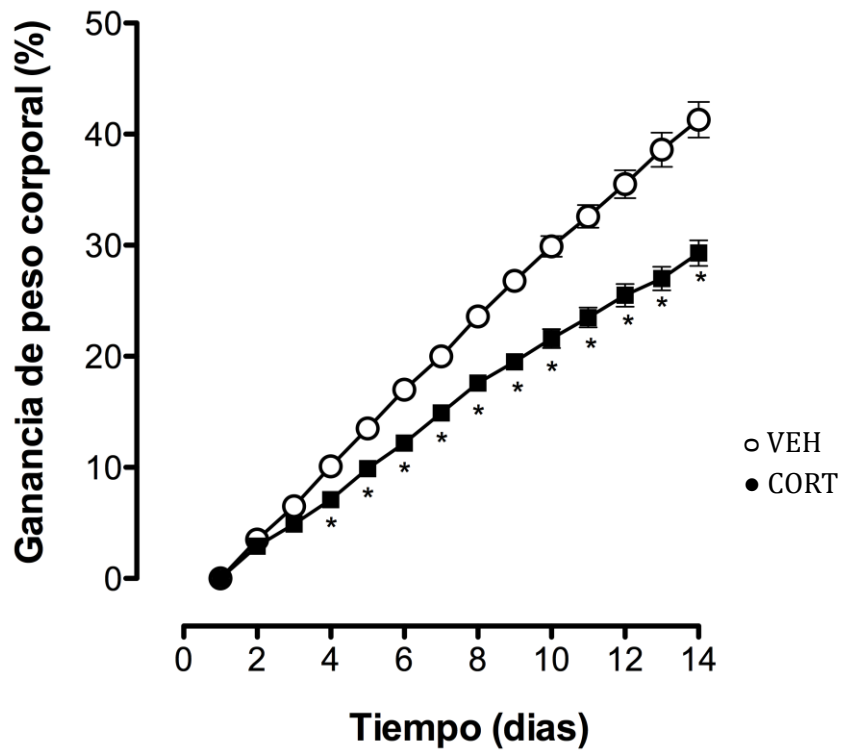


Figura 18. Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la ganancia de peso corporal. VEH = vehículo; CORT = corticosterona. *P < 0.001 vs VEH.

Tabla 3. Peso relativo de las glándulas adrenales y del timo (mg/100 g de peso corporal).
GA=glándula adrenal; VEH=vehículo; CORT=corticosterona

GA izquierda		GA derecha		Timo	
VEH	CORT	VEH	CORT	VEH	CORT
3.19 ± 0.12	2.90 ± 0.14	3.22 ± 0.15	2.54 ± 0.15*	58.40 ± 2.42	27.35 ± 1.64*

Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales

Las Figuras 19 y 20 muestran el efecto del tratamiento crónico con CORT (paneles derechos) con respecto del VEH (paneles izquierdos) sobre la IR-5-HT₇ en las glándulas adrenales izquierda y derecha, respectivamente. En ambos grupos se observa la señal en las zonas más externas de la corteza adrenal, área que corresponde a la *zona glomerulosa* y zona fasciculata, siendo en ésta última donde se lleva a cabo la producción de glucocorticoides. La IR-5-HT₇ fue notablemente mayor en las glándulas adrenales de los animales que recibieron CORT (derecha) en comparación con aquellos que recibieron tratamiento con VEH (izquierda).

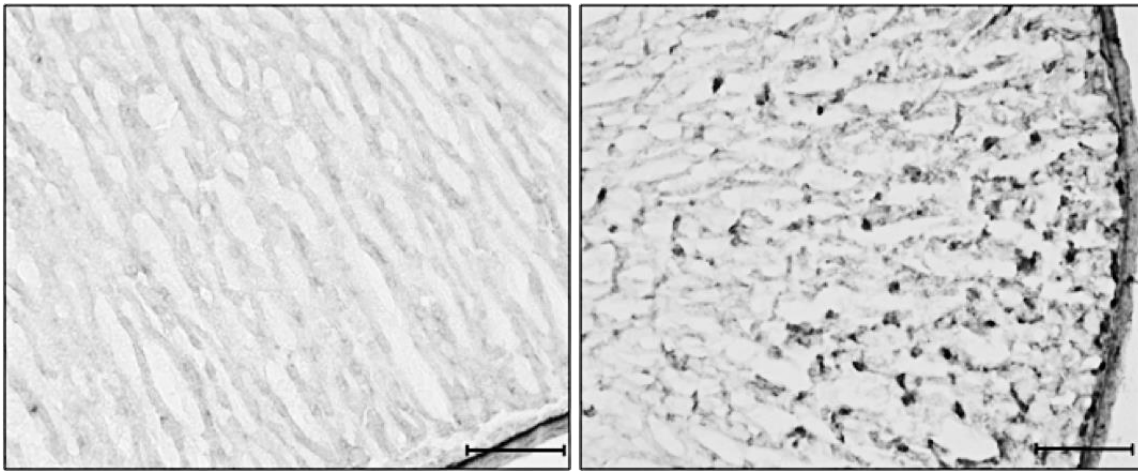


Figura 19. Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a los receptores 5-HT₇ en la glándula adrenal izquierda. Izq.) Vehículo; Der.) Corticosterona. Las fotografías fueron tomadas a una magnificación de 20x. La CORT fue administrada a una dosis de 50 mg/kg.

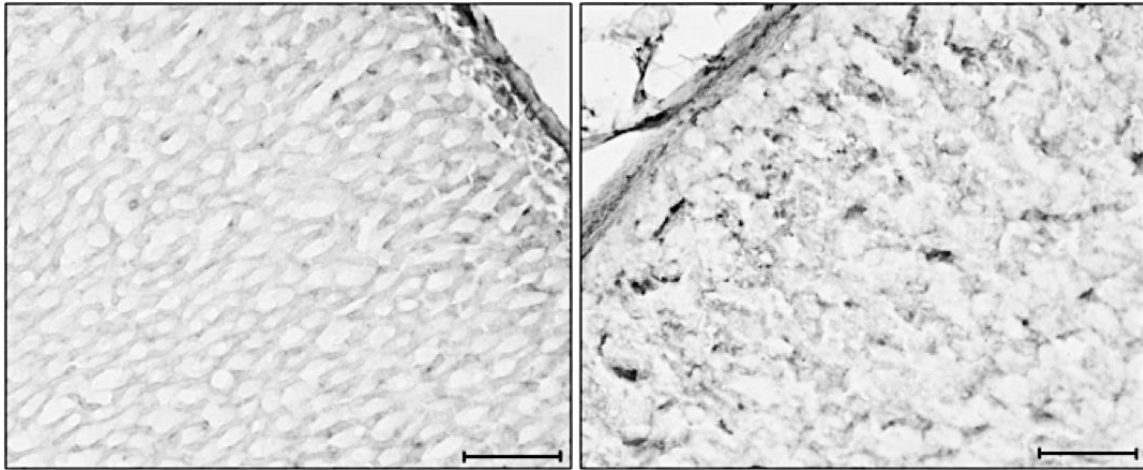


Figura 20. Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a los receptores 5-HT₇ en la glándula adrenal derecha. Izq.) VEH; Der.) CORT. Las fotografías fueron tomadas a una magnificación de 20x. La CORT fue administrada a una dosis de 50 mg/kg.

Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a 5-HT en las glándulas adrenales

Las Figuras 21 y 22 muestran el efecto del tratamiento crónico con VEH y CORT sobre la IR-5HT en las glándulas adrenales izquierda y derecha, respectivamente. Del lado derecho se observa la IR-5HT correspondiente a los animales que fueron administrados con CORT durante 14 días, mientras que el lado izquierdo corresponde a los animales tratados sólo con VEH. De manera cualitativa se aprecia un aumento aparente de la IR-5HT en los animales inyectados con CORT en comparación del respectivo VEH, en las zonas correspondientes a la *zona glomerulosa* y *zona fasciculata*, lugar donde se lleva a cabo la producción de glucocorticoides. Se puede apreciar que la CORT produce un aumento en la IR-5-HT con respecto del VEH. De manera paralela a lo ocurrido con las IR-5-HT₇, el aumento de células inmunorreactivas es mayor en el lado izquierdo que en el derecho.

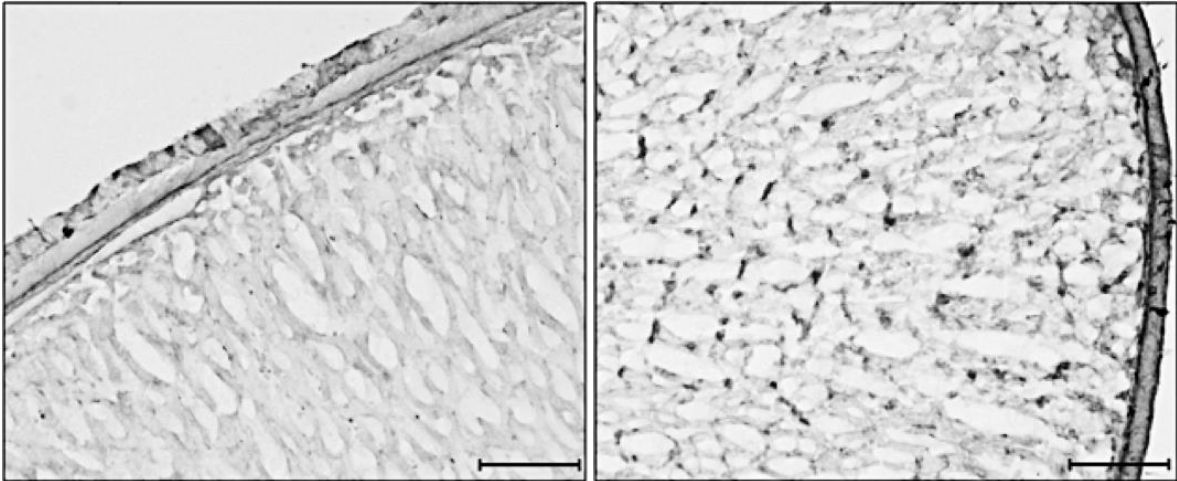


Figura 21. Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a la 5-HT en la glándula adrenal izquierda. Izq.) VEH; Der.) CORT. Las fotografías fueron tomadas a una magnificación de 20x. La CORT fue administrada a una dosis de 50 mg/kg por día durante 14 días.

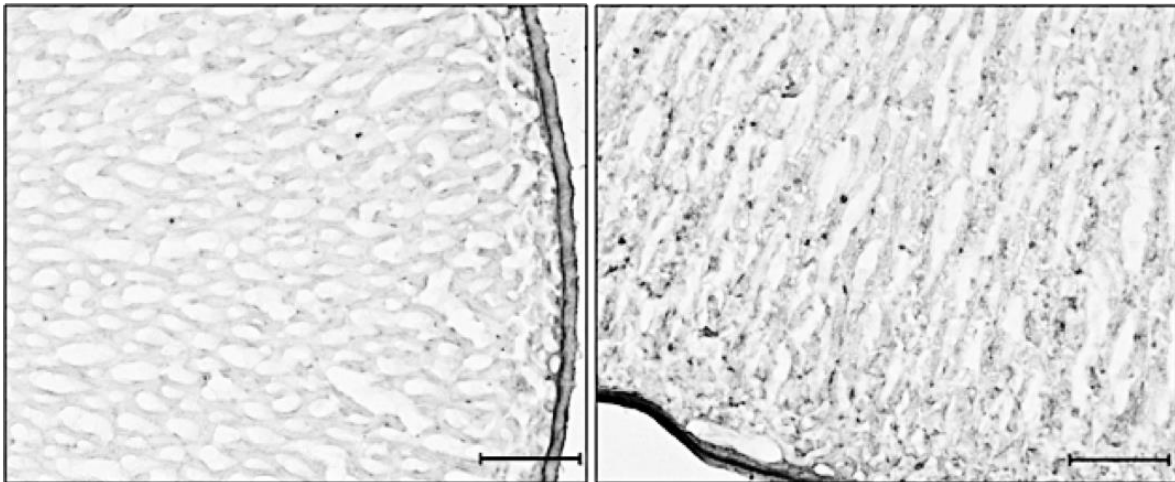


Figura 22. Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la inmunorreactividad a la 5-HT en la glándula adrenal derecha. Izq.) VEH; Der.) CORT. Las fotografías fueron tomadas a una magnificación de 20x. La CORT fue administrada a una dosis de 50 mg/kg por día durante 14 días.

Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre la cantidad de proteína de los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales

Como se muestra en la Figura 23, el contenido de proteína de los receptores 5-HT₇ en extractos de glándulas adrenales totales se vio significativamente incrementado como resultado del tratamiento crónico con CORT en comparación con el VEH. Tal fenómeno fue observado tanto en la glándula adrenal izquierda como en la derecha (Fig. 23). Estos resultados son similares a los observados en las glándulas adrenales de animales sometidos a estrés crónico por restricción de movimiento durante 2 semanas (García-Iglesias y col., 2013).

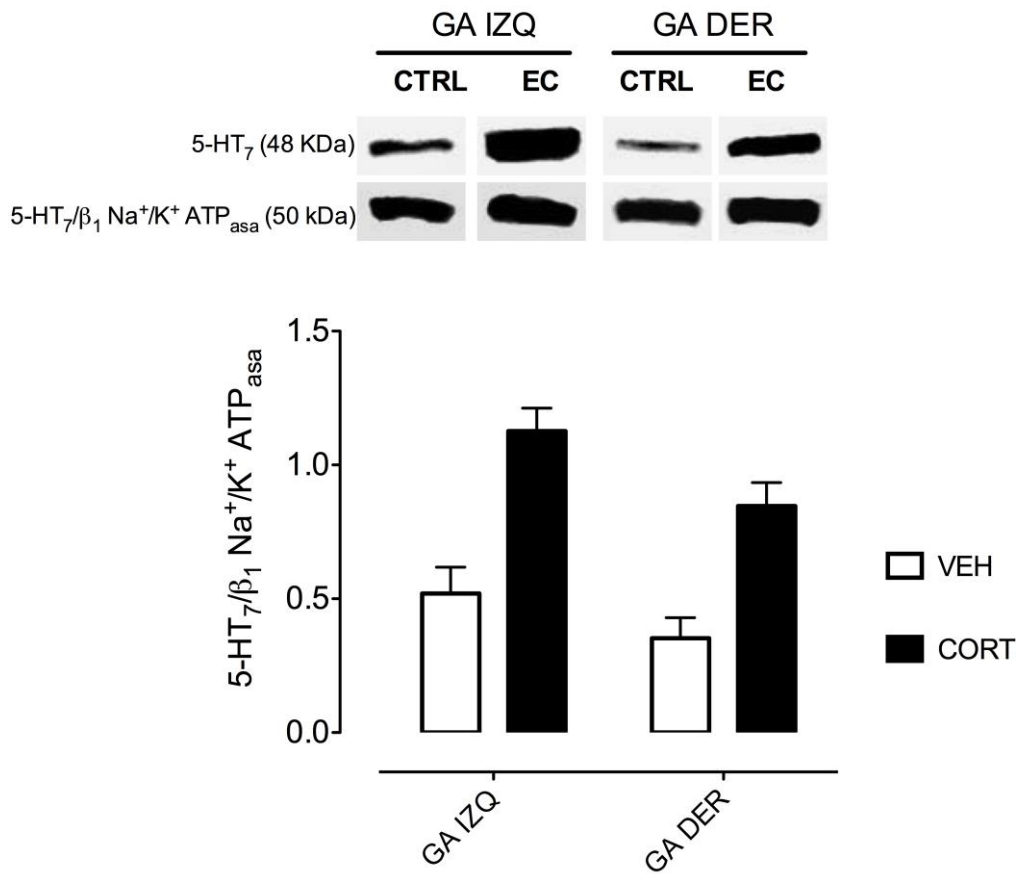


Figura 23. Efecto del tratamiento crónico con corticosterona (CORT) en comparación con el vehículo (VEH) sobre la cantidad de proteína de los receptores 5-HT₇ en glándulas adrenales completas. Se muestran los resultados en las glándulas adrenales del lado izquierdo (GA IZQ) y del lado derecho (GA DER) tomadas de animales de los grupos de 0 min (en ausencia de estrés agudo).

Efecto de tratamiento crónico con corticosterona sobre los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona en ausencia y presencia de estrés agudo por restricción de movimiento

La Figura 24 muestra el efecto del tratamiento crónico con CORT, en comparación con el VEH, sobre los niveles basales (0 min; en ausencia de estrés agudo) y los inducidos por la exposición a estrés agudo por restricción de movimiento durante 10 y 30 min, de ACTH. Como puede observarse, el tratamiento con CORT produjo una disminución significativa ($P < 0.05$) de los niveles plasmáticos de ACTH medidos inmediatamente después de una sesión de estrés agudo por restricción de movimiento de 10 min, pero no tuvo efecto sobre los niveles basales (0 min; sin estrés agudo) y los determinados inmediatamente después de la sesión de 30 min de estrés agudo (Fig. 24). No obstante, en todos los casos se observó una tendencia clara hacia la reducción de los niveles de ACTH como resultado de la exposición a niveles elevados de CORT durante el tratamiento. (Fig. 24).

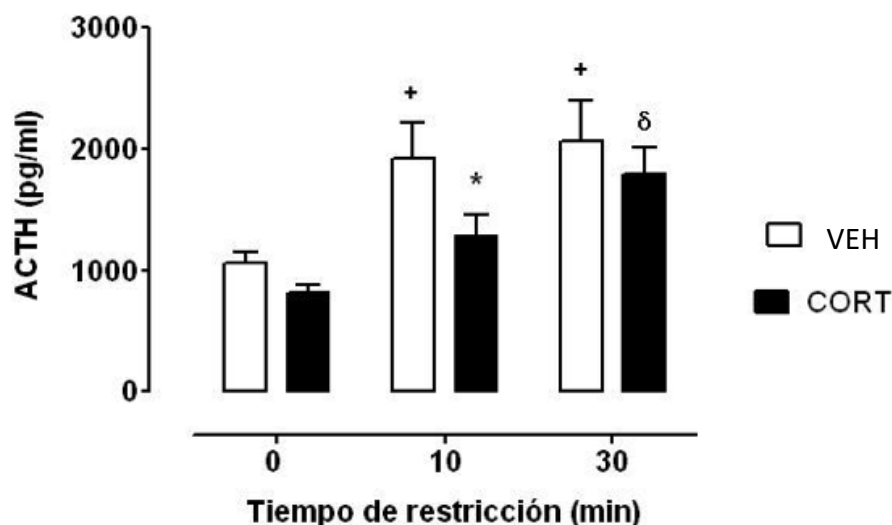


Figura 24. Secreción de ACTH en respuesta al estrés agudo por restricción de movimiento (restricción de movimiento) en animales sometidos a un tratamiento crónico con CORT y su vehículo (VEH). La CORT fue administrada a una dosis de 50 mg/kg durante 14 días. En el día número 15, se indujo un estímulo de estrés agudo por restricción de movimiento de 10 y 30 min. Terminado este tiempo, los animales fueron decapitados para recolectar la sangre del tronco y obtener el suero para la posterior determinación de los niveles de CORT mediante un kit comercial de inmunoensayo (ELISA). De manera adicional, los niveles basales de esta hormona fueron determinados. ^{*} $P < 0.05$ vs VEH; ⁺ $P < 0.05$ vs VEH (0 min); ^δ $P < 0.05$ vs CORT (0 min).

Por su parte, en la Figura 25 se muestran los niveles de CORT basales y en respuesta a 10 y 30 min de estrés agudo por restricción de movimiento. El nivel basal de esta hormona en los animales que recibieron la inyección diaria de CORT durante 14 días, es significativamente mayor que los animales a los que únicamente se administró VEH. Para el caso del estrés agudo, tanto para los 10 y 30 min de restricción de movimiento, el grupo de animales de VEH presenta una secreción de CORT ligeramente menor que aquellos que recibieron el tratamiento con CORT. En ambos tiempos de restricción de movimiento, tanto el grupo de VEH como el de CORT, liberan cantidades de CORT que son significativamente mayores a sus respectivos niveles basales.

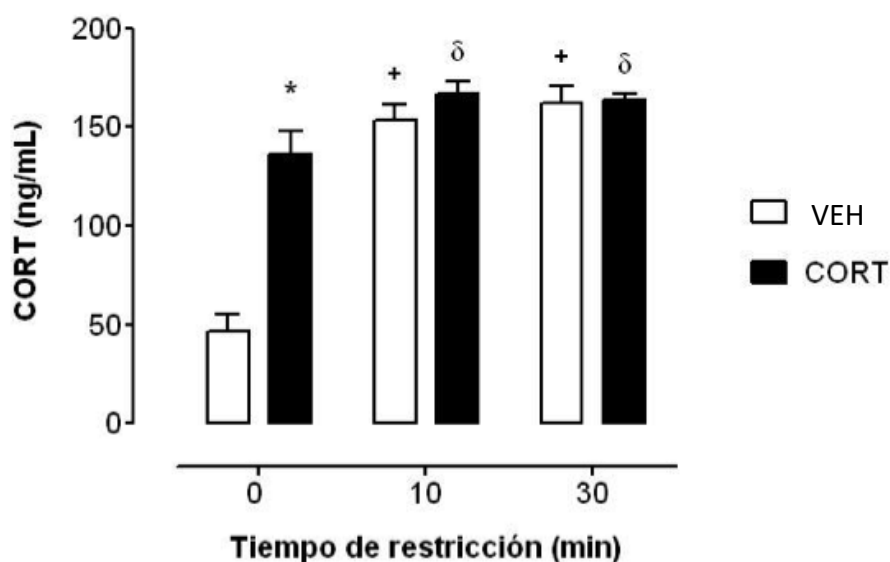


Figura 25. Secreción de corticosterona (CORT) en respuesta al estrés agudo por restricción de movimiento (restricción de movimiento) en animales sometidos a un tratamiento crónico con CORT y su vehículo (VEH). La CORT fue administrada a una dosis de 50 mg/kg durante 14 días. En el día número 15, se indujo un estímulo de estrés agudo por restricción de movimiento de 10 y 30 min. Terminado este tiempo, los animales fueron decapitados para recolectar la sangre del tronco y obtener el suero para la posterior determinación de los niveles de CORT mediante un kit comercial de inmunoensayo (ELISA). De manera adicional, los niveles basales de esta hormona fueron determinados. *P<0.05 vs VEH; +P<0.05 vs VEH (0 min); ^δP<0.05 vs CORT (0 min).

DISCUSIÓN

En términos generales, los resultados del presente estudio son consistentes con la idea de que las alteraciones producidas por el estrés crónico por restricción de movimiento en ratas (20 min/día, durante 14 días; García-Iglesias y col., 2013) son en parte dependientes de los glucocorticoides. Esta idea se basa en el hecho de que los cambios observados en los animales que recibieron el tratamiento crónico con CORT, a pesar de ser de menor magnitud con respecto de los reportados en animales con historial de estrés crónico, siguieron esencialmente el mismo patrón que éstos. Específicamente, en lo referente a los parámetros somatométricos (también denominados morfométricos), los animales que recibieron tratamiento con CORT presentaron una reducción significativa de la ganancia de peso corporal y del peso relativo del timo reflejando así un fenómeno de involución de este órgano. Por el contrario, en lo relativo a las glándulas adrenales el tratamiento con CORT promovió un fenómeno de involución el cual es opuesto a la hipertrofia que ha sido reportada consistentemente en modelos animales de estrés crónico, incluido el de restricción de movimiento (García-Iglesias y col., 2013). Por otro lado, el tratamiento crónico con CORT, al igual que lo observado en animales con historial de estrés crónico, promovió un visible aumento de la IR-5-HT₇ y de la IR-5-HT a nivel de la corteza adrenal lo que sugiere que estos cambios son, al menos en parte, dependientes de los glucocorticoides. Como se puede apreciar no obstante, la magnitud del aumento de IR-5-HT₇ y de IR-5-HT en las glándulas adrenales de los animales que recibieron el tratamiento crónico con CORT con respecto de los que recibieron el tratamiento con VEH, es visiblemente menor que la reportada previamente entre animales que recibieron tratamiento de estrés crónico y control (sin estrés) (García-Iglesias y col., 2013) sugiriendo así que la activación de la respuesta fisiológica al estrés, que incluye fundamentalmente la estimulación del eje HPA, es necesaria para promover el incremento del tono serotoninérgico y de la expresión de los receptores 5-HT₇ a nivel de la corteza adrenal; aparentemente ambos eventos son necesarios para el desarrollo de la hipercorticoemia en ratas (García-Iglesias y col., 2013; Terrón, 2014) y, probablemente también, en pacientes con tumores adrenales hiperproductores de cortisol (Louiset y col., 2006). Finalmente, en lo que respecta a la respuesta endocrina al estrés agudo, que en nuestro trabajo consistió en la determinación de los niveles plasmáticos de ACTH y CORT en ausencia (0 min) y presencia de estrés agudo por restricción de movimiento (10 y 30 min), el tratamiento crónico con CORT produjo una reducción significativa de la secreción de ACTH inducida por la

exposición a estrés agudo por restricción de movimiento durante 10 min, en tanto que la secreción de CORT inducida por estrés agudo no se modificó significativamente encontrándose diferencia significativa únicamente en ausencia de estrés (0 min; Fig. 25). La disminución de la secreción de ACTH en los animales que recibieron tratamiento con CORT es consistente con nuestros resultados previos en animales con estrés crónico puesto que la secreción de la hormona en estos últimos se vio drásticamente reducida con respecto de los animales no estresados (García-Iglesias y col., 2013). Sin embargo, en contraste con lo observado en animales con estrés crónico, la magnitud de la reducción de la secreción de ACTH en respuesta al estrés agudo en el grupo de animales que recibió el tratamiento con CORT fue claramente menor que la observada en los primeros, sugiriendo nuevamente que el desarrollo de mecanismos esteroidogénicos adrenales independientes de ACTH requieren la activación de la respuesta fisiológica al estrés y no solo el aumento de los niveles circulantes de glucocorticoides. En concordancia con estas observaciones, la secreción de CORT inducida por estrés agudo no se vio significativamente alterada por el tratamiento crónico con CORT, lo que sugiere de nuevo que el fenómeno de hipercorticoemia involucra mecanismos adicionales al aumento de los niveles circulantes de glucocorticoides. Así, las presentes observaciones apoyan la hipótesis que plantea la participación parcial de los glucocorticoides en el desarrollo de la hipercorticoemia, siendo necesaria la participación de otros componentes de la respuesta fisiológica al estrés, como el sistema nervioso simpático, la innervación peptídica adrenocortical y el sistema inmune, entre otros (Bornstein y Chrousos, 1999; Bornstein y col., 2008).

Efecto del tratamiento crónico con corticosterona sobre los parámetros somatométricos

Se ha reportado previamente que el tratamiento crónico con CORT (10 mg/kg, dos veces al día por 7 días [Czyrak y col., 2003] o la implantación de un pellet de 100 mg por una semana [Fernandes y col., 1997]) produce una disminución en la ganancia de peso corporal. En concordancia con lo anterior, los resultados de nuestro estudio indican que la administración crónica con CORT (50 mg/kg, durante 14 días) es también capaz de producir una disminución significativa de la ganancia de peso corporal en comparación con el VEH; tal diferencia fue estadísticamente significativa a partir del día 4 (Fig. 18). Este efecto es similar al encontrado

previamente en animales sometidos a estrés crónico por restricción de movimiento (20 min/día, durante 14 días) (García-Iglesias y col., 2013).

El CRF liberado durante el estrés ha sido relacionado estrechamente con la disminución de peso corporal debido a la inhibición que ocasiona sobre la liberación del neuropéptido Y (NPY) del núcleo arcuato en el hipotálamo (Calvez y col., 2011); el NPY tiene función orexigénica natural, es decir, actúa como inductor del apetito (Heinrichs y col., 1993). En este sentido, diversos protocolos de estrés crónico (inmovilización, restricción de movimiento, por 7, 14 o 27 días) han demostrado reducir de manera drástica la ingesta de alimento en ratas en comparación con los animales no estresados (Martí y col., 1994). Por otro lado, la administración de CORT a una dosis de 40 mg/kg durante 21 días, además de inducir una disminución significativa en la ganancia de peso corporal con respecto del VEH, produjo también un aumento en la inmunorreactividad al CRF en el NPV de la rata (Lee y col., 2013). Considerando lo anterior, es probable que el efecto sobre la ganancia de peso corporal producido por el tratamiento crónico con CORT utilizado en este estudio (50 mg/kg por día, durante 14 días) funcione a través de la inhibición del apetito, probablemente vía la inhibición de la liberación de NPY. Deben considerarse no obstante otros posibles mecanismos como es la actividad proteolítica de los glucocorticoides (Becker, 2001; Martí y col., 1994).

Se sabe, por otro lado, que los glucocorticoides producen supresión de la función inmune (Chrousos, 2009), lo cual es consistente con la involución del timo que se ha observado consistentemente en diversos protocolos de estrés crónico (García-Iglesias y col, 2013; Choi y col., 2008; Ulrich-Lai y col, 2006), así como tras la administración crónica de CORT (Czyrak y col., 2003; Fernandes y col., 1997). De este modo, los presentes resultados indican que el tratamiento crónico con CORT, a una dosis de 50 mg/kg por día durante 14 días, es suficiente para inducir una involución significativa del timo, en comparación con el efecto del VEH (Tabla 3). Asimismo, el aumento en el tamaño de las glándulas adrenales es otra de las variables somatométricas que se ven alteradas por el estrés crónico (García-Iglesias y col, 2013; Choi y col., 2008; Martí y col., 1993; Ulrich-Lai y col., 2006), efecto que se asocia tanto a hiperplasia como a hipertrofia de las células en la *zona fasciculata*, región en la que se lleva a cabo la síntesis y secreción de los glucocorticoides (Ulrich-Lai y col., 2006). No obstante, en contraste con el efecto del estrés crónico, la literatura refiere que la administración crónica de CORT produce un fenómeno de involución en las glándulas adrenales (Czyrak y col., 2003; Fernandes y col., 1997), efecto que es dependiente de la dosis (Solomon y col., 2011) y que es

mimetizado por el agonista sintético de los glucocorticoides, dexametasona (Rafacho y col., 2008; Solomon y col., 2011). De acuerdo con estas observaciones, nuestros resultados muestran que el tratamiento crónico con CORT produjo efectivamente involución de las glándulas adrenales. Del mismo modo, gran cantidad de estudios clínicos revelan que los tratamientos prolongados con glucocorticoides como agentes terapéuticos, conllevan en muchas ocasiones una insuficiencia adrenal que involucra la disminución de su tamaño (Lansang y Kramer, 2011; Girard y col., 1979), efecto que se relaciona con una deficiencia de secreción de ACTH y, por tanto, de estimulación de esta hormona hacia sus receptores en la *zona fasciculata* y la *zona reticularis* de la corteza adrenal (Raff y col., 2014). Debido a que nuestros resultados indican una alteración en la secreción de ACTH que, en respuesta al estrés agudo se encuentra disminuida, es probable que la involución en las glándulas adrenales de los animales sometidos al tratamiento crónico con CORT esté influenciada por la deficiente liberación de ACTH.

Posible relación entre los glucocorticoides y la expresión de receptores 5-HT₇ a nivel adrenocortical

Los efectos de los glucocorticoides son mediados por dos tipos de receptores ampliamente distribuidos en el organismo, los receptores a mineralocorticoides y los receptores a glucocorticoides, siendo los primeros los que poseen mayor afinidad por el cortisol y regulan las funciones habituales del organismo como los ciclos circadianos, mientras que los receptores a los glucocorticoides actúan cuando los niveles de estas hormonas se incrementan de manera considerable (Young y col., 2016). Tras su activación, los receptores a glucocorticoides pueden formar dímeros que se translocan hasta el núcleo celular para activar, inhibir o reprimir la transcripción de diversos genes (De Kloet y col., 1998), de los que se cuentan más de 200, por ejemplo, aquellos que están presentes en células del sistema inmunitario, entre muchos otros (Galon y col., 2002; Barnes, 2011; Kadmiel y Cidlowski, 2013).

Gran cantidad de estudios indican que los glucocorticoides pueden alterar la expresión de algunos componentes del sistema serotoninérgico como son algunas enzimas y receptores. Así, se ha reportado que la adrenalectomía produce un aumento en la expresión de los receptores 5-HT₆ y 5-HT₇ en el hipocampo, en tanto que la dexametasona produce el efecto opuesto (Le

Corre y col., 1997; Shimizu y col., 1997; Yau y col., 1997). Por otro lado, la administración de CORT durante 21 días aumenta la expresión de la triptófano hidroxilasa 2, enzima limitante en la biosíntesis de la 5-HT en el núcleo dorsal del raquí (Donner y col., 2012). Asimismo, se demostró que el tratamiento crónico con CORT (50 mg/kg por día durante 14 días), al igual que la implantación de un pellet de 100 mg durante una semana, aumentan la unión del antagonista 5-HT₂, ketanserina, y del agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, en el hipocampo (Takao y col., 1997; Fernandes y col., 1997). Finalmente, en otro estudio se reportó que la administración de CORT (10 mg/kg por día) durante 14 días induce un aumento en la activación de los receptores 5-HT₇ en el hipocampo (Tokarski y col., 2009). Con base en lo anterior, resulta evidente que los glucocorticoides ejercen un efecto importante sobre la expresión génica del sistema serotoninérgico, por lo que la hipótesis de que sean estos los responsables del aumento de la expresión de los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales de animales con historial de estrés crónico (García-Iglesias y col., 2013) parece factible. Los resultados del presente estudio así lo sugieren puesto que el tratamiento crónico con CORT produjo un claro, aunque modesto aumento de la expresión de dichos receptores en la corteza adrenal. Se debe destacar, no obstante, que el mecanismo preciso involucrado en este efecto, así como el que subyace la desregulación del eje HPA durante el estrés crónico, es hasta ahora desconocido.

Los receptores 5-HT₇ pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G_s (Atanes y col., 2013), por lo que su activación promueve el incremento de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), encargado de generar diversas respuestas en el organismo a través de la fosforilación de la proteína cinasa A (PKA) (Conn, 2013). Se ha reportado que entre las funciones mediadas por la vía de señalización de AMPC/PKA pueden encontrarse la proliferación celular y la esteroidogénesis, ya que en tumores adrenales humanos hipersecretorios de cortisol, en los que se ha reportado la expresión ectópica de receptores 5-HT₇, la presencia de un inhibidor de PKA, el H-89, redujo significativamente la producción de cortisol en cultivos celulares provenientes de estos tumores (Louiset y col., 2006), hecho que resulta de gran interés puesto que en condiciones normales, los niveles basales de cortisol no se ven afectados por el H-89 (Mazzocchi y col., 2005). Dado que en condiciones de estrés crónico se ha reportado un aumento en la expresión de receptores 5-HT₇ y también una secreción exacerbada de CORT en respuesta al estrés agudo (García-Iglesias y col., 2013), es probable que en condiciones patológicas la estimulación continua de AMPC en las células

adrenocorticales promueva la proliferación celular y la esteroidogénesis a través de los receptores 5-HT₇ (Terrón, 2014).

Alteraciones en el sistema endócrino en respuesta al estrés agudo ocasionadas por el tratamiento crónico con corticosterona

Con respecto de las alteraciones endocrinas reportadas en modelos animales de estrés crónico, se han reportado niveles basales disminuidos de ACTH (Tauchi y col., 2008; Malkesman y col., 2006; García-Iglesias y col., 2013), lo cual podría explicarse por una sensibilidad alterada de la corteza adrenal ocasionada por un proceso de regulación descendente de los receptores a la ACTH (Sánchez y col., 1998), sin embargo, no está claro si estos efectos son producidos directamente por la acción de los glucocorticoides. En este sentido, nuestros resultados muestran que el tratamiento crónico con CORT promovió un descenso modesto, aunque no significativo, de los niveles basales de ACTH en comparación con el VEH (Fig. 24). Resulta interesante sin embargo que la secreción de ACTH en respuesta al estrés agudo por restricción de movimiento durante 10 min se vio significativamente disminuida por efecto del tratamiento con CORT, lo cual sugiere que parte del mecanismo que genera la reducción de ACTH inducida por el estrés crónico es mediado por los glucocorticoides involucrando probablemente otros mecanismos como es la estimulación simpática. En concordancia con lo anterior, Dallman y col. (1987) demostraron previamente que la administración de CORT altera la secreción de ACTH, pues al implantar un pellet de CORT al 40% con colesterol en ratas adrenalectomizadas, cuyas concentraciones en sangre se mantuvieron entre 2-4 µg/dL durante 7 días, la liberación de ACTH se redujo, disminución que tiende a aumentar conforme la dosis de CORT se incrementa (Dallman y col., 1987). En nuestro estudio, el pico de ACTH se alcanzó entre los 10 y 20 min posteriores al inicio del estrés agudo, y la concentración de ACTH alcanzada por los animales tratados con CORT fue menor que la observada en animales que recibieron VEH. Como ya se mencionó, sólo el tiempo de 10 min reportó una diferencia significativa entre la CORT y el VEH (Fig. 24). Para ambos grupos, la concentración de ACTH tiende a aumentar en función del tiempo. Aunque diversos estudios indican que los altos niveles de glucocorticoides inducen una disminución en la secreción de ACTH, la inyección que los animales recibieron cada día durante el tratamiento puede considerarse por sí sola como un estímulo estresor, y dado que la CORT administrada trata de emular los efectos de los glucocorticoides liberados durante el estrés, es

probable que esta tendencia esté relacionada de manera directa con una elevada cantidad de glucocorticoides en la circulación.

Con respecto de la secreción de glucocorticoides en nuestros experimentos, los niveles basales de CORT en el grupo que recibió el tratamiento con CORT fueron significativamente más elevados que los observados en el grupo que recibió el VEH (Fig. 25). Dado que los niveles de CORT inducidos por estrés agudo por restricción de movimiento en ambos grupos (VEH y CORT) no fueron diferentes, es probable que la diferencia entre los grupos en el tiempo de 0 min haya sido consecuencia de la última administración de CORT un día antes del sacrificio de los animales, y no el resultado de una secreción exacerbada ocasionada por el tratamiento, el cual se ha demostrado es efectivo para aumentar los niveles circulantes de CORT (Fernandes y col., 1997; Czyrak y col., 2003). Así, los niveles de CORT medidos en los animales tratados con CORT y sometidos a estrés agudo por restricción de movimiento durante 10 y 30 min pueden reflejar la suma de los niveles remanentes del tratamiento y los inducidos por el estrés agudo (Fig. 25). Por otro lado, es sabido que después de un periodo de estrés crónico, en donde la secreción de glucocorticoides se mantiene elevada, existe una sensibilización de la respuesta secretoria de glucocorticoides hacia un nuevo estresor (Harris y col., 2004; Bhatnagar y Dallman, 1998), y dado que la CORT exógena busca emular la secreción de CORT endógena durante el periodo de estrés crónico, la restricción de movimiento en nuestro protocolo podría ser considerada como un nuevo estresor. No obstante, si tal sensibilización ocurre en nuestros experimentos, ésta no fue detectada.

La administración oral de CORT (a través del agua de bebida; 100 y 400 µg/ml) durante 21 días abolió el patrón circadiano de secreción de CORT (Donner y col., 2012). Resulta interesante que después del tratamiento con la concentración de 100 µg/ml, los niveles basales de la hormona fueron menores con respecto de los observados en animales que recibieron VEH; en el caso de la concentración más alta, ésta produjo también una disminución de los niveles basales de ACTH (Donner y col., 2012). Con base en estas observaciones, es probable que los altos niveles de glucocorticoides influyan de maneras distintas en las diversas respuestas del organismo, según su concentración y su vía de administración. En nuestro caso, el tratamiento crónico con dosis elevadas de CORT (50 mg/kg) no fue capaz de mimetizar el efecto del estrés crónico en cuanto a la disociación entre la secreción de CORT y ACTH en respuesta al estrés agudo (García-Iglesias y col., 2013).

Relación entre el aumento de los niveles circulantes de corticosterona y la expresión de receptores 5-HT₇ en la corteza adrenal

A pesar de que se ha establecido que el sistema serotoninérgico modula la actividad del eje HPA a través de las proyecciones que los núcleos medial y dorsal del rafe envían hacia las células parvocelulares del NPV (Larsen y col., 1996; Liposits y col., 1987), la evidencia que señala el papel de los receptores 5-HT₇ en este mecanismo regulatorio es aún escasa. En condiciones no patológicas, tales receptores se han encontrado en el hipotálamo, el hipocampo y la amígdala; además se ha propuesto su participación en la regulación de los ciclos circadianos y en los mecanismos involucrados en un gran número de desórdenes psiquiátricos como la ansiedad y la depresión (Varnäs y col, 2004). Diversos reportes indican que los antagonistas de los receptores 5-HT₇, al ser administrados junto con fármacos antidepresivos, como la imipramina o la desipramina, potencian el efecto de estos medicamentos (Wesołowska y col., 2007), además de producir efectos antidepresivos por sí mismos, como es el caso del SB-269970, el cual reduce el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, comportamiento asociado a la depresión en roedores (Hedlund y col., 2005; Wesołowska y col., 2007). Así pues, es posible que estos receptores desempeñen un papel importante en la desregulación del eje HPA bajo condiciones de estrés crónico.

Los resultados de este trabajo indican que el tratamiento cónico con CORT (50 mg/kg, durante 14 días) es suficiente para promover un aumento de la IR-5-HT₇ en la corteza de las glándulas adrenales (Figs. 19 y 20) en comparación con el VEH. Este hallazgo, el cual sugiere un aumento de la expresión de los receptores, fue confirmado por Western blot (Fig. 23), dando soporte por lo tanto a la hipótesis de que la expresión ectópica de receptores 5-HT₇ involucrados en la secreción exacerbada de glucocorticoides bajo condiciones de estrés crónico (García-Iglesias y col., 2013; Terrón, 2014) es dependiente, al menos en parte, de los propios glucocorticoides. De este modo, los glucocorticoides liberados en exceso durante el estrés crónico podrían alterar la expresión de los receptores 5-HT₇ y de otros mecanismos ectópicos productores de glucocorticoides en la corteza adrenal, mismos que podrían subyacer hipersecreción de estas hormonas y, posteriormente, promover las alteraciones propias de los DRE (Chrousos, 2009; Terrón, 2014).

El papel de los receptores 5-HT₇ ha sido dilucidado en la disfunción del eje HPA inducido por estrés crónico probando los efectos de su antagonista específico SB-656104 sobre los niveles de CORT en respuesta al estrés agudo en ratas con historial de estrés crónico,

produciendo la abolición del incremento de CORT producidos por el estrés crónico, de manera que los valores registrados para los animales sometidos a estrés crónico son comparables con los obtenidos por los animales CRTL (García-Iglesias y col., 2013). Puesto que se ha confirmado la presencia del RNAm de este receptor en la corteza adrenal de la rata en condiciones no patológicas (*zona glomerulosa* y *zona fasciculata/reticularis*), pero no en la médula (Contesse y col., 1999), se sugiere que los receptores 5-HT₇ en las células parvocelulares del NPV pueden modular la secreción de CRF y por lo tanto también la de ACTH en la pituitaria, para finalmente promover la liberación de CORT en las glándulas adrenales; sin embargo, la presencia de los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales después de la exposición prolongada a estrés, sugiere además un papel de estos en la secreción de CORT de manera independiente de ACTH (Terrón, 2014; Bornstein y col., 2008). Desde el punto de vista clínico, los receptores 5-HT₇ en las glándulas adrenales podrían por tanto representar un blanco terapéutico importante no sólo para la depresión, sino para los DRE caracterizados por el funcionamiento alterado del eje HPA, pues el mecanismo de acción de los antagonistas de los receptores 5-HT₇ podría involucrar la inhibición de la secreción exacerbada de glucocorticoides, impidiendo de este modo que se alcancen niveles patológicos de los mismos en la circulación.

Resulta por demás interesante que en cultivos celulares provenientes de tumores adrenales humanos hipersecretorios de cortisol se ha reportado expresión ectópica de receptores 5-HT₇ (Louiset y col., 2006), lo que sugiere que estos participan en la producción de glucocorticoides vía una acción paracrina de la 5-HT cuyos niveles en la corteza adrenal se ven considerablemente aumentados durante el estrés crónico (García-Iglesias y col., 2013). Dado que los receptores 5-HT₇ se expresan también en los vasos sanguíneos que irrigan el tejido adrenocortical, es posible que estos desempeñen un papel en la regulación de la esteroidogénesis mediante cambios del flujo sanguíneo adrenal (Louiset y col., 2006). De hecho, se sabe que la producción de cortisol en los tumores adrenales humanos mencionados anteriormente, es mediada por receptores 5-HT₇ puesto que en células en cultivo provenientes de dichos tumores la 5-HT induce potentemente la secreción de cortisol, respuesta que es inhibida por el antagonista 5-HT₇, SB-269970; además, se detectó la presencia de IR-5-HT₇ en estos tejidos, no así en el caso de tejidos sanos (Louiset y col., 2006). Está comprobado que la sobre activación del eje HPA, hecho que acompaña a los DRE, se mejora con fármacos que tienen como blanco el sistema serotoninérgico, y dado que los antagonistas 5-HT₇ han demostrado tener buenos efectos como antidepresivos, además de

inhibir la secreción exacerbada de CORT bajo condiciones de estrés crónico (García-Iglesias y col., 2013), es probable que el mecanismo de acción involucrado opere a través de la supresión de los altos niveles circulantes de los glucocorticoides a nivel adrenocortical, lo cual evidentemente requeriría de la liberación local de 5-HT en la corteza adrenal.

Alteraciones de la 5-HT inducidas por el tratamiento crónico con corticosterona

Es aceptado que la 5-HT puede regular la función del eje HPA debido a la innervación que el NPV recibe de los núcleos medial y dorsal del raqué (Larsen y col., 1996; Liposits y col., 1987); en menor medida, tales neuronas inervan directamente a las células corticotrópicas de la glándula pituitaria, promoviendo de este modo la secreción de CRF, ACTH y glucocorticoides (Jørgensen y col., 1999). De hecho, se reportó que la destrucción de las terminales serotoninérgicas del NPV y del raqué previene el incremento de la secreción de CORT plasmática inducido por diversos estímulos (Van de Kar, 1991). Asimismo, desde un punto de vista funcional, la 5-HT estimula la secreción de glucocorticoides tanto en animales como en humanos (Ehrhart-Bornstein y col., 1998), y se ha demostrado su presencia en las células medulares de las glándulas adrenales del ratón (Ritzén y col., 1965) y de la rata (Verhofstad y Jonsson, 1983; Holzwarth y Brownfield, 1985). Sin embargo, la médula adrenal humana no contiene este neurotransmisor, pero sí se encuentra presente en los mastocitos, lo que sugiere que la 5-HT liberada de estas células puede estimular la secreción de glucocorticoides (Lefebvre y col., 1992) probablemente vía la activación de los receptores 5-HT₇ (García-Iglesias y col., 2013; presente estudio). En apoyo de esta posibilidad, se reportó que el agonista de los receptores 5-HT_{1A}/5-HT₇, 8-OH-DPAT, induce la secreción de CORT vía un mecanismo que no se ve totalmente inhibido tras la administración de un antagonista específico de los receptores 5-HT_{1A} (Vicentic y col., 1998).

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo sugieren que las alteraciones adrenocorticales (aumento de la expresión de receptores 5-HT₇ y de los niveles de 5-HT) y endocrinas (hipercorticoemia independiente de la secreción de ACTH) son parcialmente dependientes de los glucocorticoides. A juzgar por las variaciones en las variables somatométricas de los animales que recibieron el tratamiento crónico con CORT, los resultados indican que la disminución de la ganancia de peso corporal y la involución del timo durante el estrés crónico representan cambios dependientes de los glucocorticoides, no así la hipertrofia de las glándulas adrenales, la cual parece depender de otros mecanismos como puede ser la hiperactividad del sistema nervioso simpático. En el caso de la respuesta hormonal inducida por el estrés agudo por restricción de movimiento, parece claro que el aumento de la expresión de los receptores 5-HT₇ y de los niveles de 5-HT a nivel de la corteza adrenal no son suficientes por sí mismos para provocar la generación del estado de hipercorticoemia que se observa en animales con historial de estrés crónico. El papel de otros factores en este proceso no descarta por completo la participación de los receptores 5-HT₇ y de la 5-HT. Es necesario realizar más estudios para dilucidar la relación entre el sistema serotoninérgico y la disrupción del sistema endócrino propio del eje HPA durante el estrés crónico.

PERSPECTIVAS

Dado a que los resultados del presente trabajo indican que los elevados niveles de glucocorticoides liberados durante el estrés crónico influyen directamente en las alteraciones causadas en el funcionamiento del eje HPA y el sistema serotoninérgico, cambios que a su vez propician la manutención de la secreción exacerbada de glucocorticoides, las perspectivas de este proyecto se enfocan a analizar cuáles son los elementos del sistema serotoninérgico que intervienen en dicho proceso, con el objetivo de generar información que coadyuve a descubrir el estrecho mecanismo por medio del cual la 5-HT y los glucocorticoides generan el estado de hipercorticoemia en el organismo, importante factor de predisposición para una amplia gama de padecimientos.

BIBLIOGRAFÍA

- Atanes, P., Lacivita, E., Rodríguez, J., Brea, j., Burgueño, J., Vela, J.M., Cadavid, M.I., Loza, M.I., Leopoldo, M., Castro, M. 2013. The arylpiperazine derivatives N-(4-cyanophenylmethyl)-4-(2-diphenyl)-1-piperazinehexanamide and N-benzyl-4-(2-diphenyl)-1-piperazinehexanamide exert a long-lasting inhibition of human serotonin 5-HT₇ receptor binding and cAMP signaling. *Pharmacology Research & perspectives* [Vol. 1| Iss. 2| e00013.
- Balada, Ferran., Márquez, Cristina., Nadal, Roser., Redolar, Diego., Silvestre, Jordi. *Farmacología para fisioterapeutas*. Ed. Médica panamericana. p. 55.
- Barnes, P.J. 2011. Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol*. 163(1): 29-43.
- Bhatnagar S, Dallman M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic – pituitary–adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 1998;84:1025–39.
- Becker, K.L. 2001. *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. Lippincott Williams & Wilkins. p. 716.
- Bhatnagar, S., Huber, R., Nowak, N., Trotter, P. 2002. Lesions of the posterior paraventricular thalamus block habituation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to repeated restraint. *Journal of Neuroendocrinology*, 2002, Vol. 14, 403-410.
- Bornstein SR, Chrousos GP. (1999). Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J Clin Endocrinol Metab* 84(5): 1729-1736.
- Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. (2008). Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab* 19(5): 175-180.
- Calvez, J., Frometin, G., Nadkarni, N., Darcel, N., Even, P., Tomé, D., Ballet, N., Chaumontet, C., 2011. Inhibition of food intake induced by acute stress in rats is due to satiation effects. *Physiol Behav* 104(5): 675-683.
- Can, A., Dao, D.T., Arad, M., Terrillion, C.E., Piantadosi, S.C., Gould T.D. 2012. The mouse forced swim test. *J Vis Exp*. 59: e3638.
- Choi, D.C., Evanson, N.K., Furay, A.R., Ulrich-Lai, Y.M., Ostrander, M.M., Herman, J.P. 2008. The anteroventral bed nucleus of the stria terminalis differentially regulates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to acute and chronic stress. *Endocrinology*. 149(2): 818-826.
- Chrousos, G.P. 2000. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *International Journal of Obesity* (2000) 24 , Suppl 2, S50-S55.
- Chrousos, G.P. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*. 5(7): 374-381.

- Conn, M. 2013. Methods in enzymology. G protein coupled receptors. Modeling, activation, interactions and virtual screening. Academic Press. Elsevier. Vol. 52. p. 193.
- Contesse, V., Lenglet, S., Grumolato, L., Anouar, Y., Lihrmann, I., Lefebvre, H., Delarue, C., Vaudry, H. 1999. Pharmacological and molecular characterization of 5-hydroxytryptamine₇ receptors in the rat adrenal gland. *Molecular Pharmacology* 56:552-561.
- Crupi, R., Mazzon, E., Marino, A., La Spada, G., Bramanti, P., Cuzzocrea, S., Spina, E. 2010. Melatonin treatment mimics the antidepressant action in chronic corticosterone-treated mice. *Journal of Pineal Research* 2010; 49:123-129.
- Czyrak, A., Maćkowiak, M., Chocyk, A., Fijał, K., Tokarski, K., Bijak, M., Wędzony, K. 2002. Prolonged corticosterone treatment alters the responsiveness of 5-HT_{1A} receptors to 8-OH-DPAT in rat CA1 hippocampal neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 366: 357-367.
- Czyrak A, Maćkowiak M, Chocyk A, Fijał K, Gadek-Michalska A, Wędzony K. (2003). 8-OHDPAT-induced disruption of prepulse inhibition in rats is attenuated by prolonged corticosterone treatment. *Neuropsychopharmacology* 28(7): 1300-1310.
- Dallman, M.F., Akana, S.F., Jacobson, L., Levin, N., Cascio, C.S., Shinsako, J. 1987. Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;512:402-14.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joëls, M. 1998. Brain Corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev.* 19(3): 269-301.
- Donner, N., Montoya, C.D., Lukkes, J.L., Lowry, C.A. 2012. Chronic non-invasive corticosterone administration abolishes the diurnal pattern of tph2 expression. *Psychoneuroendocrinology* 37; 6445-661.
- Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J.P., Bornstein, S.R., Cherbak, W.A., Vinson, G.P. 1998. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocrine Reviews* 19(2): 101-143.
- Fernandes C, McKittrick CR, File SE, McEwen BS. (1997). Decreased 5-HT_{1A} and increased 5-HT_{2A} receptor binding after chronic corticosterone associated with a behavioral indication of depression but not anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 22(7): 477-491.
- Figueiredo, H.F., Bodie, B.L., Tauchi, M., Dolgas, C.M., Herman, J.P. 2003. Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* 144(12):5249-5258.
- Fink, 2000. *Encyclopedia of stress: A-D. Volume 1.* Academic Press. p.73.
- Fink, 2010. *Stress Science: Neuroendocrinology.* Academic Press. p. 76.
- Gal, B., López, M., Martín, A.I., Prieto, J. 2007. *Bases de la fisiología.* Editorial Tébar. p. 427.

- Galon, J., Franchimont, D., Hiroi, N., Frey, G., Boettner, A., Ehrhart-Bornstein, M, O'shea, J.J., Chrousos, G.P., Bornstein, S. 2002. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J.* 16(1): 61-71.
- García-Iglesias BB, Mendoza-Garrido ME, Gutiérrez-Ospina G, Rangel-Barajas C, Noyola-Díaz M, Terrón JA. (2013). Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: involvement of 5-HT₇ receptors. *Neuropharmacology* 71: 216-227.
- Gillenwater, J.Y., Grayhack. J.T., Howards, S.S., Mitchell, M.E., 2002. Adult and pediatric urology. Lippincott Williams & Wilkins. p. 540.
- Girard, J., Baumann, J.B., Graf, S., van Hess, G., Roseenthal, M., Zuppinger, K. 1979. Assessment of ACTH-adrenal activity after treatment with a glucocorticoid and an antiandrogenic steroid. *Toxicol., Suppl.* 2, 85-92.
- Goodman., Gilman. 2012. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12^a ed. McGraw Hill. p. 1212.
- Gray, M., Bingham, B., Viau, V. 2010. A comparison of two repeated restraint stress paradigms on hypothalamic-pituitary-adrenal axis habituation, gonadal status and central neuropeptide expression in adult male rats. *Journal of Neuroendocrinology* 22, 92-101.
- Gustafson, E.L., Durkin, M.M., Bard, J.A., Zgombick, J., Branchek, T.A. 1996. A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 657-666.
- Harris, R.B.S., Gu, H., Mitchell, T.D., Endale, L., Russo, M., Ryan, D.H. 2004. Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. *Pharmacology & Behavior* 81 557-568.
- Hedlund, P.B., Huitron-Resendiz, S., Henriksen, S.J., Sutcliffe, J.G. 2005. 5-HT₇ receptor inhibition and inactivation induce antidepressant-like behavior and sleep pattern. *Biol Psychiatry* 2005;58:831-837.
- Heinrichs, S., Menzaghi, F., Pich, E.M., Hauger, L., Koob, G.F. 1993. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding by neuropeptide Y. *Brain Res* 611: 18-24.
- Holmes, M.C., Di, R.G., Beckford, U., Gillham, B., Jones, M.T. 1982. Role of serotonin in the control of secretion of corticotrophin releasing factor. *J. Endocrinol.* 93, 151-160.
- Holzwarth, M.A., Brownfield, M.S. 1985. Serotonin coexists with epinephrine in rat adrenal medullary cells. *Neuroendocrinology*. 1985 Sep;41(3):230-6.
- Jacobson, L., Sapolsky, R. 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Reviews*. May; 12(2):118-34.
- Jones, M.T., Hilhouse, E.E., Burden, J. 1976. Effect on various putative neurotransmitters on the secretion of corticotrophin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro-a model of the neurotransmitters involved. *J. Endocrinol.* 1976 Apr;69(1):1-10.

- Jørgensen H, Knigge U, Kjaer A, Warberg J. (1999). Adrenocorticotrophic hormone secretion in rats induced by stimulation with serotonergic compounds. *J Neuroendocrinol* 11(4): 283-290.
- Kadmiel, M., Cidowski, JA. 2013. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 34(9): 518-530.
- Keeney, D.S., Jenkins, C.M., Waterman, M.R. 1995. Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo. *Endocrinology.* Nov; 136(11): 4872-9.
- Keeney, A., Jessop, D.S., Harbuz, M.S., Marsden, C.A., Hogg, S., Blackburn-Munro, R.E. 2006. Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal-axis function and hippocampal serotonin release in mice. *Journal of Endocrinology.* Vol. 18, 330-338.
- Kim, S., Park, S., Choi, S., Moon, B., Lee, K. Kang, S.W., Lee, M., Choi, S., Chun, B., Shin, K. 2006. *Neuropharmacology* 50 824-833.
- Kühnel, W. 2005. Atlas Color de citología e historia. 11^a edición. Ed. Médica Panamericana. p. 258.
- Kusek, M., Sowa, J., Tokarski, K., Hess, G. 2015. Impaired effect of activation of rat hippocampal 5-HT₇ receptors, induced by treatment with the 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2015, 66, 2, 301-308.
- Lansang, M.C., Kramer, L. 2011. Glucocorticoid-induced diabetes and adrenal suppression: how to detect and manage them. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* Volume 78. Number 11.
- Laplante, P., Diorio, J., Meaney, M.J. 2002. Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT₇ receptor. *Developmental Brain Research* 139 (002) 199-203.
- Larsen, P.J., Hay-Schmidt, A., Vrang, N., Mikkelsen, J.D., 1996. Origin of projectins from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study. *Neuroscience* 70, 963-988.
- Latarjet, M., Ruiz, A. 2005. Anatomía humana. Editorial Médica Panamericana. Tomo 2. p. 1692.
- Le Corre, S., Sharp, T., Young, A.H., Harrison, P.J. 1997. Increase of 5-HT₇ (serotonin-7) and 5-HT_{1A} (serotonin-1A) receptor mRNA expression in rat hippocampus after adrenalectomy. *Psychopharmacology* (1997) 130:368-374.
- Lee B, Sur B, Kwon S, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH. 2013. Chronic administration of catechin decreases depression and anxiety-like behaviors in a rat model using chronic corticosterone injections. *Biomol Ther (Seoul)*. 21(4): 313-322.
- Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Feuilloley, M., Hery, F., Grise, P., Raynaud, G., Verhofstad, J., Wolf, L.M., Vaudry, H. 1992. Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin₄ receptor subtype. *Neuroscience* Vol. 47, No. 4, pp.999-1007.

- Liposits, Z., Phelix, C., Paul, W.K. 1987. Synaptic interaction of serotonergic axons and corticotropin releasing factors (CRF) synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Histochemistry* 86, 541-549.
- Louisset E, Contesse V, Groussin L, Cartier D, Duparc C, Barrande G, Bertherat J, Vaudry H, Lefebvre H. (2006). Expression of serotonin₇ receptor and coupling of ectopic receptors to protein kinase A and ionic currents in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91(11): 4578-4586.
- Malkesman, O., Maayan, R., Weizman, A., Weller, A. 2006. Aggressive behavior and HPA axis hormones after social isolation in adult rats of two different genetic animal models for depression. *Behavioural Brain Research* 175 (2006) 408-414.
- Martí, O., Martí, J., Armario, A. 1994. Effects of chronic stress on food intake in rats: Influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav* 55(4): 747-753.
- Mazzocchi, G., Rebuffat, P., Ziolkowska, A., Rossi, G.P., Malendowicz, L.K., Nussdorfer, G.G. 2005. G protein receptors 7 and 8 are expressed in human adrenocortical cells, and their endogenous ligands neuropeptides B and W enhance cortisol secretion by activating adenylate cyclase and phospholipase C-dependent signaling cascades. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(6):3466-3471.
- Mendoza-Patiño. N. 2008. *Farmacología médica*. Ed. Médica panamericana. p. 444.
- Nieuwenhuijsen K, Bruinvels D, Frings-Dresen M. (2010). Psychosocial work environment and stress-related disorders, a systematic review. *Occup Med (Lond)* 60(4): 277-286.
- Orr, T., Meyerhoff, J.L., Mougey, E.H., Bunnell, B.N. 1990. Hyperresponsiveness of the rat neuroendocrine system due to repeated exposure to stress. *Psychoneuroendocrinology* 15 (5-6):317-28.
- Pan L, Gilbert F. (1992). Activation of 5-HT_{1A} receptor subtype in the paraventricular nuclei of the hypothalamus induces CRH and ACTH release in the rat. *Neuroendocrinology* 56(6): 797-802.
- Phillips, L.J., McGorry, P.D., Garner, B., Thompson, K.N., Pantelis, C., Wood, S., Berger, G. 2006. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*. 40:725-741.
- Rafacho, A., Giozzet, V.A.G., Boschero, A., Bosqueiro, J.R. 2008. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas* 36(3): 284-293.
- Raff, H., Sharma, S.T., Nieman, L.K. 2014. Physiological basis for the etiology, diagnosis, and treatment of adrenal disorders: Cushing's syndrome, adrenal insufficiency, and congenital adrenal hyperplasia. *Compr Physio*. April ; 4(2): 739-769.
- Ritzén, M., Hammarström, L., Ullberg, S. 1965. Autoradiographic distribution of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan in the mouse. *Biochemical Pharmacology*, 1965, Vol. 14, pp. 313-321.

- Sánchez, M.M., Aguado, F., Sánchez-Toscano, F., Saphier, D. 1998. Neuroendocrine and immunocytochemical demonstrations of decreased hypothalamo-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress after long-term social isolation. *Neuroendocrinology*. Vol. 139, No. 2.
- Sapolsky, R.M., Lewis, C.K., McEwen, B. 1985. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: Implications for aging. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 5, No. 5, pp. 1222-227.
- Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., Steinbusch, H.W., Verhofstad, A.A. 1983. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res.* 277,355-360.
- Shimizu M, Nishida A, Zensho H, Miyata M and Yamawaki S (1997) Down-regulation of 5 hydroxytryptamine₇ receptors by dexamethasone in rat frontocortical astrocytes. *J Neurochem* 68; 2604-2609
- Schnek, A., Massarini, A. 2008. *Curtis. Biología. Editorial Médica Panamericana.* pp. 675, 677-678.
- Selye H. (1955). Stress and disease. *Science* 122(3171): 625-631.
- Solomon, M.B., Sakai, R.R., Woods, S.C., Foster, M.T. 2011. Differential effects of glucocorticoids on energy homeostasis in Syrian hamsters. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E307-E316.
- Takao, K., Nagatani, T., Kitamura, Y., Yamawaki, S. 1997 Effects of corticosterone on 5-HT_{1A} and 5HT₂ receptor binding and on the receptor-mediated behavioral responses of rats. *European Journal of Pharmacology* 333 (1997) 123-128.
- Tarcic, N., Ovadia, H., Weiss, D.W., Weidenfeld, J. 1998. Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology* 82 (1998) 40-46.
- Tauchi, M., Zhang, R., D'Alessio, D.A., Seeley, R.J., Herman, J.P. 2008. Role of central glucagon-like peptide-1 in hypothalamo-pituitary-adrenocortical facilitation following chronic stress. *Exp. Neurol.*, 210 (2), 458-466.
- Terrón, J.A. 2002. Is the 5-HT₇ receptor involved in the pathogenesis and prophylactic treatment of migraine?. *European Journal of Pharmacology* 439 (2002) 1-11.
- Terrón JA. (2014). Novel insights into the potential involvement of 5-HT₇ receptors in endocrine dysregulation in stress-related disorders. *Rev Neurosci* 25(3): 439-449.
- Tokarski K, Pitra P, Duszyńska B, Hess G. (2009). Imipramine counteracts corticosterone-induced alterations in the effects of the activation of 5-HT₇ receptors in rat hippocampus. *J Physiol Pharmacol* 60(2): 83-88.
- Tomas, F.M., Munro, H.N., Young, V.R. 1979. Effect of glucocorticoid administration on the rate of muscle protein breakdown in vivo in rats, as measured by urinary excretion of N τ -Methylhistidine. *Biochem. J.* 178, 139-146.

- Ulrich-Lai, Y.M., Figueiredo, H.F., Ostrader, M.M., Choi, D.C., Engeland, W.C., Herman, J.P. 2006. Chronic stress induces adrenal hiperplasia and hypertrophy in a subregión-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E965-E973.
- Van de Kar, L.D. 1991. Neuroendocrine pharmacology of serotonergic (5-HT) neurons. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31, 292-294.
- Varnäs, K., Thomas, D.R., Tupala, E., Tiihonen, J., Hall, H. 2004. Distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain: a preliminary autordiographic study using [³H]SB-269970 *Neuroscience Letters* 367 (2004) 313-316.
- Velázquez, 2005. *Farmacología Básica y Clínica*. Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J.C., Lizasoain, I., Moro, M.A., eds. Editorial Médica Panamericana. 17^a edición. p. 28, 676.
- Verhofstad, A.A., Jonsson, G. 1983. *Neuroscience*. 1983 Dec;10(4):1443-53.
- Vicentic, A., Qian, L., Battaglia, G., Van de Kar, L.D. 1998. WAY-100635 inhibits 8-OH-DPAT-stimulated oxytocin, ACTH and corticosterone, but not prolactin secretion. *European Journal of Pharmacology* 346 (1998) 261-266.
- Wang, S., Yan, X., Hofman, M.A., Swaab, D.F., Zhou, J. 2010. Increased expression level of corticotropin-releasing hormone in the amígdala and in the hypothalamus in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Neurosci Bull* August 1, 2010, 26(4): 297-303.
- Wesołowska, A., Tatarczyńska, E., Nikiforuk, A., Chojnacka-Wójcik, E. 2007. Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT₇ receptor antagonist in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmacology* 555 (2007) 43-47.
- Yau, J.L.W., Noble, J., Woddowson, J., Seck, J.R. 1997. Impact of adrenalectomy on 5-HT₆ and 5-HT₇ receptor gene expression in the rat hippocampus. *Molecular Brain Research* 45; 182-186.
- Yau, J.L.W., Noble, J., Seckl, J. 2001. Acute restraint stress increases 5-HT₇ receptor mRNA expression in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters*. 309 (2001) 141-144.
- Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL. (2001). *Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Ed. Médica Panamericana, pp. 37-38.
- Young, K.D., Preskorn, S.H., Victor, T., Misaki, M., Bodurka, J., Drevets, W.C. 2016. The effect of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor antagonism on autobiographical memory recall and amygdala response to implicit emotional stimuli. *Int J Neuropsychopharmacol*. In press.
- Yu-Chen, L., Fu-Meng, W., Ying, P., Li-Qin, Q., Guang, C., Wei-Yun, Z., Ling-Dong, K. 2009. Antidepressant-like effects of curcumin on serotonergic receptor-coupled AC-cAMP pathway in chronic unpredictable mild stress of rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biologia Psychiatry* 33 (2009) 435-449.