

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

Departamento de Farmacología

**Participación del núcleo central de la amígdala en el control de la
conducta de ansiedad y la secreción de corticosterona en ratas
expuestas a estrés crónico**

Tesis que presenta

Saidel Moreno Martínez

Para obtener el grado de

Doctor 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; Grant No. 256882) y fue realizado por el becario con expediente de CVU. 828432 en el Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección del Doctor en Ciencias José Antonio Terrón Sierra, adscritos al departamento de Farmacología del CINVESTAV- IPN.

Dedicatoria

A mis padres: Antonio Aurelio y Juana Eloisa

Son el motor impulsor de mi vida, los amo con todo mi cerebro

A mi hermana guerrera: Susel Moreno Martínez

Eres el mayor ejemplo de lucha en la vida. Te quiero mucho

A mis abuelos: José y Ana Elba

Gracias por tanto amor

A mi prima casi hermana: Rachel

Eres la guía de todas mis buenas acciones. Gracias por estar siempre

para mi

Agradecimientos

Para la realización de este proyecto conté con el apoyo de muchas personas que me guiaron en este largo y difícil camino, lejos de mi familia, de mi hogar y de todas las personas que amo.

Quisiera empezar esta larga lista agradeciéndole a mi asesor el Dr. José Antonio Terrón Sierra por brindarme sus conocimientos, apoyo y asesoramiento para que este trabajo pudiera llegar a su fin. Muchas gracias por todo

A los miembros del comité tutorial, Dra. Ma. Del Carmen García García, Dr. Jorge A. Sánchez Rodríguez, Dr. Carlos Hoyo Vadillo y Dr. Gonzalo Flores Álvarez por sus valiosas contribuciones en cada seminario.

Al Dr. Gonzalo Flores Álvarez y su equipo de trabajo en Puebla (Dr. Hiram Tendilla, Dr. Rubén Vázquez, Andrea Vázquez y demás chicos del laboratorio) por brindarme toda su ayuda incondicional en todos los experimentos de morfología neural. Quiero agradecerle a Eunice Vera Aguilar, María de Lourdes González Flores, Mario Gil Moreno Martínez y Martha Noyola Díaz por su apoyo técnico durante la fase experimental de este trabajo. A Angélica Silva Olivares por su apoyo técnico en el procesamiento de muestras de histología.

A mis grandes amigas Luisa María Concepción Perdomo y Patricia Fernández Guerra por estar ser partes de mi familia y darme soporte durante este este periodo. A mis compañeros de laboratorio Shiu y Neeshu por toda su amistad y ayuda durante estos años. A mis amigos y compañeros de trabajo la Dra. María Isabel, Dr. Héctor Bayarre Veá, Cynthia y Remberto

A mi familia que son mi mundo y el motor impulsor de mi vida.

A todos muchas gracias por su apoyo y por formar parte de este proceso.

Tabla de contenido

Índice de figuras	I
Índice de Tablas	III
Listado de abreviaturas, siglas y acrónimos.....	IV
Resumen	VI
Abstract	VII
1. Introducción	1
2. Estrés	2
Evolución de la definición de estrés	2
Síndrome General de adaptación.....	3
3. Respuesta al estrés	4
Respuesta del Sistema Nervioso Autónomo y su regulación ante el estrés.....	5
Respuesta del eje Hipotalámico- Pituitaria- Adrenal ante el estrés.....	5
4. Mecanismos de acción de los glucocorticoides.....	7
5. Retroalimentación negativa.....	8
6. Estrés agudo o adaptativo	9
7. Estrés crónico.....	9
8. Ritmo circadiano del eje Hipotalámico – Pituitaria – Adrenal.....	10
Antecedentes específicos	10
9. Estructuras límbicas que participan en la respuesta al estrés	10
Participación de las estructuras límbicas en la respuesta al estrés	10
Cambios morfológicos en las estructuras del sistema límbico	11
10. Complejo amigdalino	12
Organización anatómica de la amígdala.....	12
Conexiones de la amígdala y el flujo de información	12
Núcleo Central de la Amígdala.....	13
11. Desregulación del Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal	14
12. Desórdenes relacionados con el estrés	15
Implicación del núcleo central de la amígdala en los desórdenes de ansiedad	15
13. Posible participación del núcleo central de la amígdala en la producción de glucocorticoides	17
14. Planteamiento del problema de investigación	19
15. Hipótesis.....	20
16. Objetivo General.....	20

17. Objetivos específicos	20
18. Metodología	21
18.1 Animales.....	21
18.2 Protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento	21
18.3. Determinación de los parámetros somatométricos	22
18.4. Pruebas conductuales	22
18.4.1. Prueba de laberinto elevado en cruz	22
18.4.2. Prueba de campo abierto	23
18.5. Técnica de Golgi-Cox.....	25
18.6. Criterios de evaluación y análisis morfológico neuronal del núcleo central de la amígdala	26
18.7. Análisis de la densidad dendrítica de las neuronas del núcleo central de la amígdala	27
18.8. Tipificación de espinas dendríticas de las neuronas del núcleo central de la amígdala	27
18.9. Lesión del núcleo central de la amígdala.....	28
18.10. Extracción de sangre y medición de Corticosterona plasmática	29
18.11. Diseño experimental.....	29
18.12. Presentación de datos y evaluación estadística	31
19. Resultados.....	32
19.1. Efecto del estrés crónico por restricción de movimiento sobre las variables somatométricas.....	32
19.2. Efecto de la exposición a estrés crónico sobre la conducta de ansiedad.....	34
Prueba de laberinto elevado en cruz	34
Prueba de campo abierto	36
19.3. Efecto del estrés crónico sobre la morfología neuronal en el núcleo central de la amígdala	38
Análisis de la morfología dendrítica en el núcleo central de la amígdala	38
Análisis de la densidad de espinas dendríticas y tipos de espinas	40
19.4. Efecto del período de recuperación sobre las alteraciones morfológicas y conductuales inducidas por el estrés crónico	41
Prueba de laberinto elevado en cruz después de un periodo de recuperación	41
Resultados del campo abierto después de un periodo de recuperación	43
Morfología neuronal del núcleo central de la amígdala.....	45

19.5. Efecto de la lesión del núcleo central de la amígdala sobre las alteraciones somatométricas, endocrinas y conductuales inducidas por el estrés crónico	46
Modificaciones de las variables somatométricas	46
Resultado de la prueba conductual de laberinto elevado en cruz	47
Secreción de corticosterona inducida por estrés agudo en ratas con historial de estrés crónico	49
20- Discusión	50
20.1. Discusión general	50
20.2. Modificaciones de las variables somatométricas como resultado de la exposición a estrés crónico	51
20.3. Efecto del estrés crónico de restricción sobre el desarrollo de una conducta similar a la ansiedad	53
Medición de la conducta ansiosa por la prueba de laberinto elevado en Cruz	53
Medición de la conducta similar a la ansiedad y locomoción por la prueba de campo abierto	54
20.4. Cambios en la morfología neuronal en el núcleo central de la amígdala como resultado de la exposición a estrés crónico y su posible relación con la ansiedad	56
20.5. Cambios en la densidad de espinas dendríticas como resultado de la exposición a estrés crónico	58
20.6. Cambios en los diferentes tipos de espinas dendríticas en las neuronas piramidales del núcleo central de la amígdala	59
20.7. Resultados de los niveles hormonales en ratas con historial de estrés crónico después de lesionada el núcleo central de la amígdala o administrado vehículo inducido por estrés agudo	62
21. Conclusiones	64
22. Perspectivas	64
23. Referencias bibliográficas	65

Índice de figuras

Figura 1. Síndrome de adaptación general descrito por Hans Selye.....	4
Figura 2. Vía de activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal en respuesta a un estresor y retroalimentación negativa que ejercen los glucocorticoides en el hipotálamo.....	7
Figura 3. Fotografía representativa del laberinto elevado en cruz implementado.....	25
Figura 4. Esquema representativo del campo abierto implementado.....	26
Figura 5. Esquema representativo del análisis de Sholl.....	28
Figura 6. Esquema de la morfología de las espinas dendríticas objeto de estudio.....	30
Figura 7. Protocolo experimental utilizado en las pruebas conductuales y morfológicas...	32
Figura 8. Gráficos de comparación de la ganancia de peso corporal, peso relativo del timo y el peso relativo de las adrenales como índice de estrés crónico una vez finalizados los tratamientos CRS y CTRL.....	34
Figura 9. Gráficos de comparación de la ganancia de peso corporal, peso relativo del timo y el peso relativo de las adrenales posterior a 14 días de recuperación una vez finalizados los tratamientos CRS y CTRL.....	35
Figura 10. Efecto del estrés crónico de restricción en relación con el tratamiento control sobre los parámetros medidos la prueba de laberinto elevado en cruz.....	37
Figura 11. Efecto del estrés crónico de restricción en relación con el tratamiento control sobre el índice de ansiedad medidos la prueba de laberinto elevado en cruz al día 15.....	38
Figura 12. El efecto del estrés crónico de restricción en comparación con las condiciones de control, sobre el número de visitas al centro y bordes del campo abierto y el tiempo de permanencia en estas áreas, determinado dos días después de la finalización de los tratamientos.....	39
Figura 13. Efecto del estrés crónico de restricción en comparación con las condiciones controles sobre la actividad locomotora determinada por los parámetros distancia total recorrida y velocidad caminada en el campo abierto dos días después de finalizados los tratamientos	40
Figura 14. El efecto del estrés crónico de restricción en comparación con las condiciones controles.....	41
Figura 15. Efecto del estrés crónico de restricción, con respecto al tratamiento control, sobre la densidad de espinas dendríticas y el porcentaje de los tipos de espinas dendrítica en los segmentos terminales de las dendritas más distales de las neuronas piramidales del CeA	

determinada un día después de finalizado los tratamientos correspondientes y las pruebas de comportamiento	43
Figura 16. Efecto del estrés crónico de restricción en relación con el tratamiento control sobre los parámetros medidos la prueba de laberinto elevado en cruz.....	45
Figura 17. Efecto del estrés crónico de restricción en relación con el tratamiento control sobre el índice de ansiedad medidos la prueba de laberinto elevado en cruz después de un periodo de recuperación de 14 días libres de estrés	46
Figura 18. Efecto del período de recuperación de 14 días sin estrés en animales sometidos a estrés crónico de restricción o en condiciones control sobre la frecuencia de visitas al centro del campo, frecuencia de visitas a los bordes y los tiempos de permanencia en estas áreas del campo abierto.....	47
Figura 19. Efecto del estrés crónico de restricción en comparación con las condiciones controles sobre la actividad locomotora determinada por los parámetros distancia total recorrida y velocidad caminada en el campo abierto posterior a un período de recuperación sin estrés de 14 días después de los tratamientos con CTRL y CRS.....	48
Figura 20. El efecto del estrés crónico de restricción en comparación con las condiciones control sobre la densidad de espinas dendríticas y el porcentaje de tipos de espinas dendrítica en los segmentos terminales de las dendritas terminales de las neuronas piramidales del CeA, determinada en los animales que se les permitió un período de recuperación 14 días sin estrés después de los tratamientos CRS y CTRL.....	49
Figura 21. Gráficos de comparación de la ganancia de peso corporal y el peso relativo del timo, las glándulas adrenales derechas e izquierda después de 14 días de tratamiento correspondiente en grupos de animales que recibieron previamente una inyección de PBS o ibotenate.....	50
Figura 22. Efecto del estrés crónico de restricción en relación con el tratamiento control sobre los parámetros medidos la prueba de laberinto elevado en cruz.....	51
Figura 23. Efecto del estrés crónico de restricción en relación con el tratamiento control sobre el índice de ansiedad medidos por la prueba de laberinto elevado en cruz un día después de finalizados los tratamientos correspondientes.....	52
Figura 24. Secreción de corticosterona en ausencia y presencia de estrés agudo por restricción de movimiento en ratas previamente sometidas a condiciones control y estrés crónico.....	53

Índice de Tablas

Tabla 1: Trastornos de la ansiedad según el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales.....	17
--	----

Listado de abreviaturas, siglas y acrónimos

Abreviaturas	Descripción
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AVP	Arginina-Vasopresina
BL	Subnúcleo Basolateral
BLA	Complejo basolateral de la amígdala
BNST	Núcleo del lecho de la estría terminal
CA	Campo abierto
CeA	Núcleo central de la amígdala
CeL	Sector lateral
CeM	Sector medial
CIS	Estrés crónico de Inmovilización
CORT	Corticosterona
CPFm	Corteza prefrontal medial
CRF	Factor liberador de corticotropina
CRF-BP	Proteína de unión a CRF
CRS	Estrés crónico de restricción
GCs	Glucocorticoides
GRs	Receptores de los glucocorticoides
HPA	Hipotálamo-pituitaria-adrenal
HSP90	Proteínas de choque térmico
ICMs	Masas celulares intercaladas
IL	Interleucinas
LA	Subnúcleo Lateral
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LEC	Laberinto elevado en cruz
MC	Mineralocorticoides
MC2	Melanocortina 2
MeA	Amígdala Medial

MR	Receptores de los mineralocorticoides
MRAP	Proteína transmembranal accesoria
NPV	Núcleo paraventricular
PAG	Sustancia gris periacueductual
PKA	Cinasa A
POMC	Proopiomelanocortina
RMO	Restricción de movimiento
SE	Sistema endocrino
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
STAR	Proteína regulada esteroideogénica aguda
UPEAL	Unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio

Resumen

Estudios previos han demostrado que la exposición al estrés es un factor desencadenante de la conducta de ansiedad en roedores; esto se ha relacionado con cambios morfológicos en estructuras del sistema límbico. Hasta ahora los efectos ansiogénicos del estrés crónico no se han correlacionado con la remodelación dendrítica en el núcleo central de la amígdala (CeA). Se sabe que el CeA regula positivamente el eje Hipotalámico-Pituitaria-Adrenal (HPA) y existen indicios de que este núcleo podría formar parte de un mecanismo alternativo de producción de glucocorticoides bajo la condición de estrés crónico. En la presente investigación, analizamos el efecto del estrés crónico por restricción de movimiento (CRS; 20 min/día durante 14 días) sobre la conducta de ansiedad en el laberinto elevado en cruz (LEC) y la prueba de campo abierto (CA), así como la morfología dendrítica, la densidad de espinas dendríticas y el tipo de espinas en las neuronas piramidales del CeA. Se exploró la reversión de los efectos inducidos por el CRS en animales que se les permitió una recuperación sin estrés de 14 días después de terminado los tratamientos correspondientes. Además, se evaluó, el efecto de la lesión del CeA en el desarrollo de la conducta de ansiedad y la secreción de corticosterona (CORT) en respuesta al estrés agudo en ratas con historial de estrés crónico. La exposición a CRS disminuyó la frecuencia y el tiempo en los brazos abiertos en el LEC, aumentó el índice de ansiedad, y redujo las visitas y el tiempo en el centro del CA. Los ensayos morfológicos neuronales en estos animales no revelaron ningún efecto de CRS sobre la morfología dendrítica en las neuronas del CeA; sin embargo, se detectó una disminución en la densidad de las espinas dendríticas junto con cantidades disminuidas y aumentadas de las espinas de tipo hongo y delgadas, respectivamente. Posterior al período de recuperación sin estrés, las ratas expuestas a CRS siguieron mostrando un mayor índice de ansiedad en el LEC en comparación con el grupo CTRL. Se observó una disminución de la densidad de las espinas dendríticas totales, en paralelo con un mayor y menor número de espinas delgadas y gruesas, respectivamente, en las neuronas piramidales del CeA. Estos resultados sugieren que los cambios menores observados en las espinas de las neuronas piramidales pudieran estar implicados en el desarrollo de la conducta de ansiedad inducido por la exposición a CRS. La lesión del CeA no produjo cambios significativos en los niveles de CORT entre grupos experimentales, ni previno el desarrollo de la conducta de ansiedad en el LEC.

Abstract

Previous studies have shown that chronic stress exposure induces anxiety-like behavior in rodents, which has been associated with morphological changes in the limbic system. The anxiogenic effects of chronic stress have not been analyzed in terms of the potential dendritic remodeling in the central nucleus of the amygdala (CeA). The CeA is known to positively regulate the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis and there are indications that this structure could be part of an alternative mechanism of glucocorticoid production under chronic stress conditions. We analyzed the effect of chronic restraint stress (CRS; 20 min/day for 14 days) on anxiety-like behavior in the elevated plus maze (EPM) and the open field tests (OF), as well as dendritic morphology, dendritic spine density and spine type numbers in pyramidal neurons of the CeA. Reversal of potential CRS-induced effects was explored subsequent to a 14-day stress-free recovery period after completion of treatments. The effect of CeA lesions on the development of anxiety-like behavior and acute restraint-induced corticosterone secretion (CORT) in animals with a history of chronic stress was also analyzed. CRS exposure decreased the frequency and time in the open arms and increased the anxiety index in the EPM, and reduced visits and time in the center of the OF. Morphological assays in these animals revealed no effect of CRS on dendritic complexity in CeA neurons; however, a decrease in dendritic spine density together with decreased and increased amounts of mushroom and thin spines, respectively, was detected. After a stress-free recovery, CRS-exposed animals remained anxious, relative to CTRL rats, as reflected by a higher anxiety index in the EPM; OF parameters did not change significantly. A decreased density of total dendritic spines, in parallel with higher and lower numbers of thin and stubby spines, respectively, was observed in CeA pyramidal neurons. Results suggest that the changes observed in the spines of pyramidal neurons might be involved in the development of anxiety-like behavior induced by CRS exposure. CeA lesions had no effect on CRS-induced anxiety-like behavior and CORT levels between experimental groups.

1. Introducción

La respuesta al estrés involucra la participación del Sistema Nervioso Central (SNC), del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y del Sistema Endocrino (SE). El eje Hipotalámico-Pituitaria-Adrenal (HPA) es el principal regulador de la respuesta neuroendocrina al estrés, que inicia con la secreción del factor liberador de corticotropina (CRF) y Arginina-Vasopresina (AVP) en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo (Kalogeris et al., 1996). El CRF estimula la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la glándula pituitaria anterior, y ésta al llegar a la corteza de las glándulas adrenales a través de la circulación sanguínea activa la síntesis y secreción de los glucocorticoides (GCs) (cortisol en la mayoría de los mamíferos incluido los humanos y la corticosterona [CORT] en roedores) (Herman et al., 1996). Los GCs actúan a múltiples niveles para redirigir los recursos energéticos del organismo y poder responder de manera adecuada a la amenaza que se está detectando.

La regulación del eje HPA es necesaria y vital para la supervivencia del organismo. En este sentido, se ha documentado que estructuras del sistema límbico como el hipocampo, corteza prefrontal medial (CPFm) y la amígdala son capaces de regular la actividad del eje HPA (Herman et al., 2003). Estas estructuras centrales contienen una densidad variable de moléculas receptoras para los GCs que al activarse regulan la actividad del eje HPA como parte de un mecanismo de regulación de los GCs. La estimulación de estos receptores en el hipocampo y CPFm inhiben el eje HPA (mecanismo de retroalimentación negativa de los GCs), mientras que la activación de los receptores para los GCs en la amígdala estimula este eje. Además, se sabe que los GCs median en estas estructuras cambios en la morfología neuronal que engloban la sinaptogénesis, muerte neuronal, remodelación dendrítica y espinogénesis entre otros.

Existe evidencia de que la estimulación crónica del eje HPA lo puede desregular y se liberan concentraciones exacerbadas de GCs por mecanismos aparentemente independientes de la ACTH (García-Iglesias et al., 2013; Keeney et al., 2006) aunado al desarrollo de un grupo de enfermedades afectivas como la ansiedad y la depresión. Esto sugiere que bajo ciertas condiciones como el estrés crónico pudiera activarse un circuito alternativo de producción de GCs, por

una vía independiente del eje HPA, donde el NPV, al parecer, presenta una menor participación en la respuesta neuroendocrina al estrés.

Una estructura central que ha sido poco estudiada y que podría formar parte de este circuito alternativo de secreción de GCs es la amígdala, en específico el núcleo central de la amígdala (CeA). Se conoce que el CeA participa en la regulación del eje HPA en la respuesta al estrés y por tanto estimula la secreción de los GCs. Se ha demostrado que la estimulación eléctrica de la amígdala produce incrementos en los niveles plasmáticos de ACTH y CORT, así como el desarrollo de los comportamientos que se asemejan al miedo y la ansiedad (Dunn and Whitener, 1986; Weidenfeld et al., 1997). Se ha reportado, que la sobreexpresión del CRF en el CeA mimetiza las alteraciones conductuales y endocrinas que se observan en el estrés crónico (Flandreau et al., 2012).

En contraparte, la inhibición de la expresión del CRF mediante el empleo de un ARN de interferencia en el CeA revierte el incremento en las concentraciones plasmáticas de CORT que se observa como resultados a la exposición a estrés agudo en ratas previamente expuestas a otro estresor heterotípico (Callahan et al., 2013). Teniendo en cuenta lo antes mencionado, el presente trabajo se enfocó en identificar los posibles cambios en la morfología de las neuronas del CeA, densidad y tipos de espinas dendríticas, y su posible relación con el desarrollo de una conducta similar a la ansiedad, así como su posible participación en la secreción exacerbada de CORT inducida por estrés agudo en ratas con historial de estrés crónico.

2. Estrés

Evolución de la definición de estrés

La palabra estrés se utilizó en la antigüedad para describir el sufrimiento y las adversidades que padecían las personas. El fisiólogo Walter Cannon fue el primero en utilizar este concepto en medicina como " *la respuesta ante una amenaza al equilibrio interno u homeostasis* " (Cannon, 1932). En adición, Cannon planteó que a niveles superiores a lo que él llamó *estrés crítico* los esfuerzos correctivos del organismo para mantener la homeostasis interna podrían fallar y como consecuencia sufrir efectos negativos para el mismo

(Cannon, 1935). Años más tarde, el médico fisiólogo Hans Selye introdujo y popularizó en el ámbito científico un nuevo concepto de estrés. Selye describió al estrés como un estado del organismo en el que cualquier exigencia produce un síndrome inespecífico, que conlleva a un grupo de cambios biológicos (agrandamiento de las glándulas adrenales, úlceras gastrointestinales, involución de los ganglios linfáticos y el timo) para hacerle frente a la emergencia (Selye, 1956).

La principal limitación de la definición de estrés de Selye fue que solo se basó en las respuestas fisiológicas, y no contempló los factores psicológicos que pueden desencadenar los diferentes estresores. En la actualidad se han planteado muchas definiciones del estrés; sin embargo, la conceptualización más aceptada es la que integra un conjunto de procesos y respuestas neuroendocrinas, inmunológicas, emocionales y conductuales ante situaciones reales o supuestas que significan una demanda de adaptación mayor a lo habitual para el organismo, y/o son percibidas por el individuo como amenaza o peligro, ya sea para su integridad biológica o psicológica (McEwen, 2000; Trucco, 2002).

Síndrome General de adaptación

Selye describió la respuesta al estrés en 3 fases y lo llamó el síndrome general de adaptación como se observa en la Figura 1.

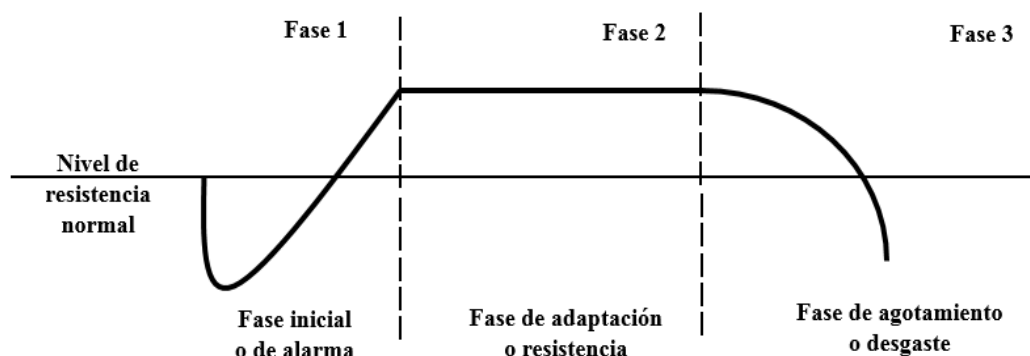


Figura 1. Síndrome de adaptación general descrito por Hans Selye

La Fase inicial o de alarma inicia cuando se detecta la presencia de un peligro o estresor y se responde con una reacción de alarma. Esta fase se caracteriza por la activación del Sistema Nervioso Simpático y de las glándulas adrenales (corteza y médula adrenal) para lograr la liberación de adrenalina y GCs que producen un grupo de cambios, entre los que se incluyen el aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, la movilización y el aumento de las defensas del organismo, la redistribución de la sangre a los órganos más importantes y el aumento de glucosa en los músculos. Si el organismo no logra superar la situación de estrés evoluciona hacia la segunda fase.

En la Fase de adaptación o resistencia el organismo intenta superar, adaptarse o afrontar la presencia de los factores que percibe como amenaza. Se utilizan los recursos energéticos disponibles y los órganos innecesarios para sobrevivir disminuyen su función con el objetivo de mantener la homeostasis interna. No obstante, si la percepción del agente estresor persiste en el tiempo, se comienzan a agotar las reservas energéticas de adaptación, y se llega a la última fase.

La fase de agotamiento o desgaste ocurre cuando el estrés se prolonga en el tiempo y los recursos propios del individuo no son suficientes o hay un desgaste energético muy grande para conseguir la adaptación. El organismo puede llegar a desarrollar múltiples enfermedades e incluso la muerte (Selye, 1946).

3. Respuesta al estrés

La respuesta al estrés es un proceso adaptativo que tiene como objetivo garantizar la supervivencia de los seres vivos. Se genera de forma inmediata o anticipada ante un estresor que es mediado por el SNC y su control sobre el SNA, el SE y el inmunológico. Consta de una respuesta rápida por parte del SNA simpático que activa en las glándulas adrenales la síntesis y liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo y de una respuesta más lenta mediante la activación del eje HPA y la secreción de GCs.

Respuesta del Sistema Nervioso Autónomo y su regulación ante el estrés

La función del SNA es mantener la homeostasis del organismo y efectuar las respuestas adaptativas ante cambios del medio externo e interno. La respuesta al estrés del SNA está regulada principalmente por el hipotálamo, específicamente por las neuronas de los núcleos lateral y medial (Gómez-González and Escobar, 2002). Estos núcleos integran la información sensorial y visceral, y a través del haz longitudinal dorsal de Schütz que se interconecta con neuronas motoras parasimpáticas preganglionares a nivel del tallo cerebral y con neuronas de la formación reticular del bulbo. Por medio de estas se produce la activación de las neuronas preganglionares simpáticas ubicadas en la asta intermediolateral de los segmentos torácico 1 a lumbar 2 de la médula espinal y la liberación concomitante de noradrenalina por las neuronas posganglionares simpáticas. La activación simpática estimula en las células cromafines de la médula de las glándulas adrenales, la síntesis y liberación al torrente sanguíneo de adrenalina (García-Iglesias et al., 2013). Las catecolaminas por su parte permiten la movilización de energía, aumento de la frecuencia cardíaca y presión arterial, desviación de la sangre a los órganos esenciales entre otras. Otras hormonas, neurotransmisores centrales y periféricos como la prolactina, el glucagón, la AVP, la somatostatina, endorfinas, encefalinas entre muchas otras también participan en la respuesta al estrés (Gómez-González and Escobar, 2002).

Respuesta del eje Hipotalámico- Pituitaria- Adrenal ante el estrés

La respuesta neuroendocrina al estrés es regulada principalmente por el eje HPA, fundamentalmente por el NPV como estructura integradora de la información recibida de otras estructuras centrales (Figura 2). En el NPV las neuronas activan la secreción de CRF y AVP un importante potenciador de la actividad del CRF (Kalogeris et al., 1996). El CRF a través del sistema porta hipofisiario atraviesa la eminencia media y llega al lóbulo anterior de la glándula pituitaria, donde activa los receptores CRF-1, que inducen la síntesis de la ACTH a partir de la proopiomelanocortina (POMC). Los receptores CRF-1 son de siete dominios transmembranales y están acoplados a Gs, cuyo segundo mensajero es el AMPc.

La ACTH es liberada a la circulación sanguínea y activa la síntesis de los GCs y de los mineralocorticoides (MC). La ACTH se une a los receptores de melanocortina 2 (MC2) en la corteza de las glándulas adrenales, específicamente en la zona fasciculada y en menor medida en la zona reticular. Estos receptores pertenecen a la familia de los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a la proteína Gs (Margioris and Tsatsanis, 2000). Es importante destacar que para que la ACTH pueda activar los receptores MC2 es necesario la presencia de la proteína transmembranal accesoria (MRAP).

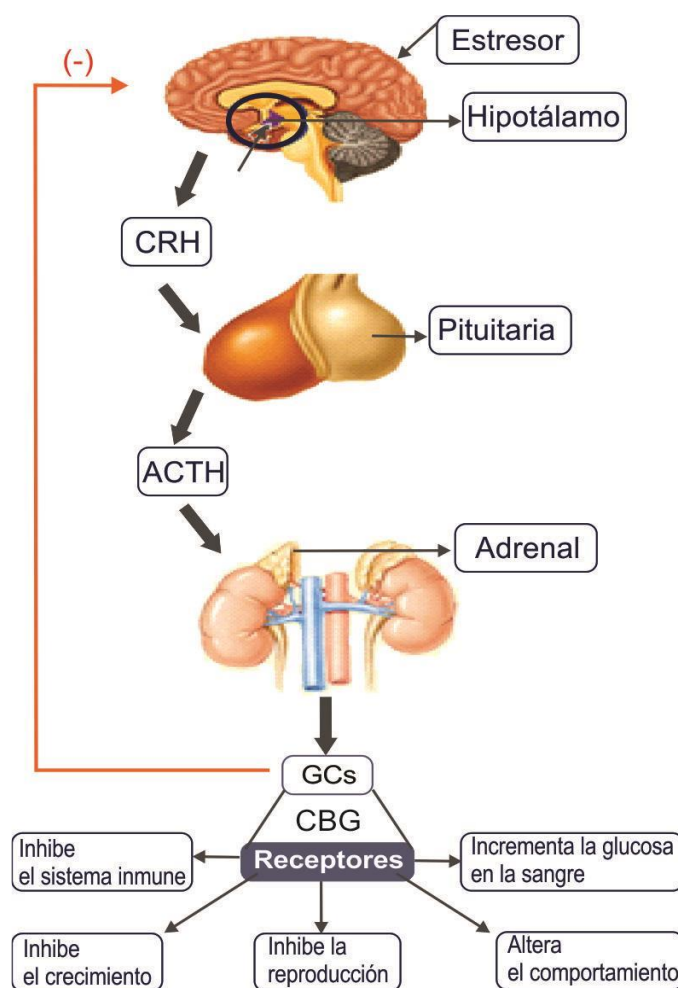


Figura 2. Vía de activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) en respuesta a un estresor y retroalimentación negativa que ejercen los glucocorticoides (GCs) en el hipotálamo (Chávez et al., 2016).

La activación de estos receptores inicia una cascada de señalización esteroideogénica vía la activación de la adenilato ciclasa, posterior aumento de AMPc y por último la activación de cinasa A (PKA), de conjunto con un aumento en el número de receptores de lipoproteína de baja densidad (LDL). La PKA por su parte estimula la enzima colesterol-éster-hidrolasa y activa la síntesis de la proteína regulada esteroideogénica aguda (STAR). La colesterol-éster-hidrolasa hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos y, la STAR transporta el colesterol libre al interior de la mitocondria donde se corta su cadena lateral y se convierte en pregnenolona el primer precursor de los GC (Margioris and Tsatsanis, 2000).

4. Mecanismos de acción de los glucocorticoides

Los GCs ejercen múltiples funciones metabólicas para mantener en estado de alerta al organismo y poder responder eficientemente al estrés que se está detectando. Estas hormonas por su estructura liposoluble son capaces de atravesar la bicapa lipídica de la membrana celular y unirse a los receptores citoplasmáticos de glucocorticoides (GRs) y mineralocorticoides (MRs) ampliamente distribuidos en el organismo. Los GCs tienen mayor afinidad con los receptores de los MRs que con los GRs (De Kloet et al., 1998). Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro; los MRs se localizan fundamentalmente en el septum lateral, amígdala y el hipocampo, mientras que los GRs se distribuyen ampliamente en el hipocampo y el NPV. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores nucleares tipo I que inducen o reprimen la transcripción de genes (Romero et al., 2018). Su activación provoca la disociación de dos subunidades de proteínas de choque térmico (HSP90) que funcionan como chaperonas, permitiendo la translocación al núcleo del complejo receptor - esteroide, así como la unión a secuencias reguladoras del DNA. Se ha reportado que los GCs poseen acción antiinflamatoria mediante la inhibición de la transcripción genética de los genes que codifican proteínas proinflamatorias como las citocinas e interleucinas (IL) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 y 13, el factor de necrosis tumoral alfa, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos entre otras (Cosío et al., 2005). En adición, se ha planteado que los GCs tienen efecto sobre la respuesta inmunitaria humoral, la reducción de

las células dendríticas y de la regulación de la permeabilidad de células endoteliales. (Cosío et al., 2005).

5. Retroalimentación negativa

Las concentraciones circulantes de los GCs liberados durante el estrés se mantienen dentro de límites normales a través del sistema de retroalimentación negativa que ocurre a diversos niveles del cerebro. En el hipotálamo el aumento de GCs genera tempranamente disminución en la frecuencia de disparos del NPV. El efecto estimulador de la CRF sobre la secreción de ACTH en el hipotálamo se ve inhibido por la acción de los GCs. Estos al parecer ejercen su efecto inhibitorio a través de acciones rápidas a nivel de la membrana celular y lenta a nivel de la transcripción génica. Además, la respuesta genómica produce reducción en los niveles de ARNm que codifican la ACTH (Keller-Wood and Dallman, 1984).

Adicionalmente, se ha observado la existencia de mecanismos reguladores extra hipotalámicos sobre el funcionamiento del NPV que involucra estructuras como la corteza prefrontal y el hipocampo, las que poseen cantidades elevadas de receptores para los GCs y MCs. La corteza prefrontal y el hipocampo regulan negativamente el NPV de manera tardía a través de los GRs vía glutamatérgica (Hibberd et al., 2000; Ziegler, 2002). Otras estructuras como los núcleos hipotalámicos lateral, anterior, periventricular, dorsomedial y ventromedial también tienen un efecto inhibitorio sobre el NPV mediante la liberación de la sustancia P en el núcleo parvocelular. La sustancia P inhibe la secreción de CRF mientras estimula la de AVP. El fin de este mecanismo es mantener estables los niveles basales de ACTH y GCs en condiciones normales, y posterior a la exposición al estrés. La exposición crónica a altos niveles de GCs produce una disminución de los receptores de los glucocorticoides en el hipocampo, que afecta el papel de esta estructura en la retroalimentación negativa de los GCs (Gregus et al., 2005).

6. Estrés agudo o adaptativo

La exposición a un estrés agudo conlleva a la liberación de monoaminas, principalmente noradrenalina y GCs, que ejercen su función genómica a corto plazo con el objetivo de que el sujeto responda de manera eficaz frente a un evento estresante (McEwen, 1998; Pacák and Palkovits, 2001). Se conoce que el estrés agudo potencia la respuesta inmune, mediante el aumento en la producción de anticuerpos dependiente de los linfocitos T (Silberman et al., 2003). Además, se ha observado que los GCs liberados en el estrés agudo facilitan los mecanismos neurales que median el almacenamiento de la información (Roozendaal, 2003). Es decir, el evento estresante comienza a formar parte de la memoria del individuo modificando la morfología neuronal. Por otra parte, en fases iniciales del estrés se promueve la excitabilidad hipocampal y se amplifica el efecto del eje HPA, debido a la activación de los MRs de membrana. Sin embargo, la activación de los GRs en esta estructura median el efecto de retroalimentación sobre el eje HPA (Hibberd et al., 2000).

7. Estrés crónico

La activación repetida del eje HPA en su fase de agotamiento produce hipersecreción de GC (Duval et al., 2010); los altos niveles de GCs pueden llegar a tener efectos en la morfología dendrítica, neurogénesis y respuesta funcional de la actividad del cerebro después del estrés. Estos cambios ocurren fundamentalmente por la exposición crónica a los GCs, con impacto directo en estructuras como el hipotálamo, CPFm y amígdala (Joëls et al., 2007; Vyas et al., 2002). Estas alteraciones pueden provocar la sobreestimulación del NPV que genera un aumento en la función del eje HPA, y por tanto niveles de GCs. Asimismo, disminuye el mecanismo de retroalimentación negativa del eje HPA, por lo cual se observa una hipersecreción de GCs, ya que estructuras como el hipocampo y la CPFm, que inhiben la actividad del eje HPA, se encuentran con su función reguladora disminuida (Duval et al., 2010). Por otro lado, es importante destacar que el estrés crónico suprime la actividad del sistema inmunológico (Dhabhar et al., 1996).

8. Ritmo circadiano del eje Hipotalámico – Pituitaria – Adrenal

En condiciones normales el funcionamiento del eje HPA es regulado por el ciclo circadiano de los esteroides. Tanto el CRF como la ACTH en condiciones normales (no respuesta al estrés) son secretados según su ciclo circadiano en la capa externa de la eminencia media, con picos máximos de liberación durante la hora de la mañana (Chrousos, 1998). En el día, se observan dos picos: uno en horas de la mañana y otro en la tarde; este ritmo depende de circuitos neuronales sensibles a cambios en la luz, que incluyen aferencias desde el núcleo supraquiasmático del NPV. Este núcleo se encarga de procesar la información proveniente del núcleo supraquiasmático, que genera señales excitatorias o inhibitorias a la corteza adrenal y en la glándula pituitaria. Con ello se controla la variación diurna de la secreción de GCs, por medio de neuronas simpáticas preganglionares. Cabe recalcar que en condiciones fisiológicas el núcleo supraquiasmático promueve la activación del NPV, pero en situaciones de estrés actúa como inhibidor (Hibberd et al., 2000).

Antecedentes específicos

9. Estructuras límbicas que participan en la respuesta al estrés

Participación de las estructuras límbicas en la respuesta al estrés

El sistema límbico abarca un grupo de estructuras complejas que controlan las emociones, la conducta, la memoria y el aprendizaje, entre las que se pueden encontrar el tálamo, la corteza prefrontal, la formación hipocampal, el complejo amigdalino, el complejo nuclear septal y el núcleo del lecho de la estría terminal (Nikolenko et al., 2020; Willis and Haines, 2018). Numerosas investigaciones han demostrado que durante el estrés varias de estas estructuras corticales y subcorticales modulan la actividad del eje HPA (Jankord and Herman, 2008) las cuales llevan a cabo los procesos de evaluación cognitivos, emocionales y activan o inhiben los mecanismos efectores de la respuesta al estrés. La corteza prefrontal, el hipocampo y el septum lateral tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad del eje HPA y forman parte de los mecanismos de retroalimentación negativa de los GCs, mientras que la amígdala, específicamente los núcleos cortical, medial y central activan la función del eje HPA, al liberar CRF en el NPV.

Cambios morfológicos en las estructuras del sistema límbico

Se ha estudiado que los altos niveles de GCs circulantes en el estrés crónico afectan a estructuras como la CPFm, la amígdala, el hipocampo, entre otras. Estas estructuras presentan una densidad variable de receptores esteroidales suprarrenales como el tipo I (MRs) y el tipo II (GRs), los cuales a través de su activación median los mecanismos que dan lugar a la plasticidad neuronal (McEwen, 1999). Existen reportes de que la exposición a estrés crónico afecta a las neuronas piramidales de la CPFm, las cuales sufren una reducción del número y longitud de la rama dendrítica acompañada de un déficit en cognición. Este patrón de reorganización dendrítica en esta estructura es similar al observado luego de la administración crónica de CORT (Cook and Wellman, 2004). A nivel de las dendritas apicales también se ha observado una disminución de las espinas dendríticas producto a la exposición al estrés crónico por derrota social (Colyn et al., 2019).

En el hipocampo los altos niveles de GCs provocan atrofia dendrítica de las neuronas de la región CA3, disminución de la neurogénesis en el giro dentado, una menor expresión de receptores inhibitorios dependientes de serotonina en la región como CA1 e incluso muerte celular (de Kloet et al., 2008; Gregus et al., 2005; Joëls et al., 2007). De igual forma, la exposición a estrés crónico ha demostrado disminuir el número de células neuronales y atrofia en las dendritas apicales en neuronas de la región CA3 del Hipocampo. Sin embargo, algo interesante es que se ha observado que el CRS produce un aumento significativo de la densidad de espinas dendríticas en las dendritas apicales y basales de las neuronas de la región CA3 (Sunanda et al., 1995). El efecto del estrés crónico en el complejo basolateral (BLA) parece ser completamente opuesto. Se conoce que la exposición a estrés crónico de inmovilización (CIS) provoca hipertrofia y una mayor arborización dendrítica en las neuronas piramidales y estelares del complejo basolateral de la amígdala (Vyas et al., 2003, 2002). Además, el CIS produce un aumento en la densidad de espinas dendríticas en las dendritas primarias y secundarias de las neuronas espinosas del BLA (Mitra et al., 2005). Adicionalmente, se ha demostrado que este mismo protocolo de CIS no afecta a las neuronas del CeA mientras que aumenta la arborización dendrítica en el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) (Vyas et al., 2003).

10. Complejo amigdalino

La amígdala fue descrita por primera vez en 1826 por el fisiólogo alemán Karl Burdach, quien la denominó amígdala teniendo en cuenta el parecido del BLA con la forma de una almendra (Nikolenko et al., 2020). La amígdala es una estructura compleja del sistema límbico que está conformada por un grupo de núcleos heterogéneos interconectados entre sí y con otras estructuras del sistema límbico. Se encuentra localizada en la porción medial del lóbulo temporal y está involucrada en el procesamiento emocional y el comportamiento (Benarroch, 2015). Se plantea que el complejo amigdalino recibe información de estructuras sensoriales, las interpreta y asigna un valor e influye en la respuesta conductual por lo que se les atribuye tres funciones fundamentales: expresión de emociones (ira, miedo y agresión), procesamiento de la memoria y gestión de la estimulación (Nikolenko et al., 2020).

Organización anatómica de la amígdala

El complejo amigdalino, tomando como taxonomía la organización citoarquitectónica y conectividad se divide en tres regiones principales: el complejo Basolateral, que incluye los subnúcleos lateral (LA), basolateral (BL) y basomedial; el CeA, comúnmente dividido en sectores lateral (CeL) y medial (CeM) y; las masas celulares intercaladas (ICMs) (Duvarci and Pare, 2014). El CeA junto al BNST y la sustancia innominada sublenticular forman la llamada amígdala extendida y se localiza en la parte dorsomedial de la amígdala (Benarroch, 2015).

Conexiones de la amígdala y el flujo de información

El flujo de información en la amígdala es complejo y unidireccional. Las estructuras corticales y el tálamo contienen proyecciones hacia el complejo basolateral específicamente al núcleo LA, que constituye la vía principal de entrada de información al complejo amigdalino. Las señales aferentes que provienen de la corteza, el tálamo y del sistema vegetativo ascienden desde el tronco encefálico y el hipotálamo hasta la amígdala (Nikolenko et al., 2020). Esta a su vez se proyecta al CeA, que provee la principal vía de salida de la amígdala

a estructuras como el hipotálamo y núcleos del tronco encefálico. En su camino a la subdivisión medial del CeA, los axones glutamatérgicos de las neuronas del BA realizan conexiones con las neuronas GABAérgicas localizadas en la masa celular intercalada y la subdivisión lateral del CeA que mandan proyecciones inhibitorias al CeA. Por lo tanto, las neuronas principales del BLA influyen las neuronas del CeA a través de excitación glutamatérgica directa y vía inhibición GABAérgica bi-sináptica. También hay circuitos intrínsecos GABAérgicos inhibitorios que regulan la actividad dentro de la amígdala (LA, BL, ICMs, CeL y CeM), que añaden complejidad al procesamiento de información intrínseca dentro de los circuitos de la amígdala. La activación de la amígdala permite el procesamiento y análisis emocional de cualquier estresor, el incremento en las respuestas fisiológicas y conductuales relacionadas con el estrés, además que contribuye a que el organismo elija la respuesta más apropiada al estresor (Gómez-González and Escobar, 2002).

Las conexiones extrínsecas o de salida de la amígdala son diversas siendo el eje central en varios aspectos de la emoción y la cognición. El CeA proporciona el mayor número de proyecciones de la amígdala con los núcleos del tronco encefálico. De hecho, mediante la técnica de marcaje retrógrado en gatos se ha establecido que existen conexiones entre el hipotálamo posterior y la sustancia gris periacueductal (PAG) con el CeA (Hopkins and Holstege, 1978). Existe evidencia que las proyecciones amigdalotegmental que se originan en el CeA podrían ser una vía directa de activación de las estructuras del tronco encefálico a través de conexiones monosinápticas (Hopkins and Holstege, 1978). En este sentido se ha descrito que la estimulación eléctrica del CeA y la parte magnocelular del núcleo BA de la amígdala provoca las respuestas de alerta, huida, ataque, respuesta defensiva o miedo mediado por las conexiones amigdalofugal ventral hacia el tronco encefálico (Hilton and Zbrozyna, 1963).

Núcleo Central de la Amígdala

El CeA está organizado anatómicamente y funcionalmente para operar como un centro integrador de información multisensorial que traduce los estímulos sensoriales emocionalmente relevantes en respuestas conductuales y fisiológicas (Gilpin et al., 2015). Esto se logra a través de vías eferentes masivas

que el CeA envía a un grupo de estructuras descendentes involucradas en las respuestas autónomas y conductuales al miedo y el estrés (Hopkins and Holstege, 1978; Pape and Pare, 2010). En el CeA podemos encontrar varios tipos neuronales como neuronas espinosas medianas (poseen varias dendritas primarias no espinosas que se ramifican a dendritas secundarias y terciarias espinosas; sus axones comienzan a ramificarse casi saliendo del soma), neuronas con gran soma y dendritas gruesas y pequeñas neuronas piramidales (Nikolenko et al., 2020). Se plantea que es el sitio extrahipotalámico con mayor cantidad de células productoras de CRF (Shepard et al., 2000)

11. Desregulación del Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal

Existen evidencias en la literatura que sugieren que la estimulación crónica del eje HPA conlleva a su desregulación y a la secreción exacerbada de GCs mediante mecanismos aparentemente independientes de la ACTH. Por ejemplo, tras la exposición continua y de larga duración a estímulos estresantes (entre 8 y 48 horas) se han observado niveles elevados de GCs, mientras que las concentraciones de ACTH se mantienen cercanas a los niveles basales (Hauger et al., 1988; Rivier and Vale, 1987). Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha reportado que la exposición a CRS induce una desregulación endocrina que involucra una secreción exacerbada de CORT y el abatimiento de la secreción de ACTH en respuesta al estrés agudo (García-Iglesias et al., 2013).

El mecanismo que subyace en este fenómeno involucra el desarrollo de un sistema serotoninérgico ectópico en la corteza adrenal (García-Iglesias et al., 2013; Terrón, 2014) similar al reportado en tumores adrenocorticales hiperproductores de cortisol en humanos (Bram et al., 2016; Le Mestre et al., 2019; Louiset et al., 2008, 2006). No obstante, hasta la fecha se desconocen los mecanismos involucrados en el control de esta vía de secreción de GCs a nivel del sistema nervioso central. Dicha disociación también se ha observado en desórdenes relacionados con el estrés como la depresión mayor; ello refuerza la hipótesis de que en ciertas enfermedades y bajo la condición de estrés crónico se activa una vía alterna de secreción de GCs independiente de la secreción de ACTH.

12. Desórdenes relacionados con el estrés

Varios estudios han señalado que la actividad basal inadecuada o una respuesta repetida al estrés ya sea en magnitud o duración pueden asociarse con varias enfermedades llamadas desórdenes relacionados con el estrés. Estos desórdenes pueden afectar tanto el crecimiento como el desarrollo corporal; además, se han relacionado en la fisiopatología de los trastornos conductuales (ansiedad y depresión), trastornos cardiovasculares (hipertensión arterial), trastornos endocrinos (diabetes mellitus), obesidad (alteraciones del peso corporal), problemas de memoria y adicción a las drogas, entre otros (Chrousos, 2009). Estos desórdenes se han asociado principalmente con la hipersecreción de GCs. Aunque la desregulación de los circuitos del CRF se ha visto implicada en la fisiopatología de los trastornos del estado de ánimo como la ansiedad y la depresión. Se ha reportado que la sobreexpresión del CRF en el CeA mimetiza las alteraciones conductuales que se observan en el estrés crónico.

Implicación del núcleo central de la amígdala en los desórdenes de ansiedad

La ansiedad es una respuesta anticipada a una situación de riesgo futura, indefinible e imprevista, por lo que forma parte de los procesos adaptativos que son necesarios para la supervivencia del organismo (Ildefonso, 2017). Se caracteriza por una sensación de incomodidad y aprensión ante una señal no condicionada (Ventura-Silva et al., 2013). Cuando no existe una relación proporcional entre el o los estímulos ansiogénicos y la respuesta ansiosa ya sea en cuanto a la intensidad, duración o frecuencia, o respuesta inadecuada ante un estímulo no amenazante hablamos de los llamados trastornos de ansiedad (Herlyn, 2015; Ildefonso, 2017). Los trastornos de ansiedad agrupan un número de alteraciones psicológicas y neurológicas que representan varias formas de miedo y ansiedad anormales o patológicas (Dueñas-Amaya, 2019) como se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1: Trastornos de la ansiedad según el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales

Trastorno	Características	Manifestaciones
Pánico	Aparición brusca de un miedo intenso.	Temblor, sudoración, miedo a morir, sensación de frío/calor, náuseas, sensación de asfixia, mareo, miedo a perder el control, dolor en el pecho.
Fobia	Temores angustiosos a determinadas circunstancias, reales o imaginarias.	Fobia específica (miedo a un objeto o situación determinada). Fobia social (miedo a colocarse en una situación vergonzosa en un medio social). Agorafobia (miedo que siente la persona de encontrarse en cualquier situación que pueda provocar un ataque de pánico o de la cual le sea difícil escapar, lo que le hace encerrarse en casa).
Ansiedad generalizada	Aparición progresiva y permanente de síntomas intensos de ansiedad, sin una causa real que los provoque.	Fatiga, inquietud, dificultad para dormir, irritabilidad, tensión muscular.
Obsesivo-compulsivo	Obsesiones, que pueden ser ideas o pensamientos que se repiten, y no desaparecen de la mente del individuo, aunque lo intente por todos los medios.	Cada obsesión lleva asociada una compulsión o conducta que compensa la angustia que provoca.
Estrés posttraumático	Aparece en aquellos individuos que se han visto expuestos a un evento traumático que involucra un daño físico o psicológico extremo.	Pérdida del sueño, irritabilidad, sobresalto, falta de concentración.

Fuente: Disponible en: <https://www.mheducation.es/bcv/guide/capitulo/8448176391.pdf>

Existen reportes de que el estrés crónico puede conducir a estados patológicos entre los cuales se pueden encontrar los desórdenes relacionados con el estado de ánimo como la ansiedad y los trastornos depresivos (Shekhar et al., 2005; Ventura-Silva et al., 2013). Se sabe que el eje HPA, el sistema límbico y la corteza prefrontal están involucrados en los mecanismos neurofisiológicos del miedo y la ansiedad (Dueñas-Amaya, 2019). En particular el CeA es un componente esencial del circuito neuronal que controla el aprendizaje del miedo y la ansiedad. Un gran número de evidencias ha relacionado el aumento de la activación de la amígdala con algunos trastornos de ansiedad como con el estrés posttraumático (Semple et al., 2000), la fobia específica (Straube et al., 2006) y el pánico (van den Heuvel et al., 2005). Existen

reportes que demuestran que las inyecciones de CRF en los ventrículos cerebrales produce una respuesta similar a la ansiedad medida por diferentes pruebas conductuales como la prueba de interacción social, el sobresalto acústico y el LEC (Shekhar et al., 2005).

Estudios realizados en ratones transgénicos hiperproductores del CRF en el CeA muestran comportamientos similares a la ansiedad durante su vida. Este comportamiento se revierte mediante la administración del antagonista del CRF alfa-helicoidal CRF 9-41 en los ventrículos cerebrales laterales (Stenzel-Poore et al., 1994). A pesar de que la evidencia señala que la amígdala juega un papel esencial en el desarrollo de la conducta similar a la ansiedad, resulta interesante que las lesiones de la amígdala no siempre son efectivas para interrumpir todos los tipos de ansiedad o comportamiento emocional (Ventura-Silva et al., 2013).

13. Posible participación del núcleo central de la amígdala en la producción de glucocorticoides

En apoyo a la posible participación de un circuito alternativo de producción de GCs durante el estrés crónico, se ha descrito que la administración de dosis crecientes de CORT aumenta significativamente la expresión del ARNm del CRF en el CeA y lo disminuye en el NPV. Lo señalado sugiere una menor participación del NPV en la respuesta endocrina al estrés aunado a una mayor activación del CeA (Makino et al., 1994). Adicionalmente, Keeney y col. demostraron en un grupo de ratones expuestos a 12 sesiones de derrota social frente a ratones dominantes (modelo de estrés crónico por derrota social), la activación de un mecanismo o “switch” que provocaba la secreción de altos niveles de CORT en respuesta al estrés que representaba la presencia del animal dominante. Estos investigadores examinaron la expresión relativa del ARNm del CRF en el NPV en los ratones estresados de manera aguda y crónica; encontraron en los animales con estrés agudo diferencias significativas en la expresión de este mensajero respecto al grupo control; sin embargo, en los animales con estrés crónico estas diferencias no estaban presentes (Keeney et al., 2006). Esto indica que, en estas últimas condiciones experimentales, el NPV del hipotálamo dejó de jugar un papel importante en la secreción de CORT.

La activación de la amígdala se ha asociado con los desórdenes relacionados con el estrés. En este sentido, otro estudio vincula la hiperactividad de la amígdala con las alteraciones inducidas por el estrés en los comportamientos del estado de ánimo (Shekhar et al., 2005; Shin and Liberzon, 2010). En concordancia con esta idea, se ha demostrado, mediante técnicas de imagen, un incremento en la actividad de la amígdala en pacientes con depresión mayor en estado de remisión, lo que se correlacionó con una mayor secreción de cortisol (disfunción endocrina) en respuesta al estresor que significaba la realización de esta prueba en comparación con los pacientes sanos (Holsen et al., 2013). Sin embargo, uno de los indicios más relevantes sobre el posible papel del CeA vía el CRF en la secreción exacerbada de GCs fue el reportado por Callahan y col. Estos investigadores, al inhibir la producción de CRF en el CeA mediante la inyección de un ARN de interferencia, observaron que se revertía el incremento de la secreción de CORT inducida por estrés agudo en ratas previamente expuestas a otro estresor (Callahan et al., 2013).

Además, se ha demostrado que la estimulación de la amígdala produce incrementos en las concentraciones plasmáticas de CORT y ACTH, así como un patrón complejo de comportamiento y respuestas autónomas que se asemejan al miedo (Dunn and Whitener, 1986; Weidenfeld et al., 1997). De hecho, la desregulación de los circuitos del CRF en el estrés crónico se ha visto implicada en la fisiopatología de los trastornos del estado de ánimo como la ansiedad y la depresión. Existen reportes de que la sobreexpresión del CRF en el CeA mimetiza las alteraciones conductuales y endocrinas que se observan en el estrés crónico (Flandreau et al., 2012). Aunque se conoce que el CeA regula el eje HPA y existe evidencia que vincula este núcleo con la hipersecreción de CORT que se presenta debido a la sensibilización endocrina. Aún no se han establecido con exactitud los mecanismos mediante los cuales el CeA participa en el control de la ansiedad y la secreción de CORT inducida por estrés agudo en ratas con historial de estrés crónico. Además, se desconoce el efecto que tiene el estrés crónico sobre las anomalías morfológicas de las neuronas piramidales del CeA y sus espinas; así como su posible implicación en el desarrollo de una conducta similar a la ansiedad.

14. Planteamiento del problema de investigación

En la literatura se documentan los cambios morfológicos que ocurren en estructuras reguladoras del eje HPA, entre las que se incluyen el hipocampo, la corteza prefrontal y el núcleo basolateral de la amígdala, debido a la exposición al estrés crónico. En este sentido, se ha reportado que el CIS o restricción de movimiento induce atrofia dendrítica en las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo (McEwen, 1999; Vyas et al., 2004; Watanabe et al., 1992) y en la CPFm (Liston et al., 2006). Estos mismos paradigmas de estrés aumentan la arborización dendrítica y la densidad de espinas en la columna de las neuronas piramidales del BLA aunado al desarrollo de una conducta similar a la ansiedad en roedores (Qin et al., 2011; Vyas et al., 2004, 2002). De acuerdo con estas observaciones, el estrés crónico de inmovilización aumenta la complejidad dendrítica de las neuronas que conforman el BNST de la amígdala extendida. Curiosamente, el paradigma de estrés crónico utilizado en este estudio no mostró ningún efecto sobre las neuronas piramidales del CeA (Vyas et al., 2003).

Se conoce que el CRS disminuye la densidad de espinas dendríticas en la amígdala Medial (MeA) en contraste con un aumento en la espinogénesis del BLA en ratones (Bennur et al., 2007) asociado al desarrollo de una conducta similar a la ansiedad. El hallazgo de estas alteraciones neuronales que derivan en la modificación de los patrones de conectividad sináptica en la amígdala jerarquiza la necesidad de estudiar la falta de efecto del estrés crónico sobre la neuroplasticidad sináptica del CeA. Además, se ha reportado que el desarrollo del miedo y la ansiedad pueden ser consecuencia de la exposición a eventos estresantes, mediados por alteraciones en la morfología neuronal y la conectividad sináptica de regiones cerebrales sensibles al estrés, como el hipocampo, la CPFm y la amígdala (Gorman and Docherty, 2010; Leuner et al., 2003). Es importante destacar que hasta la fecha no están bien descritos los mecanismos que subyacen en el desarrollo de estas entidades afectivas.

Por otro lado, se conoce que bajo ciertas condiciones como el estrés agudo prolongado y crónico, el eje HPA se puede desregular y se secretan concentraciones exacerbadas de GCs mediante mecanismos aparentemente independientes de la ACTH. Por ejemplo, nuestro grupo de investigación ha

reportado que la exposición a CRS en ratas (20 min/día, durante 14 días) da lugar a una desregulación endocrina que involucra la secreción exacerbada de CORT y el abatimiento de la secreción de ACTH cuando se activa el eje HPA en respuesta al estrés agudo (García-Iglesias et al., 2013). El mecanismo que subyace detrás de este fenómeno involucra el desarrollo de un sistema serotoninérgico ectópico en la corteza adrenal (García-Iglesias et al., 2013; Saroj et al., 2019; Shanker et al., 2020; Terrón, 2014) similar al reportado en tumores adrenocorticales hiperproductores de cortisol en humanos (Louiset et al., 2008, 2006). No obstante, a la fecha se desconocen los mecanismos involucrados en el control de esta vía de secreción de GCs a nivel del SNC.

15. Hipótesis

La exposición al estrés crónico afecta la densidad y morfología de las espinas dendríticas en las neuronas piramidales del CeA de las ratas macho wistar. El CeA forma parte del mecanismo central que regula la respuesta de ansiedad y la secreción exacerbada de GCs en ratas con historial de estrés crónico.

16. Objetivo General

Identificar la posible participación del CeA en el control de la ansiedad y la secreción de CORT inducida por estrés agudo en ratas con historial de estrés crónico.

17. Objetivos específicos

1. Identificar el efecto de la exposición a estrés crónico por RMO sobre la conducta de ansiedad.
2. Describir los cambios en la morfología neuronal, la densidad de espinas dendríticas y los tipos de espinas en las neuronas piramidales del CeA debido a la exposición a CRS.
3. Evaluar el efecto de la lesión del CeA sobre la conducta de ansiedad y la secreción de CORT inducida por estrés agudo en animales con historial de estrés crónico.

18. Metodología

18.1 Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, con un peso corporal comprendido entre 220-250 gramos, que fueron proveídas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). Los animales se alojaron en grupos de tres por jaula como máximo y se mantuvieron bajo condiciones controladas (temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa 50-55% en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas (luces encendidas 06:00-18:00 h) con alimentos y agua proporcionados ad libitum. Todos los procedimientos y protocolos experimentales cumplieron con la normativa federal para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) y se llevaron a cabo teniendo en cuenta los lineamientos de la guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Publicación NIH No. 8023, revisada 1978). Es importante destacar que el protocolo experimental fue revisado y aprobado por los miembros del Comité de Ética del CINVESTAV-IPN (Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio; CICUAL). Se hicieron esfuerzos para minimizar el número y sufrimiento innecesario de los animales.

18.2 Protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento

Se empleó un paradigma de CRS, que consistió en sesiones diarias de restricción de movimiento de 20 min (entre las 8:00 y las 11:00 am) durante 14 días consecutivos. Esto se realizó colocando a los animales en tubos cilíndricos de plexiglás (6,5 cm de diámetro interno y 20 cm de largo) de longitud ajustable bien ventilados. Los animales del grupo control (CTRL) no recibieron ningún tratamiento por lo que se dejaron tranquilos en sus cajas de origen durante 14 días. Estudios realizados por el grupo de trabajo han demostrado que este paradigma de estrés crónico induce desregulación endocrina en ratas, que consiste en una respuesta exacerbada de CORT por mecanismos aparentemente independientes de las concentraciones plasmáticas de ACTH en respuesta a la restricción aguda de movimiento (García-Iglesias et al., 2013; Shanker et al., 2020).

18.3. Determinación de los parámetros somatométricos

Las variables fisiológicas que se modifican como resultado de la exposición al estrés crónico son el peso corporal, el peso relativo de la glándula suprarrenal y del timo, entre otras (Coburn-Litvak et al., 2003; García-Iglesias et al., 2013; Kaplowitz et al., 2016; Shanker et al., 2020). Estudios realizados en este laboratorio han demostrado que la exposición al protocolo de CRS, descrito en el apartado 3.2, induce una disminución significativa en la ganancia de peso corporal, concomitante con el agrandamiento de las glándulas suprarrenales y la involución del timo en comparación con los animales que permanecen en las condiciones de CTRL (García-Iglesias et al., 2013; Shanker et al., 2020). En esta investigación el peso corporal se registró según los periodos establecidos en el diseño experimental descrito en el apartado 3.4 para los tratamientos CTRL y CRS (Figura 2). La Ganancia de peso corporal se calculó restando el peso corporal final (una vez terminado el tratamiento o después del periodo de recuperación) al peso corporal registrado el primer día de tratamiento. Posterior a los tratamientos correspondientes o periodo de recuperación, los animales fueron sacrificados, se extrajeron y pesaron las glándulas suprarrenales derechas e izquierdas por separado y el timo. Para excluir posibles diferencias en el peso de las glándulas suprarrenales y del timo derivadas de cambios normales en el peso corporal, particularmente en los animales que reciben el tratamiento de CRS, los datos de los pesos de los órganos se expresaron como peso relativo (en miligramos por cada 100 g de peso corporal final).

18.4. Pruebas conductuales

Las pruebas de conducta se realizaron en un cuarto adaptado para estos fines en la UPEAL de nuestra institución. Este cuarto se encontraba aislado de sonido con una iluminación de 50 lux de tonalidad naranja.

18.4.1. Prueba de laberinto elevado en cruz

La prueba del LEC es una de las herramientas más utilizadas en la medición de la conducta similar a la ansiedad. Este dispositivo consta con dos brazos abiertos y dos brazos cerrados (es decir, protegidos por paredes laterales altas de color negro) opuestos entre ellos (Pellow et al., 1985), con dimensiones

de 50 cm de largo y 10 cm de ancho conectados entre sí por un cuadrado central de 10 x 10 cm (Figura 3). El laberinto se encontraba elevado a una altura de 50 cm sobre el piso. El registro de la conducta no condicionada de los animales (n=12 por grupo) se realizó en el horario de la mañana (entre las 8:00 - 11:00 am). Para iniciar las sesiones se colocó individualmente cada rata en el cuadrado central del LEC frente a un brazo abierto y se registró la actividad exploratoria durante 5 minutos utilizando una cámara de video colocada 2 metros encima del LEC acoplada a una computadora personal. Se registró y analizó el número de entradas en brazos abiertos y cerrados y el tiempo de permanencia en cada uno mediante un sistema de seguimiento de vídeo (software Ethovision XT10, Noldus information Technology, Wageningen, Países Bajos). Además, se calculó el índice de ansiedad mediante la siguiente expresión: Índice de ansiedad = $1 - \left(\frac{[\text{Tiempo en los brazos abiertos} / \text{Duración de la prueba}] + [\text{Frecuencias de visitas a los brazos abiertos} / \text{Total de entrada en los brazos abiertos y cerrados}]}{2} \right)$ (Cohen et al., 2013; Contreras et al., 2014). Después de cada sesión, el LEC se limpió con una solución de etanol al 70%.



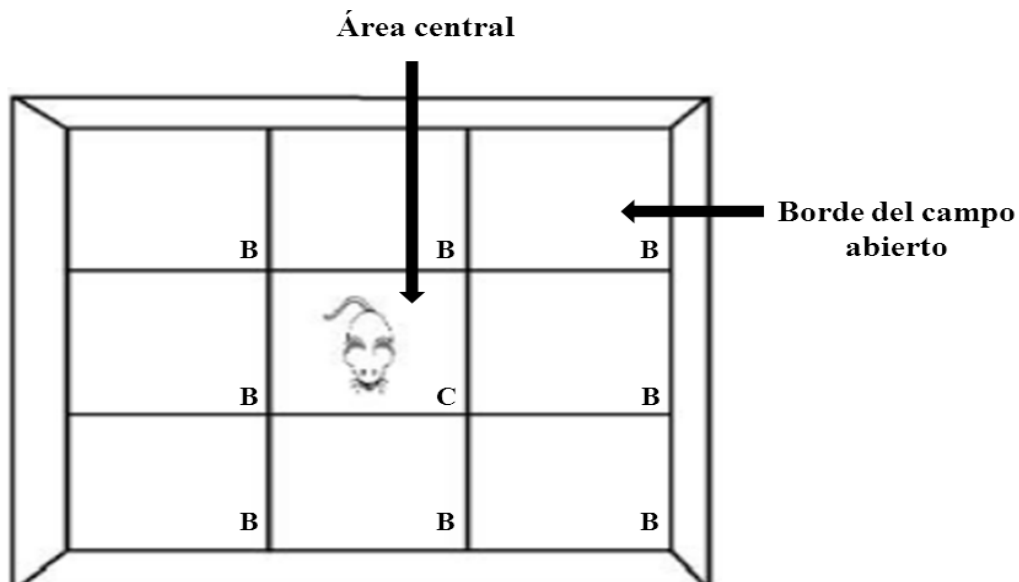
Figura 3. Fotografía representativa del laberinto elevado en cruz implementado

18.4.2. Prueba de campo abierto

Un día posterior a la realización de la prueba de LEC (días 16 y 30), cada rata (n=12 ratas por grupo) fue evaluada en un CA desconocido (entre las 8:00 am y las 11:00 am). El CA era una caja cuadrangular de acrílico negro de 101 cm de largo x 101 cm de ancho x 50 cm de alto con piso de plexiglás negro y sin

tapa. Las ratas se colocaron individualmente en el centro del CA y se les permitió la exploración libremente durante 30 min. Esta prueba evaluó la actividad exploratoria espontánea de los animales de cada grupo experimental. El registro del comportamiento de cada animal se realizó utilizando una cámara de vídeo montada a 2 m directamente sobre el CA. Después de cada sesión el CA se limpió con una solución de etanol al 70% entre cada prueba.

Los parámetros de comportamiento se analizan y cuantifican con el software Ethovision XT10 (Noldus Information Technology, Wageningen, Países Bajos). En el presente estudio, a través del software Ethovision XT10, se estableció una arena de 2x2 que dividía el CA en una zona central y ocho zonas fronterizas o bordes (Figura 4). Se midió el número total de veces que la rata estuvo en cada área (definida cuando el punto central de detección en la rata estuvo en cada zona), el tiempo de permanencia total en cada zona, así como la distancia y la velocidad caminada como medida general de los niveles de actividad de cada animal durante un período de análisis de 30 minutos. La prueba de CA es comúnmente utilizada para evaluar la actividad exploratoria espontánea (actividad locomotora), así como el comportamiento similar a la ansiedad en ratas en un ambiente desconocido.



Leyenda: B - Bordes del campo abierto
C – Área central del campo abierto

Figura 4. Esquema representativo del campo abierto implementado

18.5. Técnica de Golgi-Cox

Un día después de terminadas las pruebas conductuales como se observa en la figura 2, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.), y se procedió a la perfusión intracardiaca con solución fisiológica por el ventrículo izquierdo con el fin de remover los eritrocitos de los vasos sanguíneos cerebrales. Posteriormente, se extrajeron los cerebros de los animales correspondientes a los grupos CTRL y CRS una vez terminado estos tratamientos ($n_1 = 10$, $n_2 = 9$ por grupo y periodo de tiempo) para llevar a cabo la tinción de Golgi-Cox. Los cerebros fueron almacenados en la oscuridad en una solución de Golgi-Cox ($K_2Cr_2O_7$ 170 mM, $HgCl_2$ 200 mM, K_2CrO_4 200 mM) durante 21 días. Terminado este periodo de tiempo los órganos fueron colocados en una solución de sacarosa al 30% durante 5 días de acuerdo con los protocolos previamente descritos (Flores et al., 2005; Gibb and Kolb, 1998; Pinzón-Parra et al., 2019).

Luego, se cortó el tejido en secciones coronales de 200 μ m de espesor utilizando un vibratomo (Campden Instruments LTD, Loughborough, Inglaterra), que fueron colocados en portaobjetos recubiertos de gelatina para su revelado a través del siguiente procedimiento:

Los cortes se sumergieron en las siguientes soluciones y periodos de tiempo:

- 1- 30 min en hidróxido de amonio al 10% (en oscuridad).
- 2- 10 min de lavados con H_2O destilada (en oscuridad).
- 3- 30 min en fijador rápido de Kodak (1:3, en oscuridad).
- 4- 10 min de lavados en H_2O destilada.
- 5- Deshidratación con concentraciones crecientes de alcohol: etanol al 50 % (1 min), al 75% (1 min), al 90% (1 min), absoluto (5 min).
- 6- Aclaramiento del tejido en 15 min en xileno
- 7- Por último, se les colocó un cubreobjeto con resina sintética

18.6. Criterios de evaluación y análisis morfológico neuronal del núcleo central de la amígdala

Para determinar si el paradigma de CRS en relación con el grupo CTRL inducía remodelación dendrítica en las neuronas piramidales del CeA se realizaron los análisis morfométricos. Para ello, con ayuda del Atlas de Cerebro de Ratas de Paxinos y Watson (1988) se seleccionaron las neuronas del CeA siguiendo los criterios establecidos: 1) presencia de neuronas con dendritas no truncadas; 2) impregnación consistente y oscura a lo largo de toda la extensión de las neuronas; y 3) aislamiento relativo de las neuronas impregnadas vecinas para evitar interferencias con el análisis. Se incluyeron las neuronas de las subdivisiones medial y lateral del CeA (bregma, -2,12 a -2,80 mm) (Vyas et al., 2003). Para el análisis de las ramificaciones y longitud dendrítica, todas las neuronas seleccionadas debían verse completas, con el árbol dendrítico basal plenamente apreciado para su reproducción en un plano bidimensional (Kolb et al., 1998). Esto se hizo para evitar la evaluación de neuronas que podrían tener demasiadas ramas acortadas (Adamec et al., 2012). Para cada sujeto (n=5 cerebros por grupo de tratamiento) se dibujaron diez neuronas por cerebro que cumplieran con los criterios antes mencionados para el análisis, usando un microscopio de investigación de campo claro (DM 2000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) que tiene acoplada una cámara lúcida que permitió la realización de los trazos de la neurona a un aumento de 400X.

Una vez trazadas las neuronas seleccionadas se realizó el análisis de Sholl (Sholl, 1953). Para ello, se colocó una plantilla transparente con círculos concéntricos, equivalentes a 10 μm de separación como se representa en la Figura 5. El centro del círculo se colocó sobre el soma de las neuronas y se utilizó el número de intersecciones de los círculos para estimar la longitud dendrítica total, arborización y la longitud dendrítica por número de orden de rama dendrítica (Kolb et al., 1998; Silva-Gómez et al., 2003).

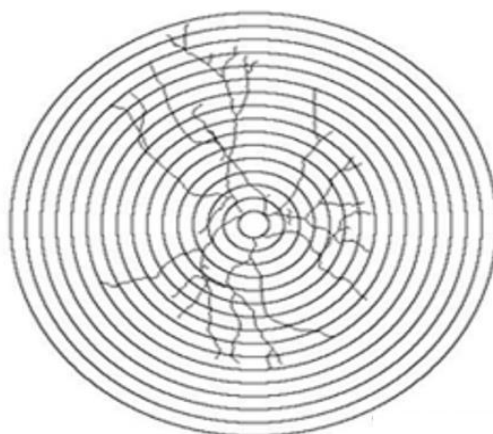


Figura 5. Esquema representativo del análisis de Sholl para estimar la longitud dendrítica total, arborización y longitud dendrítica por número de orden de rama dendrítica (Binley et al., 2014).

18.7. Análisis de la densidad dendrítica de las neuronas del núcleo central de la amígdala

Para calcular la densidad de espinas dendríticas, se obtuvieron trazos de la dendrita más distal de las mismas neuronas antes trazadas, con la cámara lúcida (microscopio Leica DM 2000, Alemania). Se trazaron 10 segmentos dendríticos seleccionados por animal de cada grupo experimental con un aumento de 1000X. Para ello, en un segmento terminal equivalente a 30 μm de longitud de la dendrita más distal se contó el número de espinas visibles a lo largo de este segmento. La aplicación de este criterio arrojó medidas homogéneas para estimar la densidad total de espinas dendríticas en el CeA. Los resultados se expresaron como el número promedio de espinas / 10 μm (Bello-Medina et al., 2016; Flores et al., 2005; Pinzón-Parra et al., 2019).

18.8. Tipificación de espinas dendríticas de las neuronas del núcleo central de la amígdala

La clasificación morfológica de las espinas dendríticas se realizó en los mismos segmentos empleados para la cuantificación de la densidad de espinas dendríticas. Para ello, se clasificaron cien espinas dendríticas consecutivas según sus características morfológicas (a 2000X) y se dividieron en cinco tipos: delgadas (la longitud de la espina es mayor que el diámetro del cuello y los

diámetros de la cabeza y el cuello son similares), hongo (el diámetro de la cabeza es mucho mayor que el diámetro del cuello), gruesas (el diámetro del cuello es similar a la longitud de la columna), bifurcada (espinas con dos cabezas) y ramificadas (espinas con más de dos cabezas) como se aprecia en la figura 6 (Bello-Medina et al., 2016; Harris et al., 1992). La cuantificación de las espinas dendríticas por tipo se expresó como porcentaje del número total de espinas según se determinó en los 10 segmentos dendríticos para cada animal.

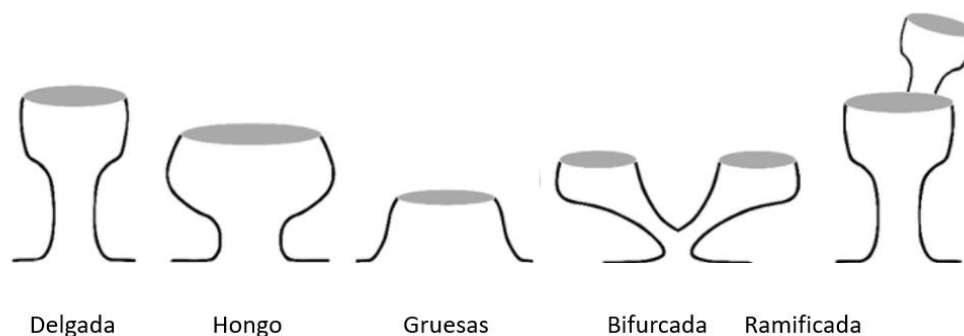


Figura 6. Esquema de la morfología de las espinas dendríticas objeto de estudio. Tomado y modificado de (Medina et al., 2018)

18.9. Lesión del núcleo central de la amígdala

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilazina (100 y 10 mg/kg, i.p., respectivamente). Cada animal fue montado en un dispositivo estereotáxico, se expuso el cráneo y con ayuda de un taladro micromotor, se realizó un orificio en las coordenadas específicas del CeA (anteroposterior -2.1 mm; mediolateral ± 4.2 mm; y dorsoventral -7.0 mm; utilizando el sistema de coordenadas del Atlas del Cerebro de Ratas de Paxinos y Watson (Ventura-Silva et al., 2013)). Luego se realizaron microinyecciones bilaterales de ácido iboténico en solución de PBS (pH 7.4) esterilizada o únicamente de PBS (vehículo). Las microinyecciones se realizaron con una jeringa Hamilton conectada a una cánula y montada en una bomba de microinfusión continua; la cánula se conectó a una aguja de pequeño calibre montada en el dispositivo estereotáxico para efectuar la microinyección. El ácido iboténico (10 mg/mL) fue inyectado a una razón de 0.05 $\mu\text{L}/\text{min}$ para un volumen total de 0.2 μL (2 μg). La temperatura corporal de los animales fue mantenida a 37°C mediante una manta homeotérmica acoplada a un sistema de servocontrol.

18.10. Extracción de sangre y medición de Corticosterona plasmática

Posterior a los tratamientos correspondientes, los animales fueron anestesiados con isoflurano y se les implantó una aguja en la arteria caudal para la extracción de 200 μ L de sangre a tiempo 0 sin estimulación del eje HPA y a tiempo 30 min de estrés agudo por restricción de movimiento. La sangre se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml que contenían 50 μ L de heparina (3 mg/1ml de solución de cloruro de sodio estéril). Los tubos se colocaron en hielo por el tiempo de duración del procedimiento y luego se procedió a su centrifugación por un periodo de 15 minutos a 12000 rpm y 4 $^{\circ}$ C. Se realizó la separación del plasma (sobrenadante) con una micropipeta de 100 μ L. El plasma fue almacenado y guardado a una temperatura de - 70 $^{\circ}$ C hasta que los niveles de CORT plasmáticos fueron determinados por el Kits de Elisa comercial de CORT (Corticosterone Elisa Kit, Cat. No. ADI-900-097). La concentración de detección mínima para cada ensayo fue 32 pg/mL, con una precisión intraensayo de <10 %.

18.11. Diseño experimental

Para medir el efecto de la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento sobre el desarrollo de la conducta similar a la ansiedad y los cambios en la morfología y espinas de las neuronas piramidales del CeA; un grupo de animales fue dividido en dos grupos para los tratamientos CTRL y CRS, respectivamente (n = 48 ratas por grupo). Estos grupos a su vez se subdividieron en dos subgrupos para determinar los efectos conductuales y morfológicos de los tratamientos en dos periodos diferentes, es decir, después de completados los tratamientos correspondientes (en los días 15-17; Figura 7, Panel A) y después de un período de 14 días de recuperación libre de estrés (los días 29-31; Figura 7, Panel B). Estos últimos experimentos se realizaron con la finalidad de explorar la posible reversibilidad de las alteraciones morfológicas y conductuales inducidas por el estrés crónico. Para evaluar el comportamiento similar a la ansiedad, se realizaron las pruebas de laberinto elevado en cruz (LEC) y de campo abierto (CA) en los mismos grupos de animales (en días consecutivos por separados) en los tiempos especificados con anterioridad. Los estudios morfológicos de las neuronas del CeA se realizaron en los mismos

grupos de animales sometidos a ambas pruebas conductuales (Figura 7). Así, un día después de completada la última prueba conductual, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg / kg, i.p.) y se perfundieron a través de la aorta ascendente con solución salina fisiológica al 0,9%.

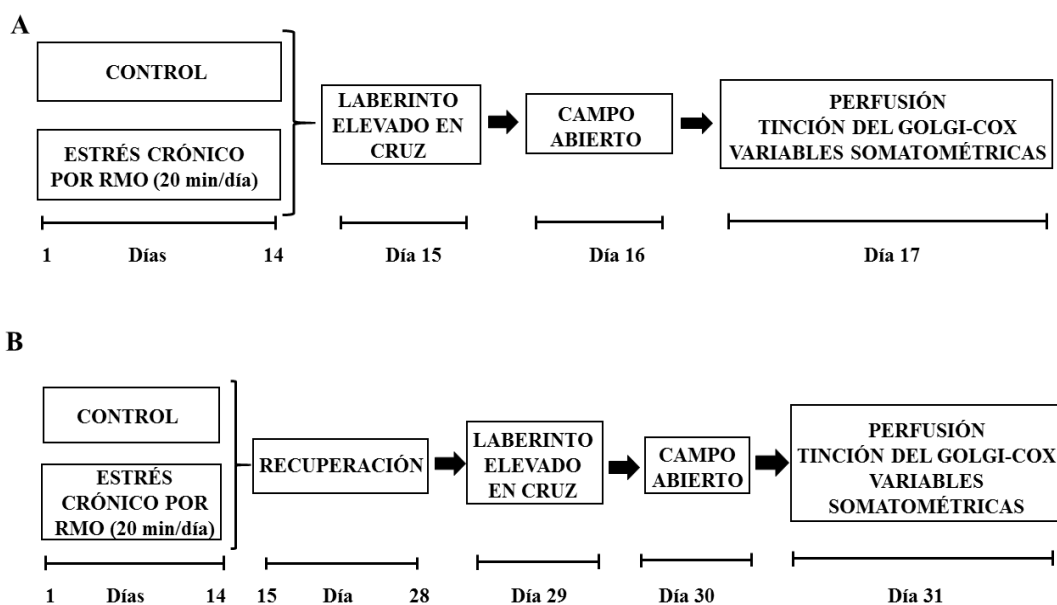


Figura 7. Diseño experimental utilizado en las pruebas conductuales y morfológicas. Efectos del estrés crónico de restricción (CRS) en comparación con las condiciones de control (CTRL) sobre la conducta de ansiedad medida en las pruebas de laberinto elevado en cruz (LEC) y de campo abierto (CA) en dos periodos de tiempo: Panel A) Una vez finalizado los tratamientos, y Panel B) después de un período de recuperación sin estrés de 14 días. En ambos casos, los animales fueron anestesiados y perfundidos 1 día después de la prueba de CA para la tinción de Golgi-Cox y el posterior análisis morfológico de las neuronas del CeA.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la lesión del CeA sobre la conducta de ansiedad y la secreción de CORT los animales (n=52) se dividieron en dos grupos a los cuales se les lesionó el CeA con ibotenato o se le administró vehículo. Luego de un tiempo de recuperación de 7 días, los animales se dividieron en cuatro grupos y se sometieron a estrés crónico por RMO o mantuvieron en condiciones controles: un grupo Control-Vehículo (CTRL-Veh, n=11 por grupo inyectados con PBS bilateralmente en el CeA); un grupo Control-Lesión (CTRL-Les, n=12 por grupo inyectados con ibotenato bilateralmente en el CeA); un grupo CRS-Vehículo (CRS-Veh, n=13 por grupo que recibieron una inyección de PBS bilateralmente en el CeA); un grupo CRS- Lesión (CRS-Les, n=13 por grupo inyectados con ibotenato bilateralmente el CeA). Al día 15, una

vez finalizados los tratamientos correspondientes, a estos animales se le realizó la prueba de LEC para determinar si el CeA mediaba el desarrollo de la conducta similar a la ansiedad.

Para el análisis del efecto de la lesión del CeA en la respuesta neuroendocrina al estrés, además de los grupos antes mencionados se contó con otro grupo de animales que se sometieron a condiciones CTRL (n=12) o CRS (n=12) pero que no tuvieron ninguna intervención quirúrgica. Una vez concluidos los tratamientos correspondientes, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano y se les implantó una aguja en la arteria caudal para la extracción de 200 µL de sangre. La sangre se obtuvo a tiempo 0 en ausencia de estrés agudo y a tiempo 30 bajo la exposición de estrés agudo por restricción de movimiento en todos los casos. A continuación, se centrifugó la sangre a 12000 rpm por 15 minutos y se obtuvo el plasma para medir los niveles de CORT mediante el kit comercial de Costicosterona (Corticosterone Elisa Kit, Cat. No. ADI-900-097)

18.12. Presentación de datos y evaluación estadística

Todos los datos, tablas y figuras se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos cinco determinaciones. Se utilizó la prueba t para datos no apareados para evaluar el efecto de los tratamientos (CTRL y CRS) y su posible reversibilidad de los tratamientos sobre las medidas morfométricas, variables somatométricas (ganancia de peso corporal, peso relativo de las glándulas adrenales y del timo), la estimación de los parámetros de comportamiento determinados tanto en el LEC (es decir, las entradas a los brazos abiertos, cerrados y el tiempo de permanencia en ellos), y la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales del CeA. Se empleó el ANOVA de dos vías para analizar el efecto de los tratamientos sobre el porcentaje y tipo de espinas dendríticas en el CeA y el efecto de la lesión del CeA sobre el desarrollo de una conducta similar a la ansiedad y la secreción de CORT; en caso de encontrar diferencias significativas (al menos un par de medias difiere), se realizó la prueba post-hoc de Student-Newman-Keuls. En todos los casos, el nivel de significación fue del 5% ($p < 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

19. Resultados

19.1. Efecto del estrés crónico por restricción de movimiento sobre las variables somatométricas

Entre las variables somatométricas descritas en la literatura que se ven modificadas en respuesta al estrés crónico se encuentran la ganancia de peso corporal, el peso relativo de las glándulas adrenales y del timo (Coburn-Litvak et al., 2003; García-Iglesias et al., 2013; Kaplowitz et al., 2016; Shanker et al., 2020).

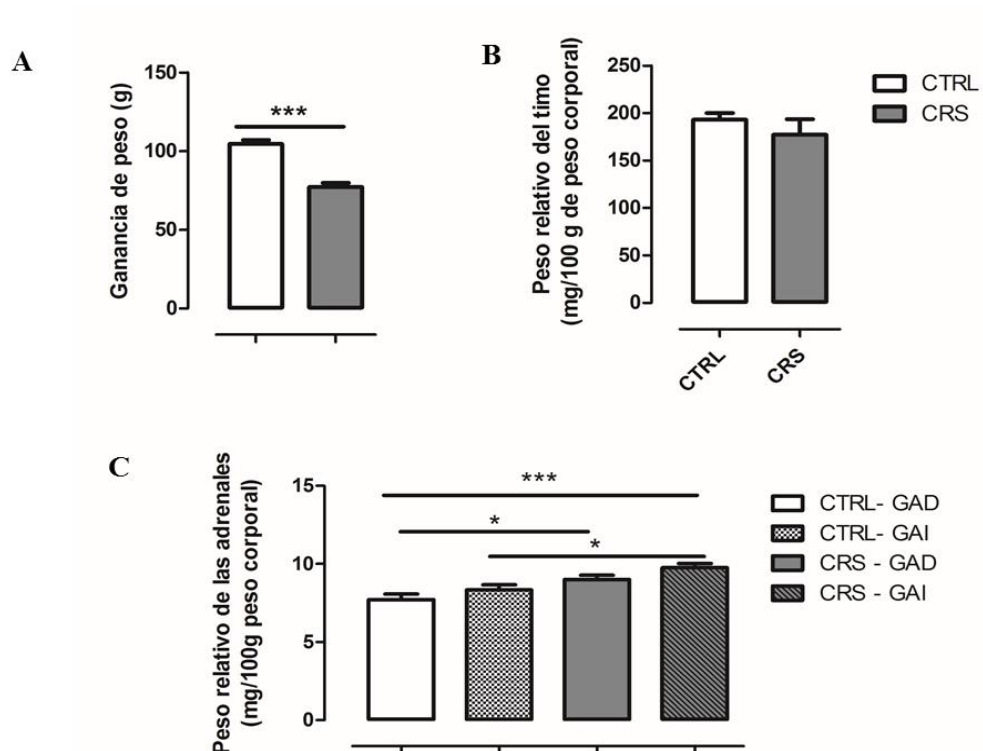


Figura 8. Gráficos de comparación de la ganancia de peso corporal (Panel A), peso relativo del timo (Panel B) y el peso relativo de las adrenales (Panel C) como indicador de la efectividad del protocolo de estrés crónico empleado una vez finalizados los tratamientos de estrés crónico de restricción (CRS) y condiciones control (CTRL). Los puntos representan la media de los valores y las líneas verticales representan el error estándar de la media. (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs Control).

Los pesos de los animales al inicio del experimento fueron similares (220-250 g); sin embargo, al concluir los tratamientos correspondientes (CTRL y CRS, respectivamente) el peso final de los animales sometidos a CRS disminuyó significativamente, lo cual se puede apreciar claramente en el indicador de

ganancia de peso ($t(14) = 7.087$, $p < 0.001$; Fig. 8, panel A). No se encontró diferencias significativas en el peso relativo del timo ($t(14) = 0.890$, $p = 0.389$; Fig. 8, panel B). El peso relativo de las glándulas adrenales izquierda de los animales estresados fue significativamente mayor que el peso relativo de las glándulas adrenales derecha ($t(14) = 4.527$, $p = <0.001$; Fig. 8, panel C) e izquierda ($t(14) = -3.368$, $p = 0.005$; Fig. 8, panel C) de los animales del grupo control. De igual forma se detectó un aumento significativo del peso relativo de las glándulas adrenales derechas de los animales del grupo CRS en comparación con las glándulas adrenales derechas de los animales del grupo CTRL ($t(14) = -2.854$, $p = 0.013$; Fig. 8, panel C).

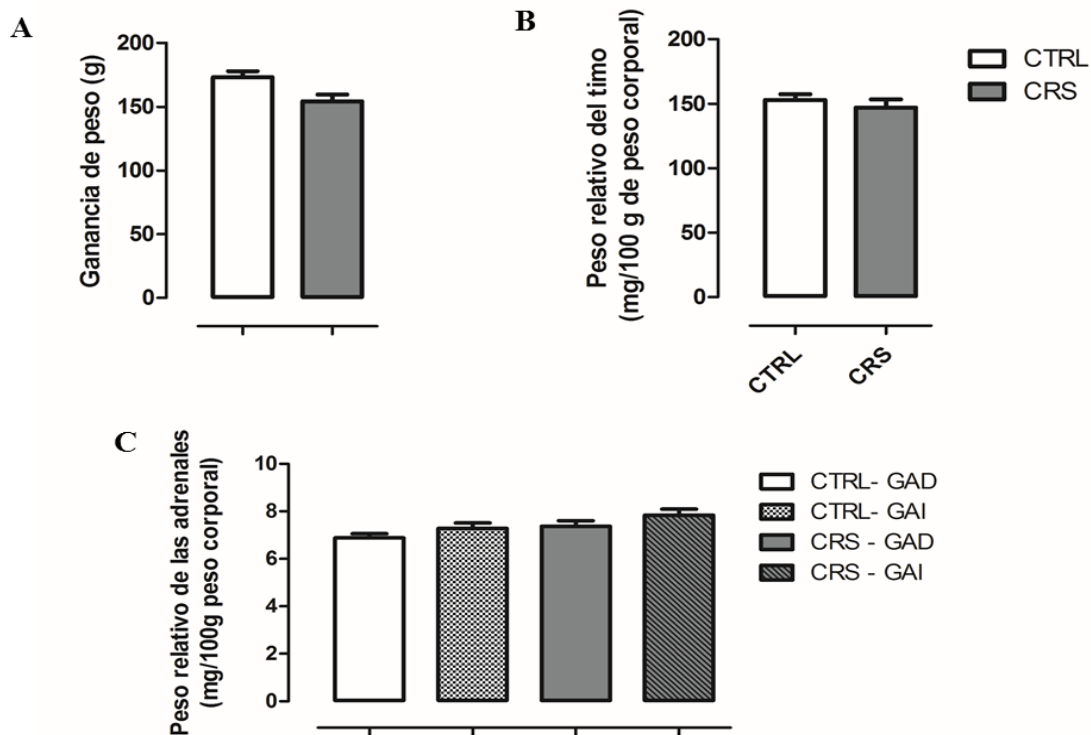


Figura 9. Gráficos de comparación de la ganancia de peso corporal (Panel A), peso relativo del timo (Panel B) y el peso relativo de las adrenales (Panel C) posterior a 14 días de recuperación una vez finalizados los tratamientos de estrés crónico de restricción (CRS) y control (CTRL). Los puntos representan la media de los valores y las líneas verticales el error estándar de la media.

En los animales pertenecientes a los grupos CRS y CTRL que tuvieron un periodo de recuperación al estrés no se detectaron diferencias significativas en el peso corporal final al día 31 ($t(22) = 0.979$, $p = 0.338$) y en la ganancia de peso corporal ($t(22) = 1.708$, $p = 0.102$; Fig. 9, panel A) entre los tratamientos.

En cuanto al peso relativo de las glándulas adrenales no se detectaron diferencias significativas tanto en el peso relativo de la adrenal izquierda ($t(22) = -1.109$, $p = 0.280$; Fig. 9, panel C) como en el peso relativo de la adrenal derecha ($t(22) = -1.147$, $p = 0.264$; Fig. 9, panel C). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el peso relativo del timo ($t(22) = 0.213$, $p = 0,833$; Fig. 9, panel B;) entre los tratamientos CTRL y CRS.

19.2. Efecto de la exposición a estrés crónico sobre la conducta de ansiedad

Prueba de laberinto elevado en cruz

En la prueba de LEC de acuerdo con lo reportado en la literatura sobre el desarrollo de un comportamiento similar a la ansiedad debido a la exposición a estrés crónico; en este modelo experimental se observó que los animales que fueron sometidos a CRS (un día después del tratamiento, día 15) presentaron un menor número de entradas a los brazos abiertos ($t(22) = 3.334$, $p = 0.003$), junto con un menor tiempo de permanencia en estos ($t(22) = 2.520$, $p = 0.019$) en relación con los animales del grupo CTRL (Fig.10 panel A y B respectivamente). Esta reducción en la exploración en los brazos abiertos no se debe a los cambios en la actividad locomotora, ya que no se detectó una diferencia significativa en el número de entradas en los brazos cerrados entre tratamientos ($t(22) = 0.385$, $p = 0.704$) (16.8 ± 2.2 y $15,8 \pm 1,4$ para animales CTRL y CRS, respectivamente) (Fig.10 panel C). En consonancia con un estado más ansioso, los animales expuestos a CRS, mostraron una diferencia significativa en el tiempo pasado en los brazos cerrados ($t(22) = -3,549$, $p = 0,002$), correspondiendo el período más largo a los animales expuestos al CRS ($112,4 \pm 9,6$ y $165,3 \pm 11,4$ segundos para animales CTRL y CRS, respectivamente) (Fig.10 panel D).

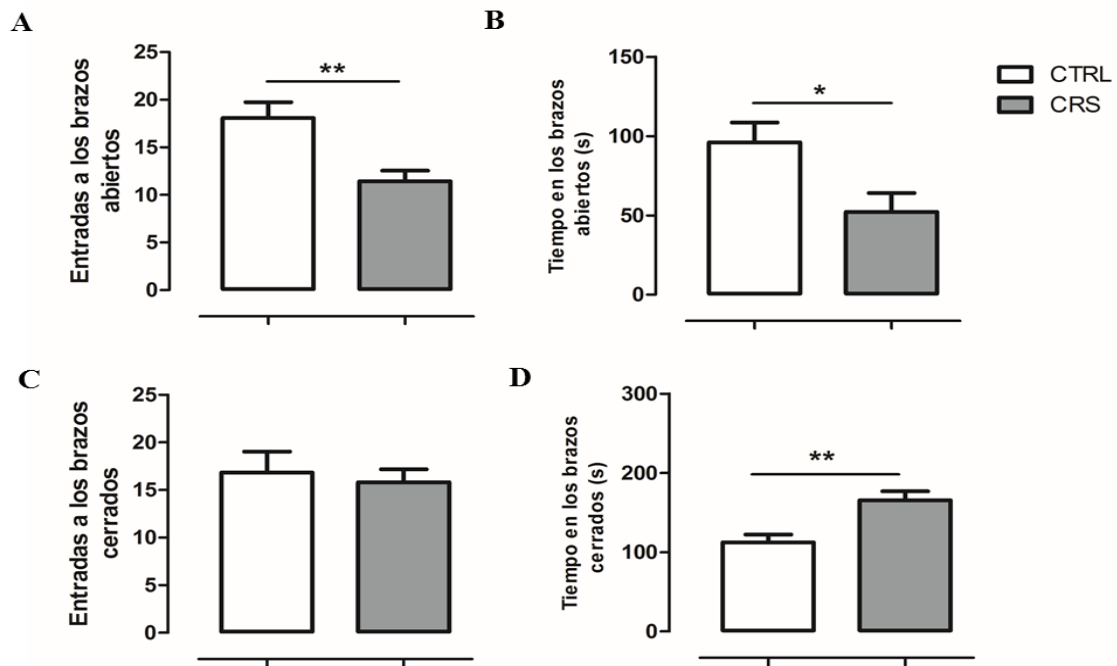


Figura 10. Efecto del estrés crónico de restricción (CRS) en relación con el tratamiento control (CTRL) sobre los parámetros medidos la prueba de laberinto elevado en cruz (LEC); número de entradas y el tiempo pasado en los brazos abiertos y cerrados del LEC determinado un día después de finalizados los tratamientos correspondientes (el día 15). La exposición a CRS produjo una reducción significativa tanto en las entradas a los brazos abiertos (A) como en el tiempo de permanencia en ellos (B). Además, en los animales expuestos a CRS se detectó un aumento significativo en el tiempo pasado en los brazos cerrados (D). Las barras representan la media y las líneas verticales indican el error estándar de la media. * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$ vs CTRL

El desarrollo de una conducta similar a la ansiedad se puede apreciar en el indicador del índice de ansiedad donde al día 15 se observa un incremento significativo de este índice en los animales expuestos a CRS en comparación con los animales del grupo CTRL ($t(22) = -2.694$, $p = 0.013$; Fig. 11).

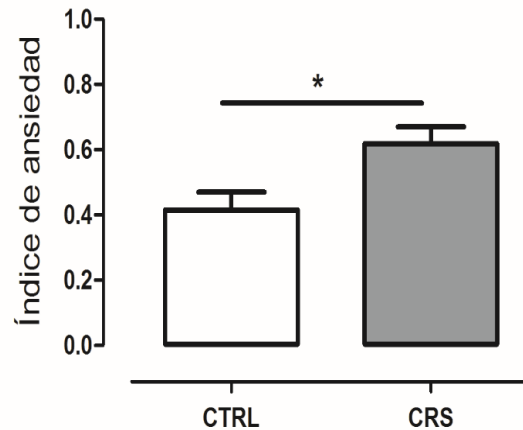


Figura 11. Efecto del estrés crónico de restricción (CRS) en relación con el tratamiento control (CTRL) sobre el índice de ansiedad medidos la prueba de laberinto elevado en cruz (LEC) al día 15. Los animales expuestos a CRS presentan un índice de ansiedad significativamente mayor respecto al grupo CTRL. * $p < 0.05$ vs CTRL

Prueba de campo abierto

Como se puede apreciar en la Figura 12, los animales expuestos a CRS tuvieron una menor frecuencia de visitas al centro del CA con respecto de los animales control ($t(22) = 2.664$, $p = 0.014$, panel A) siendo también menor el tiempo de permanencia en el centro de este ($t(22) = 3.329$, $p = 0.003$, panel B). Se observó una disminución significativa de las visitas en los bordes del CA de los animales pertenecientes al grupo control en relación con los animales que fueron expuestos a CRS ($t(22) = -2.499$, $p = 0.020$, panel C). No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de permanencia en los bordes.

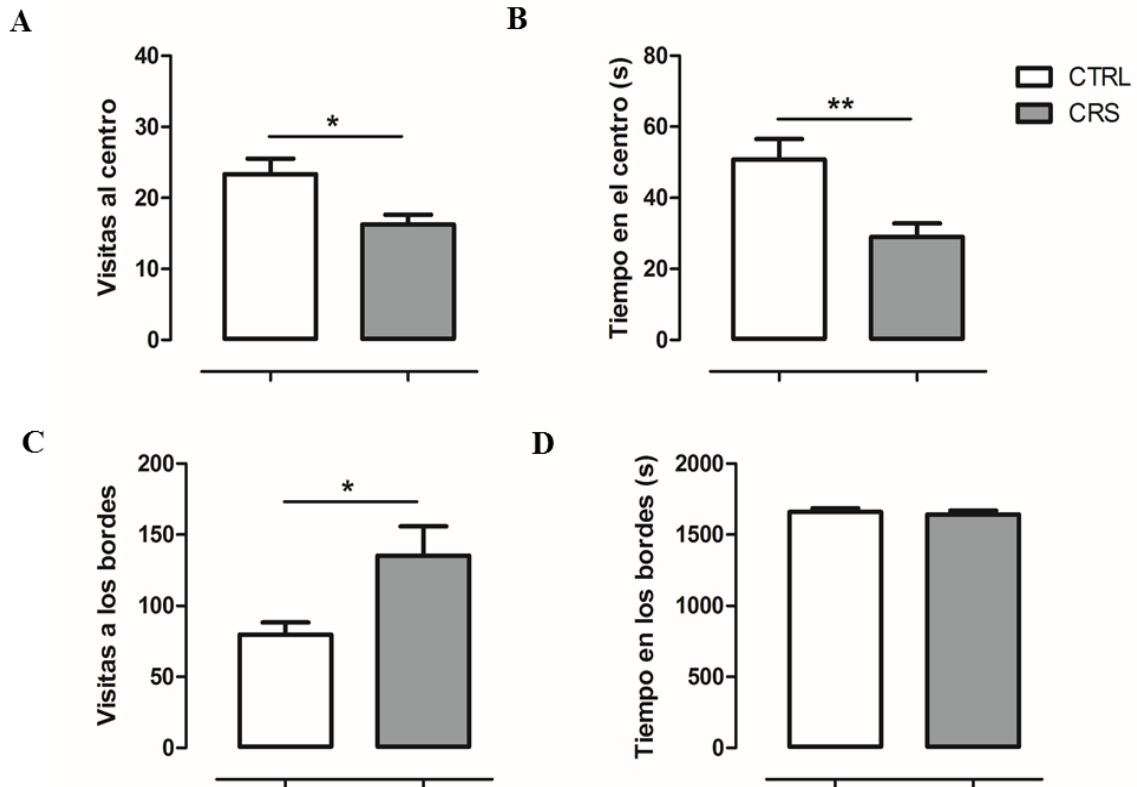


Figura 12. El efecto del estrés crónico de restricción (CRS) en comparación con las condiciones de control (CTRL), sobre el número de visitas al centro y bordes del campo abierto y el tiempo de permanencia en estas áreas, determinado dos días después de finalizados los tratamientos (el día 16). La exposición a CRS indujo una disminución significativa en la frecuencia de visitas al centro (A), el tiempo de permanencia en esta área (B), así como un aumento significativo de las visitas a los bordes del campo abierto (C). Las barras representan la media y las líneas verticales indican el error estándar de la media. * $p < 0,05$

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto a la distancia total recorrida ($t(22) = -0.325$, $p = 0.748$; Fig. 13, panel A) y la velocidad de desplazamiento de los animales ($t(22) = -0.205$, $p = 0.839$; Fig. 13, panel B).

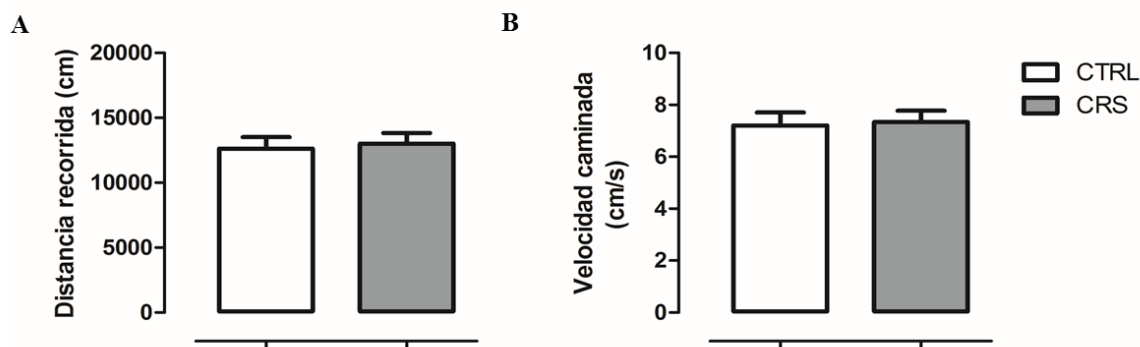


Figura 13. Efecto del estrés crónico de restricción (CRS) en comparación con las condiciones controles (CTRL) sobre la actividad locomotora determinada por la estimación de los parámetros de distancia total recorrida (cm) y velocidad caminada (cm/s) en el campo abierto dos días después de finalizados los tratamientos (día 16).

19.3. Efecto del estrés crónico sobre la morfología neuronal en el núcleo central de la amígdala

Análisis de la morfología dendrítica en el núcleo central de la amígdala

De acuerdo con observaciones previas que muestran una falta de efecto del CIS sobre la arborización dendrítica en las neuronas piramidales del CeA (Vyas et al., 2003), la exposición a CRS no causó alteraciones notables de la complejidad dendrítica en las neuronas piramidales del CeA, en relación con el tratamiento CTRL (Fig.14, panel B). Esto se puede apreciar en la ausencia de diferencias significativas en el número total de intersecciones dendríticas ($113,9 \pm 5,6$ y $109,1 \pm 4,4$ y $p > 0,05$ en los tejidos CTRL y CRS) y la falta de interacción entre el factor de tratamiento y las intersecciones contadas a lo largo toda la longitud dendrítica ($F_{24,200} = 0,578$, $p = 0,943$). De acuerdo con estas observaciones, no se detectó una diferencia significativa en la longitud dendrítica total entre tratamientos ($t(8) = 0.671$, $p = 0.521$; Fig.14, panel C) y el factor de tratamiento no tuvo interacción significativa con la longitud por orden dendrítico ($F_{7,64} = 0,900$, $p = 0,512$). La comparación múltiple post-hoc reveló un efecto significativo del tratamiento sobre la longitud dendrítica (es decir, una reducción) de las neuronas dentro del primer orden dendrítico solamente (Fig. 14, panel D). Este efecto aparentemente menor, no pudo ser detectado en las neuronas del CeA de los animales expuestos a CRS luego de un período de recuperación libre

de estrés (en el día 31). Esto sugiere que períodos más largos de exposición a CRS podrían inducir atrofia dendrítica de estas neuronas.

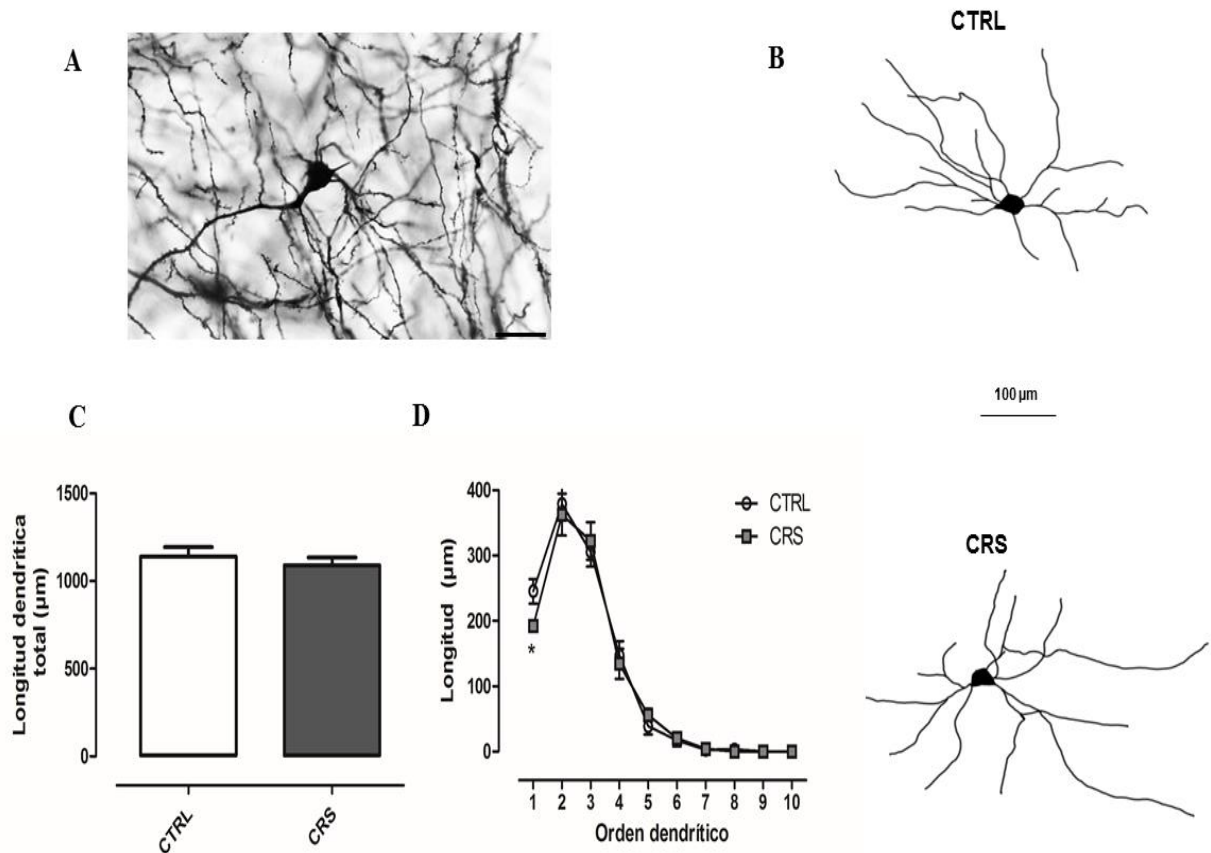


Figura 14. El efecto del estrés crónico de restricción (CRS) en comparación con las condiciones controles (CTRL); A) Micrografía representativa de las neuronas del CeA de cada uno de los grupos (barra de escala = 100 μm); B) complejidad dendrítica de las neuronas piramidales del CeA, visualizada a partir de los trazos representativos de la cámara lúcida de los árboles dendríticos totales; C) la longitud dendrítica total; y D) la longitud dendrítica por número de orden de las dendritas. La exposición a CRS no produjo ningún cambio obvio de arborización dendrítica en las neuronas piramidales del CeA (B). Por otro lado, mientras que no se detectó una diferencia significativa entre tratamientos en la longitud dendrítica total (C), se pudo detectar una reducción modesta pero significativa ($P < 0.05$) en la longitud dendrítica del primer orden de las neuronas del CeA en los animales expuestos a CRS (D). Las barras y los símbolos representan la media y las líneas verticales indican el error estándar de la media.

Análisis de la densidad de espinas dendríticas y tipos de espinas

La exposición a CRS produjo una disminución significativa de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales del CeA ($t(18) = 2,964$, $p = 0.008$) en comparación con el tratamiento CTRL en los segmentos dendríticos terminales de las neuronas piramidales del CeA (Fig. 15, panel B). El análisis de los tipos de espinas dendríticas mostró que el factor tratamiento (es decir el CRS vs CTRL) tenía una interacción significativa con el factor de tipos de espinas de la columna dendrítica ($F_{4,90} = 7,521$, $p < 0.001$). Esto se reflejó como una disminución significativa en el porcentaje de espinas tipo hongos aunado a un aumento significativo en las espinas tipo delgadas en las neuronas del CeA de los animales CRS en comparación con condiciones CTRL. Es importante destacar que no se detectaron cambios significativos en el porcentaje de los otros tipos de espinas entre los grupos de tratamiento. Las espinas tipo hongo son formas maduras de las espinas dendríticas, estables y forman sinapsis fuertes ya que su densidad postsináptica proporciona una mayor superficie de contacto, por lo que la disminución en este tipo de espinas podría afectar la interconectividad neuronal. Las espinas delgadas suelen ser transitorias y establecer sinapsis débiles lo que sugiere que este tipo de espinas aumenta como un mecanismo compensatorio a la disminución de las espinas tipo hongo.

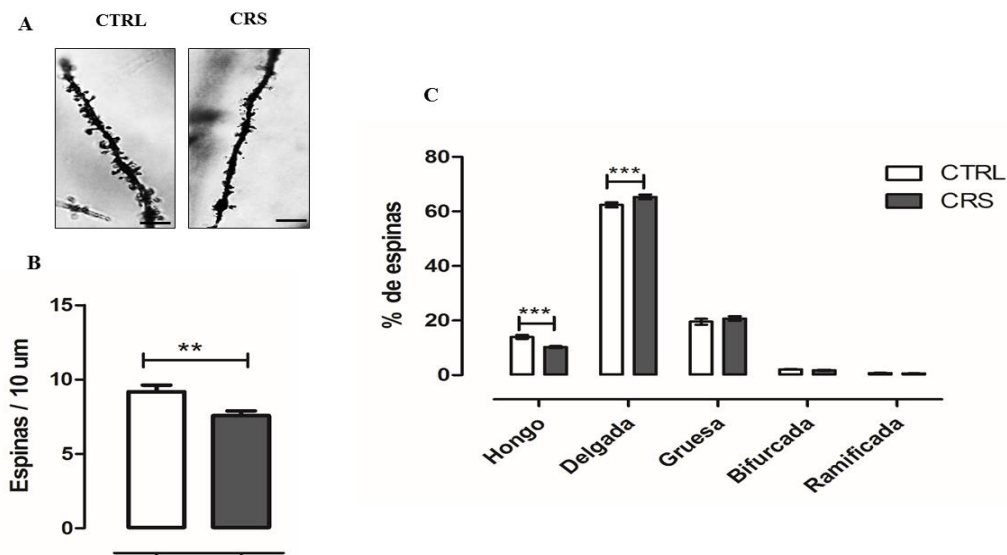


Figura 15. Efecto del estrés crónico de restricción (CRS), con respecto al tratamiento control (CTRL), sobre la densidad de espinas dendríticas y el porcentaje de los tipos de espinas dendríticas en los segmentos terminales de las dendritas más distales de las neuronas piramidales del CeA determinada un día después de finalizado los tratamientos correspondientes y las pruebas de comportamiento (día 17). La exposición a CRS causó una disminución significativa en el número de espinas, como se visualiza en las microfotografías representativas de segmentos dendríticos terminales (A), mediciones de densidad de espinas de la columna dendrítica (B), y cambios significativos en el porcentaje de tipos de espinas dendríticas (C). La cuantificación de los tipos de espinas dendríticas mostró una disminución de las espinas tipo hongos junto con un aumento de espinas delgadas en neuronas del CeA en los animales expuestos a CRS; no se detectaron cambios significativos en otros tipos de espinas en la columna. Las barras representan la media y las líneas verticales indican el error estándar de la media. Barra de escala en A = 10 μm. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

19.4. Efecto del período de recuperación sobre las alteraciones morfológicas y conductuales inducidas por el estrés crónico

Prueba de laberinto elevado en cruz después de un periodo de recuperación

Los animales pertenecientes al grupo CRS, que fueron expuestos a un periodo de recuperación de 14 días mostraron un comportamiento similar a la ansiedad, que se tradujo en una reducción significativa del número de visitas a los brazos abiertos ($t(22) = 4.188, p < 0.001$). No se detectó una diferencia

significativa en el tiempo de permanencia en ellos ($t(22) = 1.610, p = 0.122$). Esto sugiere una recuperación parcial de la conducta similar a la ansiedad inducida por CRS (Fig.16, panel A y B). Como se observó en los grupos de animales evaluados el día 15, no se detectó una diferencia significativa en el número de visitas a los brazos cerrados entre tratamientos ($t(22) = -0,618, p = 0,543$) después de completar el período de recuperación sin estrés ($19,6 \pm 1,7$ y $21,1 \pm 1,7$ para animales CTRL y CRS, respectivamente). Sin embargo, la diferencia en el tiempo transcurrido en los brazos cerrados entre tratamientos fue estadísticamente significativa ($199,4 \pm 12,9$ y $237,8 \pm 13$ para animales CTRL y CRS, respectivamente; $t(22) = -2,095, p = 0,048$). Ello sugiere, que los animales expuestos a CRS recuperados estaban más ansiosos que los animales del grupo CTRL. La falta de efecto de la exposición al CRS sobre la actividad locomotora tanto en condiciones experimentales como en tratamientos se confirmó aún más en la prueba de CA como se observó anteriormente.

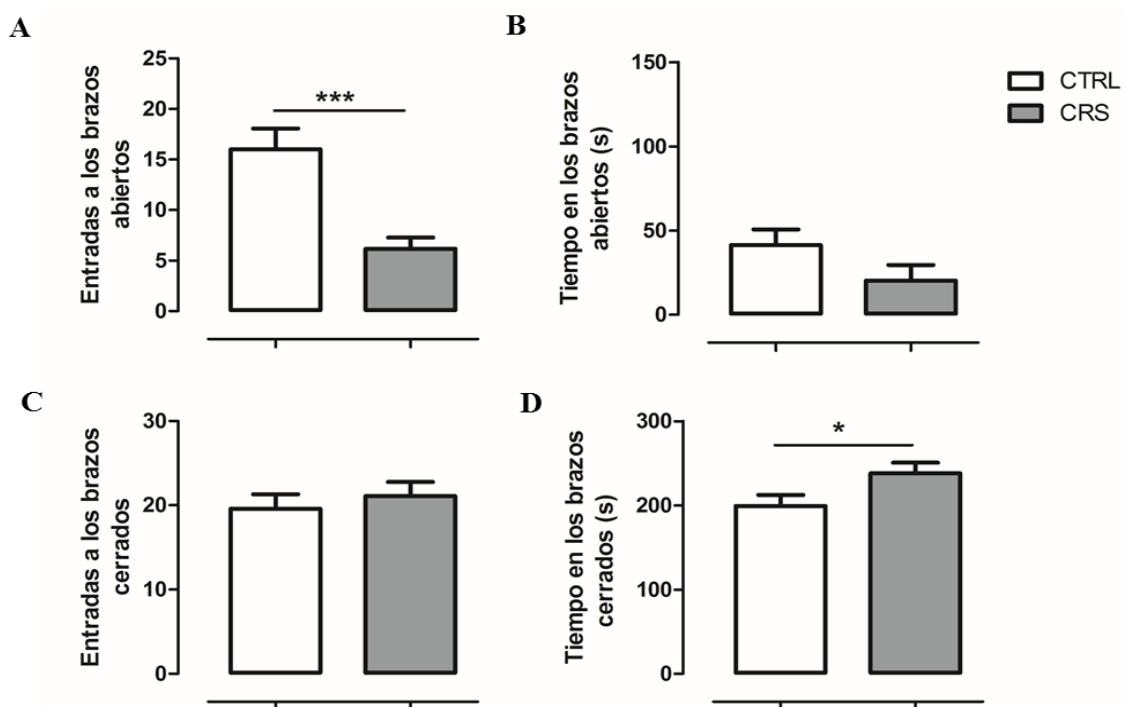


Figura 16. Efecto del estrés crónico de restricción (CRS) en relación con el tratamiento control (CTRL) sobre los parámetros medidos en la prueba de laberinto elevado en cruz (LEC); número de entradas y el tiempo pasado en los brazos abiertos y cerrados del LEC determinado posterior a 14 días de recuperación sin estrés una vez finalizados los tratamientos CTRL y CRS respectivamente (el día 29). Se detectó una disminución significativa en el número de entradas

a los brazos abiertos (A) pero no en el tiempo pasado en ellos (B) en los animales expuestos a CRS posterior a un período de recuperación libre de estrés. Las barras representan la media y las líneas verticales indican el error estándar de la media. *** $p < 0,05$ vs CTRL

Posterior a un periodo de 14 días de recuperación libre de estrés, se observa que el indicador del índice de ansiedad aún se encuentra aumentado significativamente en los animales expuestos a CRS ($t(22) = -2.832$, $p = 0.01$; Fig. 17) en comparación con los animales del grupo CTRL al día 29.

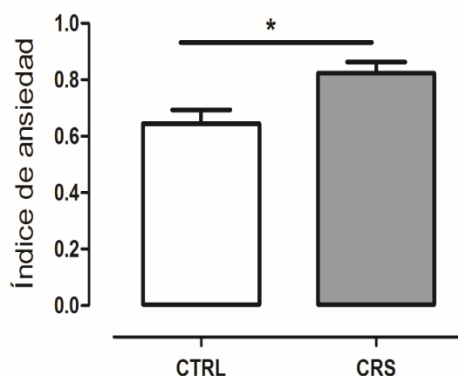


Figura 17. Efecto del estrés crónico de restricción (CRS) en relación con el tratamiento control (CTRL) sobre el índice de ansiedad medidos con la prueba de laberinto elevado en cruz (LEC) después de un periodo de recuperación de 14 días libres de estrés (día 29). Los animales expuestos a CRS presentan un índice de ansiedad significativamente mayor respecto al grupo CTRL. * $p < 0.05$ vs CTRL

Resultados del campo abierto después de un periodo de recuperación

Posterior a un periodo de 14 días de recuperación se observa en los animales con historial de CRS en comparación con los animales del grupo CTRL una tendencia no significativa a la disminución en el número de visitas al centro del CA ($t(22) = 1.536$, $p = 0.139$; Fig. 18, Panel A), así como en el tiempo de permanencia en el centro del CA ($t(22) = 1.018$, $p = 0.320$; Fig. 18, Panel B).

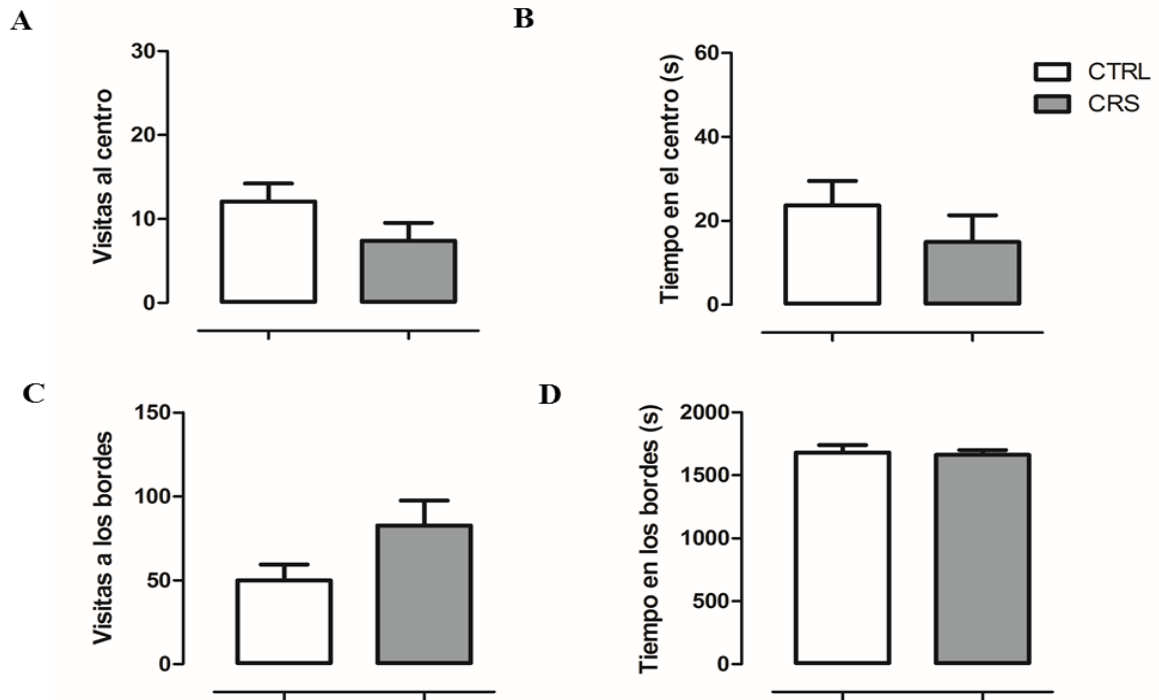


Figura 18. Efecto del período de recuperación de 14 días sin estrés (medido al día 30) en animales sometidos a estrés crónico de restricción (CRS) o en condiciones control (CTRL) sobre la frecuencia de visitas al centro del campo, frecuencia de visitas a los bordes y los tiempos de permanencia en estas áreas del campo abierto. La evaluación de estos parámetros en los grupos de animales sometidos al período de recuperación sin estrés no reveló diferencias significativas en la frecuencia de visitas al centro (A), a los bordes (C) y en el tiempo de permanencia en los mismos (B y D respectivamente). Las barras representan la media y las líneas verticales indican el error estándar de la media.

Como se observa en la Figura 19 no hay diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la distancia total recorrida ($t(22) = -0.109$, $p = 0.914$; Fig. 19 panel A) y la velocidad de desplazamiento de los animales ($t(22) = -0.378$, $p = 0.709$; Fig. 19 panel B).

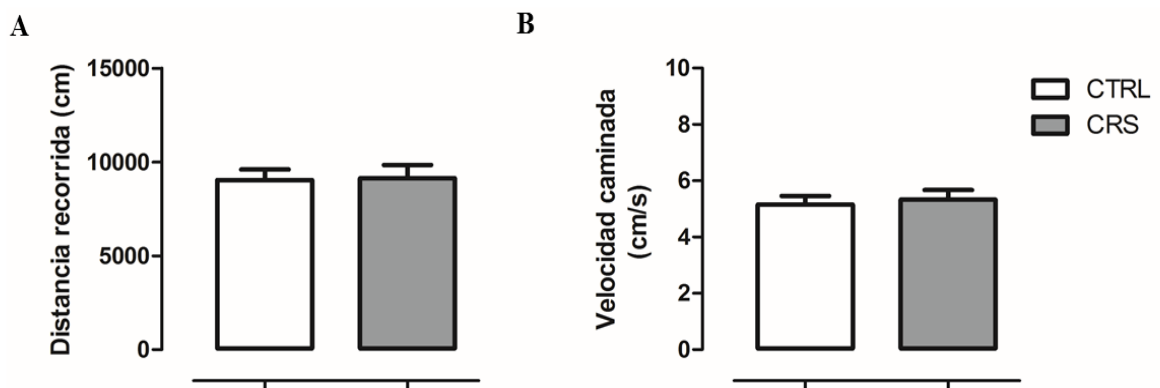


Figura 19. Efecto del estrés crónico de restricción (CRS) en comparación con las condiciones controles (CTRL) sobre la actividad locomotora determinada por los parámetros distancia total recorrida (cm) y velocidad caminada (cm/s) en el campo abierto posterior a un período de recuperación sin estrés de 14 días después de los tratamientos con CTRL y CRS (día 30).

Morfología neuronal del núcleo central de la amígdala

Posterior al periodo de recuperación se observó una disminución significativa en la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas del CeA de los animales con historial de estrés crónico ($t(16) = 6.062, p < 0.001$; Fig. 20, panel A). La interacción significativa entre el tratamiento CRS y el tipo de espinas de la columna dendrítica se mantuvo ($F_{4,80} = 5.720, p < 0.001$). Se observó una recuperación de las espinas tipo Hongo, en tanto que las espinas tipo delgadas seguían aumentadas y las espinas gruesas habían disminuido de manera significativa, respectivamente en el grupo de los animales con historial de estrés crónico respecto del grupo control (Fig. 20, panel B).

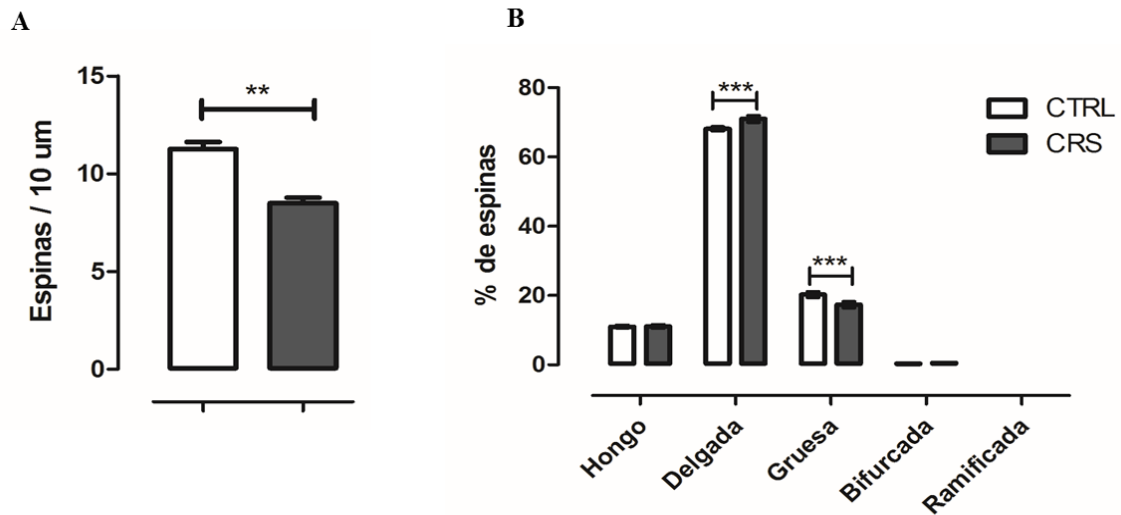


Figura 20. El efecto del estrés crónico de restricción (CRS) en comparación con las condiciones control (CTRL) sobre la densidad de espinas dendríticas (A) y el porcentaje de tipos de espinas dendrítica (B) en los segmentos terminales de las dendritas terminales de las neuronas piramidales del CeA, determinada en los animales que se les permitió un período de recuperación 14 días sin estrés después de los tratamientos CRS y CTRL. Las barras representan la media y las líneas verticales indican el error estándar de la media. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

19.5. Efecto de la lesión del núcleo central de la amígdala sobre las alteraciones somatométricas, endocrinas y conductuales inducidas por el estrés crónico

Modificaciones de las variables somatométricas

Se observa que la ganancia de peso corporal se ve afectada a pesar de la lesión bilateral del CeA en los animales que fueron expuestos a estrés crónico. Esto nos indica que el CeA no participa en los mecanismos responsables de la pérdida de peso corporal como resultado de la exposición al estrés crónico (Fig. 21, Panel A). No se encontraron diferencias significativas en el peso relativo de las glándulas adrenales y del timo entre los grupos experimentales (Fig. 21, Panel B y C).

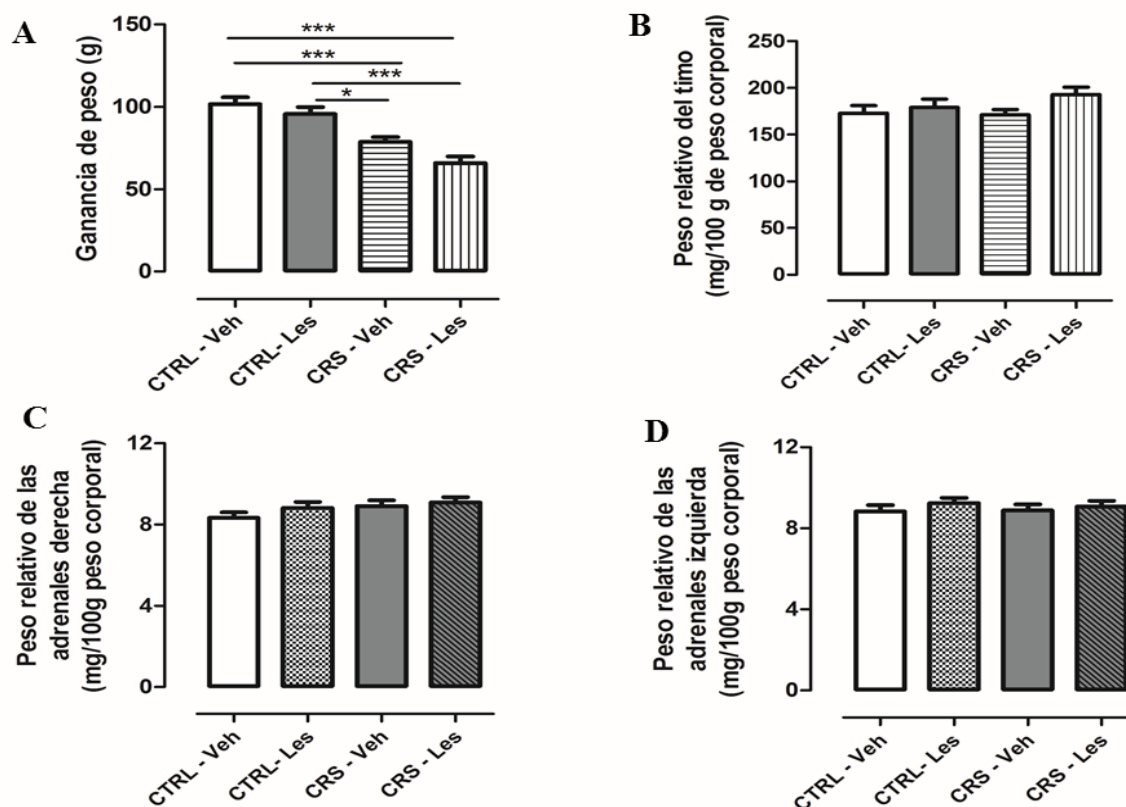


Figura 21. Gráficos de comparación de la ganancia de peso corporal (A), el peso relativo del timo (B), y las glándulas adrenales derechas (C) e izquierda (C) después de 14 días de tratamiento correspondiente, en grupos de animales que recibieron previamente una inyección de PBS (VEH) o ibotenate (LES). Los puntos representan la media de los valores y las líneas verticales representan el error estándar de la media. (* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ vs Control).

Resultado de la prueba conductual de laberinto elevado en cruz

Los animales que fueron expuestos a estrés crónico y se les administró vehículo bilateral en el CeA mostraron una tendencia a una disminución no significativa en la frecuencia de visitas a los brazos abiertos y el tiempo de duración en los brazos abiertos. En el grupo de animales expuestos a estrés crónico y con lesión bilateral del CeA se observó una tendencia no significativa al aumento en la frecuencia de visitas y al tiempo de permanencia en los brazos abiertos en comparación con el grupo de animales CRS- Veh, que a su vez fue similar a los grupos CTRL, a quienes se les administró vehículo o se les lesionó el CeA. Acorde a estos resultados se detectó una mayor tendencia no significativa al tiempo de permanencia en los brazos cerrados al grupo CRS- Veh

en comparación con los demás grupos de ratas (CTRL-Veh, CTRL-Les y CRS-Les) (Figura 22).

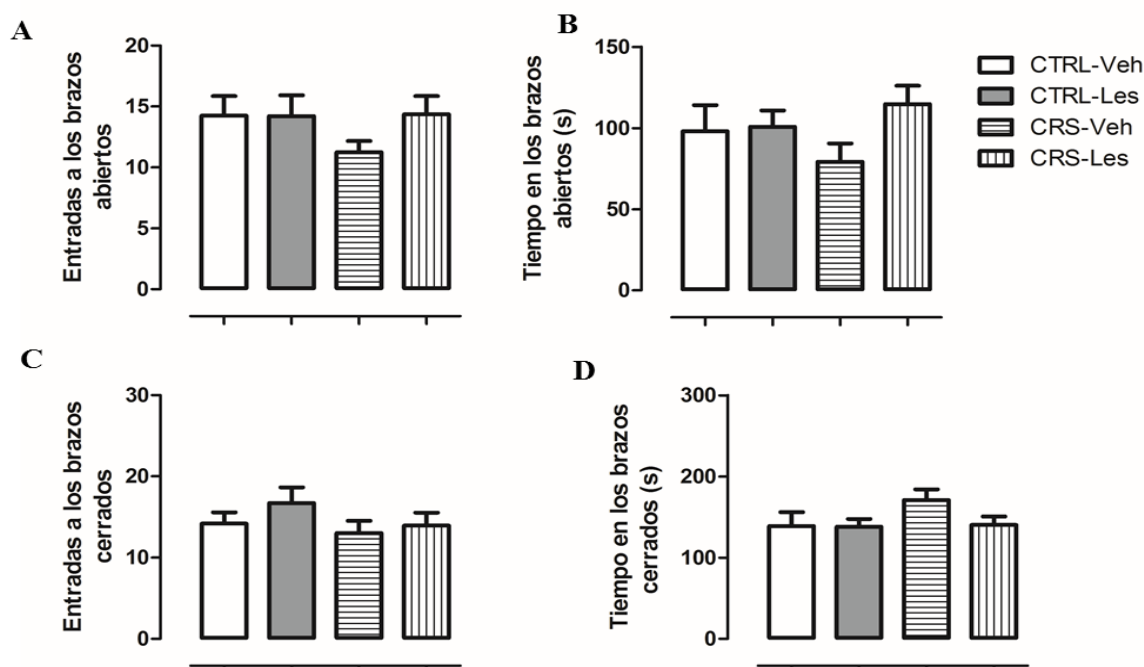


Figura 22. Efecto del estrés crónico de restricción (CRS) en relación con el tratamiento control (CTRL) sobre los parámetros medidos con la prueba de laberinto elevado en cruz (LEC); número de entradas y el tiempo pasado en los brazos abiertos y cerrados del LEC en animales que recibieron una inyección de PBS (VEH) o ibotenato (LES) directamente en el CeA determinado un día después de finalizados los tratamientos correspondientes (el día 15). La lesión del CeA no produjo cambios significativos con respecto a los animales tratados con vehículo.

En cuanto al indicador índice de ansiedad se observa que los animales que fueron sometidos a CRS y que les administró vehículo bilateral en el CeA (CRS-Veh) mostraron una tendencia al aumento no significativa de este indicador en comparación con los grupos CTRL-Veh, CTRL-Les y CRS-Les. Los animales correspondientes al grupo CRS-Les mostraron una tendencia menor del índice de ansiedad en relación con los demás grupos de animales (Figura 23).

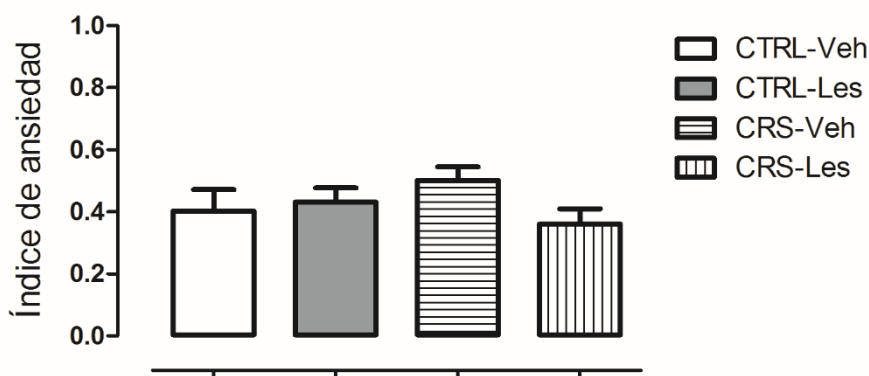


Figura 23. Efecto del estrés crónico de restricción (CRS) en relación con el tratamiento control (CTRL) sobre el índice de ansiedad medidos la prueba de laberinto elevado en cruz (LEC) un día después de finalizado los tratamientos correspondientes en animales que recibieron una inyección de PBS (VEH) o ibotenato (LES) directamente en el CeA determinado (el día 15).

Secreción de corticosterona inducida por estrés agudo en ratas con historial de estrés crónico

La figura 24 muestra la respuesta de secreción de CORT sin estimulación del eje HPA (tiempo 0) y en respuesta a la exposición a estrés agudo durante 30 minutos en ratas que se mantuvieron en condiciones controles (CTRL intacto, CTRL-Veh, inyectados con PBS bilateralmente en el CeA y CTRL-Les; inyectados con ibotenato bilateralmente en el CeA) y que fueron expuestas a CRS (CRS intacto, CRS-Veh; recibieron una inyección de PBS bilateralmente en el CeA y CRS-Les; inyectados con ibotenato bilateralmente el CeA). Se observó que a tiempo 0 las concentraciones de CORT de los grupos de animales CTRL, CTRL-Veh, CTRL-Les, CRS y CRS-Veh se encontraban a niveles basales, sin existir diferencias significativas entre grupos ($F_{5, 67} = 2,133, p = 0,72$). Solo se observó una pequeña tendencia no significativa de los niveles de CORT en plasma del grupo CRS-Les en comparación con el resto de los grupos. La exposición a estrés agudo de restricción de movimiento por 30 minutos indujo un incremento en las concentraciones plasmáticas de CORT en todos los grupos de animales en comparación con los niveles basales (tiempo 0). Los animales intactos que fueron expuestos a CRS mostraron una tendencia no significativa al aumento de los niveles de CORT respecto al grupo CTRL intacto. Se observó

niveles similares de CORT plasmática entre el grupo CRS y los grupos que se les lesionó o no el CeA independientemente del tratamiento CTRL o CRS previo ($F_{5, 66} = 1,1046, p = 0,415$).

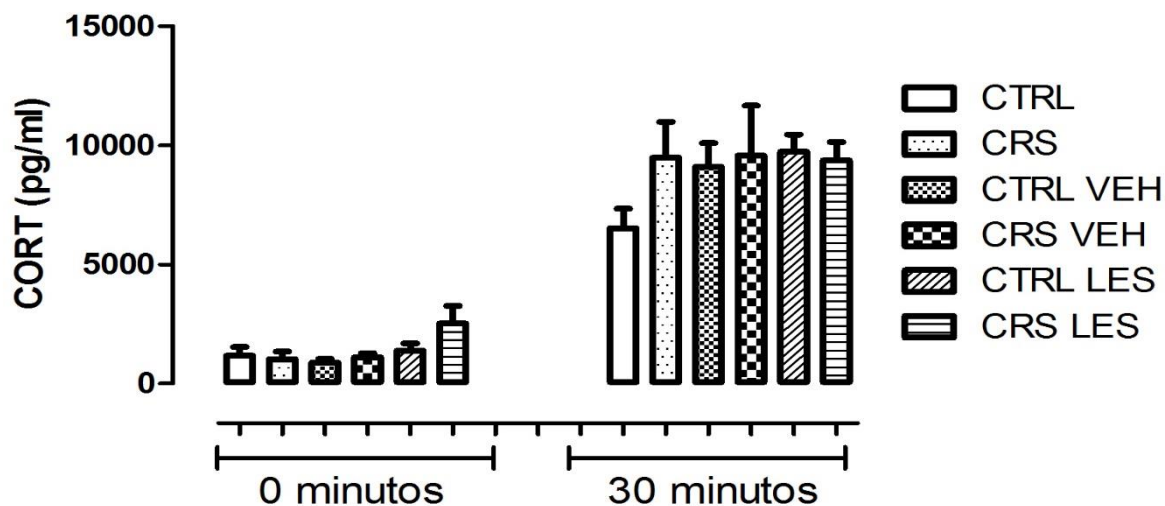


Figura 24. Secreción de corticosterona en ausencia (0 min) y presencia de estrés agudo por restricción de movimiento (30 min) en ratas previamente sometidas a condiciones control (CTRL) y estrés crónico (CRS). Dos grupos de animales solo recibieron los tratamientos CTRL o CRS y el resto de los grupos de animales recibieron una inyección de vehículo (CTRL-VEH Y CRS-VEH) o de ibotenate (CTRL-LES Y CRS-LES) directamente en el CeA antes de iniciado los tratamientos correspondientes.

20- Discusión

20.1. Discusión general

Los resultados del presente estudio documentan las consecuencias de la exposición al estrés crónico sobre la neuroplasticidad, la densidad y los tipos de espinas dendríticas de las neuronas piramidales del CeA y su posible relación con el desarrollo de trastornos de ansiedad. Pese a que, al parecer, la exposición a CRS utilizada en este estudio no encontró efectos importantes sobre la morfología neuronal de las células piramidales del CeA, sí se produjo una reducción significativa en la densidad de espinas dendríticas aunado a cambios en la forma de las espinas tipo delgadas, hongos y redondas. Estos cambios, es probable sean parte del mecanismo complejo que subyace en el desarrollo de la conducta similar a la ansiedad, incluso después de un periodo de recuperación sin estrés. Los datos encontrados no proporcionan evidencias suficientes para afirmar la posible participación del CeA en el control de la

ansiedad y la secreción de CORT inducida por estrés agudo en ratas con historial de estrés crónico.

20.2. Modificaciones de las variables somatométricas como resultado de la exposición a estrés crónico

Estudios realizados por el grupo de investigación han demostrado que el paradigma de estrés crónico por RMO empleado en este estudio modifica la ganancia de peso corporal, del peso relativo de las glándulas adrenales y del timo (García-Iglesias et al., 2013; Shanker et al., 2020). La variación fisiológica de estas variables somatométricas se toman como una medida de la efectividad de los protocolos de estrés crónico. En esta investigación, un día después de finalizados los tratamientos correspondientes (CTRL o CRS respectivamente), se pudo observar un menor peso corporal, que se ve reflejado en una disminución de la ganancia de peso corporal y un aumento de las glándulas adrenales derechas e izquierda, en los animales que fueron expuestos a CRS en comparación con los animales del grupo CTRL. Ello confirma la efectividad del protocolo de estrés crónico.

La variación en la ganancia de peso puede atribuirse a la hiperactividad del eje HPA que se presenta como resultado de la activación sistemática o repetida de este eje, consecuencia de la exposición a estrés crónico. Esto trae consigo que bajo las condiciones señaladas se liberen altas cantidades de CRF en el NPV del hipotálamo y en el CeA, principales fuentes de producción de este neuropéptido. Se ha descrito que el CRF promueve la lipólisis y produce un potente efecto anoréxico en ratas (Krahn et al., 1990). En pacientes humanos se ha asociado la hipersecreción de CRF en el eje HPA con alteraciones alimentarias como la anorexia nerviosa (Hotta et al., 1986). Luego de 14 días de recuperación (libres de estrés) una vez finalizado los tratamientos correspondientes se observó una recuperación de la ganancia de peso corporal en las ratas con historial de estrés crónico.

En los animales que fueron sometidos a CRS, se observó un aumento significativo del peso relativo de las glándulas adrenales izquierdas y derechas en comparación con las glándulas adrenales del grupo CTRL. Se conoce que el

estrés crónico provoca hipertrofia en las células de la zona fasciculada interna de la corteza adrenal y médula e hiperplasia en zona fasciculada externa de la corteza adrenal asociada a una respuesta mejorada en la secreción de CORT en respuesta a la ACTH (Ulrich-Lai et al., 2006). A partir de 14 días de recuperación del estrés se observó, en los animales con historial de estrés crónico, una reversión del aumento en peso relativo de las glándulas adrenales. Un informe anterior muestra que un periodo de recuperación de 7 días sin estrés es suficiente para normalizar el peso adrenal relativo y el aumento de peso corporal (Moench and Wellman, 2017). Existe evidencia de que el CIS provoca involución del timo y apoptosis del tejido en este órgano (Tarcic et al., 1998). El protocolo de estrés crónico utilizado en este estudio no siempre produce la involución del timo, lo cual parece depender de la variabilidad entre los animales de cada grupo experimental (García-Iglesias et al., 2013; Shanker et al., 2020).

Por otra parte, el CeA, parece no estar involucrada en los mecanismos que subyacen en la disminución de la ganancia de peso corporal en el estrés crónico. Estos resultados demostraron que la lesión del CeA no revierte la pérdida de peso que se produce por la exposición a estrés crónico (CRS-Veh y CRS-Les) en comparación con los animales de los grupos control (CTRL-Veh y CTRL-Les). No se encontraron diferencias significativas en el peso relativo de las adrenales y el timo en los animales control (CTRL-Veh y CTRL-Les) respecto a los animales que fueron expuestos a estrés crónico (CRS-Veh y CRS - Les). Estas observaciones en cuanto a la falta de efecto del estrés crónico en los parámetros somatométricos en ratas que se les lesionan o administran vehículo en el CeA están acorde con los hallazgos de Ventura-Silva (Ventura-Silva et al., 2013).

20.3. Efecto del estrés crónico de restricción sobre el desarrollo de una conducta similar a la ansiedad

Medición de la conducta ansiosa por la prueba de laberinto elevado en Cruz

Estudios previos en la literatura científica demuestra que la exposición a estrés crónico es un factor desencadenante de la conducta ansiosa en roedores detectada por la prueba de LEC (Chiba et al., 2012; Vyas et al., 2004; Vyas and Chattarji, 2004). El LEC es la prueba conductual no condicionada más utilizada en farmacología para evaluar la conducta similar a la ansiedad a través de los parámetros frecuencia de visitas a los brazos abiertos y tiempo de permanencia en ellos, así como tiempo de permanencia en los brazos cerrados. El parámetro de visitas a los brazos cerrados se ha empleado como una medida de la actividad locomotora en roedores (Conde et al., 2008; Cruz et al., 1994). Estos resultados demostraron que el paradigma de CRS empleado, tiene un efecto ansiogénico, que se corresponde con una disminución significativa en la actividad de los brazos abiertos y aumento significativo del tiempo en los brazos cerrados, que se ve reflejado en el aumento del índice de ansiedad del grupo que fue expuesto a CRS en comparación con el grupo CTRL.

Estos resultados son consistentes con estudios previos en roedores que demuestran que el estrés crónico es un factor desencadenante de un comportamiento similar a la ansiedad, que habitualmente viene acompañado de cambios en la plasticidad neuronal de estructuras cerebrales del sistema límbico (Vyas et al., 2006, 2002). Después de un período de recuperación libre de estrés de 14 días, persiste una reducción significativa en las entradas del brazo abierto en el LEC, pero no se observaron diferencias significativas en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados entre grupos. Sin embargo, el resultado del índice de ansiedad arrojó que los animales expuestos a CRS seguían presentando un estado de ansiedad mayor que los animales del grupo CTRL. Esto sugiere que en los animales con historial de estrés crónico ocurre una recuperación parcial del efecto ansiogénico; quizás periodos más extensos de recuperación sean necesarios para que la conducta similar a la ansiedad

desaparezca. Estudios realizados por Vyas y col., en 2004, informan que el comportamiento ansioso resultante de la exposición a 10 días de estrés crónico no se revierte después de un período de recuperación sin estrés de 21 días (Vyas et al., 2004). El índice de ansiedad, además de la entrada a los brazos abiertos y el tiempo de permanencia, integra otras variables como la duración total de la prueba y el número de entradas de brazos abiertos y cerrados (es decir, actividad total en el laberinto). Esto hace de este parámetro un indicador más exacto para medir un comportamiento similar a la ansiedad (Contreras et al., 2014).

Por otro lado, estos resultados evidenciaron que la lesión bilateral del CeA no evita el desarrollo de una conducta similar a la ansiedad debido a la exposición a estrés crónico medida en el LEC. Se conoce que la amígdala forma parte esencial de los circuitos que subyacen en los mecanismos del estrés. Sin embargo, los estudios que utilizan el protocolo de lesión bilateral del CeA para interrumpir el desarrollo de la conducta ansiosa muestran cierta heterogeneidad en su respuesta. Ventura – Silva y colaboradores plantean que la integridad del CeA es necesaria para el establecimiento de la hiperansiedad que se produce como respuesta al estrés pero que solo este núcleo regula por sí mismo el comportamiento de ansiedad. Esto podría explicarse a través del papel de otras estructuras como el BNST en los circuitos de la ansiedad. El BNST recibe fuertes proyecciones glutamatérgicas de estructuras infralímbicas que se conoce, contribuyen a la activación de la conducta similar a la ansiedad (Ventura-Silva et al., 2013).

Medición de la conducta similar a la ansiedad y locomoción por la prueba de campo abierto

La prueba de CA es comúnmente utilizada para medir la actividad exploratoria de los roedores y aspectos emocionales como la ansiedad. Esta prueba en roedores se basa en el conflicto entre la tendencia innata de los roedores para explorar entornos novedosos y la aversión a espacios abiertos (evitar peligros potenciales) (Hazim et al., 2014). Los roedores prefieren explorar cerca de las paredes del aparato, un comportamiento llamado tigmotaxis evitando la parte central del CA, razón por la cual varios estudios utilizan este parámetro como indicador de la ansiedad (Bowman et al., 2002). Se plantea que

los factores causantes de la ansiedad en esta prueba son la realización de la prueba en forma individual (en donde el animal es separado de su grupo social) y la agorafobia (el área donde el animal debe explorar es de dimensiones mayores al entorno donde fue criado). Otro grupo de estudios utilizan la frecuencia de visitas al centro del CA y el tiempo de permanencia en él, cómo indicadores de ansiedad (Callahan et al., 2013; Hellión-Ibarrola et al., 2006; Okajima et al., 2011; Prut and Belzung, 2003).

Los resultados obtenidos en la prueba de CA detectaron una disminución significativa en el número de visitas al centro y el tiempo de permanencia en el centro del CA en los animales expuestos a CRS en relación con los animales CTRL, lo que se corresponde con las observaciones encontradas en la prueba de LEC. Además, el CA se empleó en este estudio como una prueba de actividad de control para excluir cualquier efecto potencial del tratamiento de CRS sobre la actividad locomotora que pudiera haber influido en los niveles de actividad en el LEC. De hecho, los resultados confirmaron que el tratamiento no tuvo efecto sobre la actividad locomotora, lo que apoyó las observaciones derivadas de la prueba de LEC están exclusivamente relacionadas con la ansiedad y no con los cambios motores.

Además de su uso común como medida de la actividad locomotora, se sabe que la prueba de CA incluye otros factores como el impulso exploratorio y el miedo o la ansiedad (Russell, 1973). Ello proporciona una pantalla inicial para el comportamiento relacionado con la ansiedad en roedores (Prut and Belzung, 2003). Dado que una disminución de la actividad central sin modificación de la locomoción total y la exploración vertical se interpretan como un efecto ansiogénico (Prut and Belzung, 2003), el número de visitas al centro y el tiempo de permanencia en él se midieron como parámetros de comportamiento similar a la ansiedad en esta prueba. A diferencia de las observaciones en el LEC, un estado persistente de comportamiento similar a la ansiedad posterior al período de recuperación sin estrés no pudo confirmarse mediante esta prueba. La prueba de CA se ha validado farmacológicamente con benzodiazepinas clásicas tales como clordiazepóxido y diazepam que son eficaces en el tratamiento de los trastornos de ansiedad generalizada. Sin embargo, esta prueba parece no detectar todos los grados de la ansiedad en general, ya que no es sensible a

fármacos efectivos en trastornos de ansiedad como pánico, trastorno obsesivo compulsivo, fobias sociales y trastorno de estrés postraumático (alprazolam e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina crónicos) (Prut and Belzung, 2003). De hecho, se ha demostrado que los parámetros de diferentes pruebas de comportamiento como el LEC, CA y el test de conflicto de Volge para medir la ansiedad exhiben un bajo grado de correlación (Sudakov et al., 2013). Por lo tanto, las observaciones conductuales que sugieren un comportamiento similar a la ansiedad inducida por CRS, particularmente después del período de recuperación sin estrés, se basan principalmente en los resultados obtenidos en la prueba LEC.

20.4. Cambios en la morfología neuronal en el núcleo central de la amígdala como resultado de la exposición a estrés crónico y su posible relación con la ansiedad

Los circuitos neuronales que están involucrados en el comportamiento de tipo ansioso no se han dilucidado por completo. Sin embargo, se sabe que la amígdala a través de la liberación de CRF forma parte de los circuitos neuronales implicados en el desarrollo del aprendizaje emocional, el miedo y la ansiedad (Davis, 1992; LeDoux, 1994; Shekhar et al., 2005). Estudios de neuroimagen funcional en seres humanos han demostrado una mayor actividad de la amígdala en enfermedades afectivas relacionadas con el estrés como los trastornos de ansiedad (Rauch et al., 2000; Stein et al., 2007; van den Heuvel et al., 2005). Actualmente, se cree que el miedo y la ansiedad pueden desarrollarse a partir de la vivencia de eventos estresantes de la vida que provocan alteraciones en la estructura dendrítica y sináptica en regiones cerebrales sensibles al estrés, incluido el hipocampo, la CPFm y la amígdala (Gorman and Docherty, 2010; Leuner and Shors, 2013). En este sentido, se ha reportado que el estrés provoca cambios morfológicos importantes en las diferentes estructuras del sistema límbico (Kim and Diamond, 2002; Vyas et al., 2002). Existe evidencia que la exposición a CIS puede inducir patrones diferenciados de remodelación dendrítica en estructuras como el hipocampo, CPFm y la amígdala ya que induce atrofia dendrítica en las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo (McEwen, 1999; Vyas et al., 2004; Watanabe et al., 1992) y de la CPFm (Liston et al., 2006); sin embargo, en el BLA aumenta la densidad y complejidad de la

columna dendrítica aunado a un desarrollo de una conducta ansiosa en roedores (Qin et al., 2011; Vyas et al., 2004, 2002).

Los cambios morfológicos observados en el BLA parecen depender del tipo de estresor utilizado y su duración en el tiempo. Se ha demostrado que CIS induce consistentemente hipertrofia dendrítica en neuronas piramidales y en las estrelladas del BLA (Mitra et al., 2005; Vyas et al., 2002), mientras que el estrés variable crónico (CUS por sus siglas en inglés) induce atrofia de neuronas bipolares del mismo núcleo. Además, se ha demostrado que la exposición al estrés agudo provoca cambios morfológicos en la amígdala. La exposición al estrés agudo induce hipertrofia dendrítica en neuronas piramidales del BLA acompañada de la aparición de comportamiento ansioso (Cui et al., 2008); sin embargo, para que se observen estos cambios neuronales, parece que debe transcurrir un período de tiempo. Es probable que estos cambios morfológicos no sean reversibles en periodos de recuperación cortos (tiempo sin exposición al estrés). Vyas y col. en 2004, demuestran que los cambios morfológicos observados en el BLA persisten por un tiempo mayor de 21 días después de finalizada la última sesión de estrés (Vyas et al., 2004).

En contraste con la gran cantidad de estudios que han documentado el impacto del estrés crónico en el BLA, existen pocos reportes que han documentado los efectos del estrés en la morfología neuronal de las neuronas del CeA. Estos resultados revelan que la exposición al CRS no indujo alteraciones significativas en la morfología dendrítica en las neuronas piramidales del CeA, que están acorde con estudios anteriores, en los que demuestra que el CIS en ratas (2 h / al día, durante 10 días consecutivos) no tiene ningún efecto sobre la morfología dendrítica de las neuronas piramidales en el CeA (Vyas et al., 2003), en tanto que induce un aumento significativo en la longitud dendrítica y la arborización de las neuronas piramidales y estrelladas del BLA (Hopkins and Holstege, 1978; Johnson et al., 2009), así como en las neuronas del BNST en la amígdala extendida (Vyas et al., 2003). Se han notificado cambios hipertróficos similares en las neuronas piramidales del BLA como resultado de la inmovilización prolongada (6 h / día durante 21 días) (Johnson et al., 2009) y la inmovilización (2 h / día durante 21 días) en ratas (Vyas et al., 2006), y después de estrés crónico de sujeción (2 h / día durante 10

días) en ratones (Zhang et al., 2019). La mayoría de los efectos hipertróficos del estrés crónico en el BLA (Qin et al., 2011; Vyas et al., 2006; Zhang et al., 2019), incluido un aumento en la densidad de la columna dendrítica (Hill et al., 2013; Mitra et al., 2005; Zhang et al., 2019), se han asociado con el desarrollo de un comportamiento similar a la ansiedad, tal como se reveló, por una reducción significativa, en la exploración de brazo abierto en el LEC. Es de destacar que incluso después de un período de recuperación sin estrés de 21 días posterior al CIS, los animales continuaron mostrando una mayor ansiedad. Esto se acompaña de un aumento persistente en la arborización dendrítica de las neuronas del BLA (Vyas et al., 2004), lo que demuestra que el estrés es capaz de inducir selectivamente cambios estructurales en los diferentes núcleos del complejo amigdalino.

20.5. Cambios en la densidad de espinas dendríticas como resultado de la exposición a estrés crónico

Se sabe que, además de los cambios morfológicos que se producen en las neuronas del BLA como consecuencia de la exposición al estrés, también se ven afectadas las espinas dendríticas en este núcleo. Se ha informado que la exposición al CIS durante 21 días aumenta la espinogénesis en las neuronas piramidales del BLA en ratas y ratones (Bennur et al., 2007; Mitra et al., 2005; Vyas et al., 2006). También, se ha observado que la exposición al estrés agudo tiene el mismo impacto que el estrés crónico en el BLA. En contraste con el aumento de la espinogénesis en el BLA, se ha informado que CRS reduce significativamente la densidad de la columna de neuronas estrelladas espinosas medial en la amígdala medial (MeA) en ratones a la par del desarrollo de la espinogénesis en el BLA (Bennur et al., 2007). Esta misma reducción de las espinas dendríticas se observa en el núcleo posterodorsal medial de la amígdala (MePD) como resultado de una exposición de 1 hora al CRS, efecto que parece estar mediado por la serina proteasa (tPA) activadora del plasminógeno tisular. Una sesión o varias de estrés agudo o crónico de 6 horas no produce este efecto en este núcleo (Marcuzzo et al., 2007). Estos cambios en la espinogénesis inducidos por CRS se correlacionan ampliamente con el desarrollo de un comportamiento similar a la ansiedad, incluso después de un período de

recuperación sin estrés. Es posible que, estos cambios en las espinas dendríticas realmente estén involucrados en los mecanismos neuronales implícitos en el desarrollo de la ansiedad después de la exposición repetida a eventos estresantes.

Es importante destacar que los datos que documentan un comportamiento similar a la ansiedad inducida por CRS en este estudio están acompañados de una disminución en el número de espinas dendríticas (densidad de la columna dendrítica) en las neuronas piramidales del CeA en comparación con las ratas del grupo CTRL, que también estaban presentes en los animales a los que se les permitió recuperarse por un periodo de 14 días. Esto sugiere que una disminución de la conectividad del CeA con estructuras efectoras descendientes puede contribuir funcionalmente a los circuitos neuronales que median la ansiedad después de la exposición a estímulos estresantes. De acuerdo con esta posibilidad, se reporta que la disminución de la densidad dendrítica en las neuronas del CeA se correlaciona con un comportamiento similar a la ansiedad (evaluado en el LEC) inducido por la abstinencia de etanol en ratas alcohólicas (sometidas a exposición crónica al etanol). En este estudio se observó una reversión de la disminución de densidad dendrítica en las neuronas del CeA mediante el tratamiento previo con un inhibidor de histona desacetilasa aunado a los efectos ansiogénicos de la abstinencia al alcohol en estos animales (You et al., 2014).

20.6. Cambios en los diferentes tipos de espinas dendríticas en las neuronas piramidales del núcleo central de la amígdala

Existe evidencia que respalda el papel fundamental de las espinas dendríticas y su morfología en la estabilidad de la conectividad y excitabilidad neuronal (Harms and Dunaevsky, 2007; Hering and Sheng, 2001; Kasai et al., 2003). Los cambios en los diferentes tipos de espinas dendríticas presentes en este estudio sugieren un impacto de la exposición del CRS en la funcionalidad del CeA. Las espinas delgadas son móviles, transitorias y forman sinapsis débiles o silenciosas, mientras que las espinas con cabezas grandes (es decir, en forma de hongo y gruesas) son más estables y forman sinapsis fuertes con densidades postsinápticas más grandes y más contenido de receptores de

glutamato de tipo AMPA (Ganeshina et al., 2004; Harris, 1999; Kasai et al., 2003). Los niveles disminuidos de espinas en forma de hongo en las neuronas del CeA pueden formar parte de los mecanismos que están implicados en la pérdida de memoria que ocurre en el estrés. Las espinas tipo hongo juegan un rol esencial en el almacenamiento y transmisión de la información necesaria para la consolidación de la memoria (Bello-Medina et al., 2016). El déficit en este tipo de espinas podría causar efectos amnésicos o el incorrecto almacenamiento de la información correspondiente a los eventos estresantes.

Un aumento en las espinas delgadas, en paralelo con una disminución en las espinas en forma de hongo y gruesas en las neuronas del CeA, tal como se detectó en las dendritas apicales teñidas de la tinción de Golgi al día siguiente de culminado la exposición al CRS y después de un período de recuperación libre de estrés de 14 días respectivamente, sugiere una disminución en la conectividad funcional de las proyecciones del CeA con estructuras descendientes del tronco encefálico (Hopkins and Holstege, 1978; Pape and Pare, 2010). Un patrón similar de remodelación sináptica, indicativo de una conectividad disfuncional, que incluye la disminución de la densidad dendrítica en paralelo con un mayor número de espinas delgadas y una disminución de la cantidad de espinas en forma de hongo y rechonchas, ha sido observado en las neuronas piramidales de la CPFm después de un protocolo de CRS en roedores (Leem et al., 2020; Radley et al., 2008); mientras que se ha informado un aumento y una disminución del número de espinas delgadas y gruesas respectivamente, en la región CA1 del hipocampo como resultado del protocolo de estrés de derrota social crónica en ratones C57BL / 6 adolescentes (Iñiguez et al., 2016).

La literatura sugiere que la estructura y función del CeA están alteradas en individuos con trastornos de ansiedad, y que esto puede resultar en la desinhibición de las regiones efectoras posteriores que regulan los comportamientos relacionados con la ansiedad (Gilpin et al., 2015). Uno de estos objetivos es la sustancia gris central o sustancia gris periacueductal del mesencéfalo (PAG), que se ha visto implicada en el procesamiento emocional y las respuestas defensivas / aversivas (Johansen et al., 2011; LeDoux et al., 1988). Se ha demostrado que el CeA envía proyecciones gabaérgicas densas al

PAG del mesencéfalo (y tiene conexiones recíprocas importantes) (Rizvi et al., 1991). La aplicación de estímulos aversivos incondicionados evoca la activación paralela de la amígdala y la PAG (Johansen et al., 2010). La activación selectiva de neuronas glutamatérgicas en la PAG ventrolateral en ratones *Vglut2-cre*, en los que se introdujeron receptores de diseño activados exclusivamente por fármacos produce, de manera confiable, un comportamiento similar a la ansiedad, que se refleja en un mayor tiempo de congelación y un mayor tiempo pasado en la seguridad de un recinto oscuro (Taylor et al., 2019).

Por lo tanto, una conectividad estructural y funcionalmente disminuida de las proyecciones GABAérgicas del CeA (es decir, inhibitorias) con la PAG como resultado de la exposición al estrés crónico podría ser uno de los sustratos operativos subyacentes a los comportamientos relacionados con la ansiedad, incluidas las respuestas defensivas del miedo mediadas por la PAG. Dado que se analizaron las neuronas de las subdivisiones medial y lateral (CeM y CeL) del CeA, es probable que los cambios observados en las espinas se produjeron en ambas subdivisiones.

Desde un punto de vista funcional, el CeA se considera la principal salida de la amígdala para el control de los circuitos cerebrales involucrados en las respuestas fisiológicas y conductuales a los estímulos emocionalmente relevantes (Hopkins and Holstege, 1978; Pape and Pare, 2010). Se ha proporcionado evidencia de que el CeL también envía proyecciones GABAérgicas directas de largo alcance a regiones efectoras conductuales y fisiológicas, que incluyen la PAG del mesencéfalo y el núcleo paraventricular del tálamo (PVT). La transmisión sináptica excitadora en estas proyecciones están potenciadas por el condicionamiento del miedo, lo que sugiere un papel de la CeL en la regulación de la expresión del miedo independiente de la CeM (Penzo et al., 2014). Al igual que la PAG, el PVT se ha implicado en la regulación condicionada de la expresión del miedo (Padilla-Coreano et al., 2012).

20.7. Resultados de los niveles hormonales en ratas con historial de estrés crónico después de lesionada el núcleo central de la amígdala o administrado vehículo inducido por estrés agudo

Se ha reportado previamente que el empleo del protocolo de estrés crónico utilizado en este estudio no modifica los valores basales de CORT medidos antes de la exposición a estrés crónico entre los grupos CRS y CTRL; provoca niveles significativamente elevados de CORT plasmática en los animales expuesto a CRS a los tiempos 10, 30 y 120 minutos en comparación con los animales del grupo control. Además, se observó que a los 30 minutos de exposición al estrés agudo las ratas con historial de estrés crónico presentaron un pico máximo de concentraciones de CORT respecto a los otros tiempos en que se realizaron las determinaciones (García-Iglesias et al., 2013). El presente estudio mostró que no existieron diferencias significativas entre grupos en los niveles de CORT medidos en ausencia de estrés agudo (tiempo cero), solo se detectó un ligero aumento no significativo de la CORT en el grupo CRS-Les. Esto está acorde con lo reportado en la literatura donde se ha descrito que los niveles de CORT tienden a aumentar en las dos primeras semanas que se está expuesto al estrés y posterior a este tiempo disminuye a niveles basales (Silberman et al., 2002). Por otro lado, al tiempo 30 se observó en los animales intactos con historial de estrés crónico una tendencia al aumento no significativa de los niveles de CORT, en respuesta al estrés agudo en comparación con el grupo control. La falta de significación estadística entre los niveles de CORT puede deberse a la variabilidad en respuesta al estrés entre animales.

Está bien documentado el hecho de que la amígdala regula de forma positiva la actividad del eje HPA. Varios estudios han demostrado que la estimulación eléctrica de la amígdala produce un incremento en las secreciones plasmáticas de ACTH y CORT, así como un patrón complejo de comportamiento y respuestas autonómicas que se asemejan al miedo y la ansiedad (Dunn and Whitener, 1986; Weidenfeld et al., 1997). Existe evidencia que demuestra que la sobreexpresión del CRF por el uso de un promotor de la expresión de este neurotransmisor en el CeA, es capaz de provocar la hiperactividad del eje HPA y el desarrollo de una conducta similar a la ansiedad representada en una reducción significativa del porcentaje en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos en el LEC (Flandreau et al., 2012). Se ha reportado que la administración directa de corticosterona en la amígdala aumenta la corticosterona plasmática en respuesta a un estresor conductual (Shepard et al., 2003). Resulta

interesante que la lesión bilateral del CeA muestra un patrón heterogéneo en la secreción de CORT en respuesta al estrés crónico. Algunos informes señalan que la lesión bilateral del CeA reduce significativamente la secreción de CORT en respuesta al estrés agudo de inmovilización o condicionado (Van de Kar et al., 1991). Los resultados obtenidos por Ventura- Silva y colaboradores, solo demuestran que la lesión excitotóxica bilateral del CeA produce una atenuación de los niveles plasmáticos CORT basales en horario de la mañana en un grupo de ratas que fueron expuestas a estrés crónico variado (Ventura-Silva et al., 2013). Nuestros resultados mostraron que la lesión excitotóxica bilateral del CeA en animales con historial de estrés crónico no parece tener un efecto significativo en la secreción de CORT en respuesta a la exposición a estrés agudo. En este sentido se ha reportado que el CeA no juega un papel importante en el establecimiento o mantenimiento de la hiperactivación HPA ante el estrés crónico, ya que la lesión bilateral del CeA no afectaron la secreción de corticosterona o ACTH inducida por estrés agudo y produce alteraciones en la activación del eje HPA en respuesta al estrés crónico (Prewitt and Herman, 1997). Estas diferencias pudieran deberse a los diferentes protocolos de estrés crónico utilizados en los estudios, métodos de obtención de muestras sanguíneas y temporalidad con que se miden las concentraciones de CORT.

21. Conclusiones

Los resultados de este estudio aportan más evidencias sobre el complejo mecanismo implicado en el desarrollo de una conducta ansiosa, consecuencia de la exposición al estrés crónico. Pese a la falta de evidencias de la neuroplasticidad en el CeA, en relación con la exposición al estrés crónico, se encontraron cambios importantes en la densidad y morfología de las espinas dendríticas en este núcleo; resultado que puede estar involucrado en la génesis de una conducta similar a la ansiedad en roedores.

Es interesante, el hecho de que la conducta similar a la ansiedad inducida por el CRS y los cambios concomitantes en la espinogénesis a nivel del CeA persisten después de una recuperación sin estrés, capaz de revertir los cambios observados en la ganancia del peso corporal, del peso relativo del timo y de las glándulas adrenales. La remodelación de las espinas dendríticas en el CeA puede desempeñar un papel funcional en los circuitos neuronales que median el comportamiento similar a la ansiedad inducida por el estrés crónico. El CeA no demostró su participación en la regulación de la ansiedad, ni en la secreción de CORT en roedores, bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio.

22. Perspectivas

A partir de los resultados encontrados en esta tesis doctoral, las perspectivas de estudios futuros deben estar orientados en primer lugar a investigar si en los segmentos más proximales al soma de las neuronas piramidales del CeA ocurre una disminución de las espinas dendríticas y la variación en la morfología de estas últimas. Es importante conocer si en los demás tipos de neuronas, presentes en el CeA ocurren cambios ocasionados por el estrés crónico y qué sustancias podrían evitarlo. En segundo lugar, se deben identificar las estructuras centrales implicadas en el desarrollo de la conducta similar a la ansiedad y en la secreción exacerbada de GCs, a través de mecanismos aparentemente independientes de la ACTH.

23. Referencias bibliográficas

- Adamec, R., Hebert, M., Blundell, J., Mervis, R.F., 2012. Dendritic morphology of amygdala and hippocampal neurons in more and less predator stress responsive rats and more and less spontaneously anxious handled controls. *Behav. Brain Res.* 226, 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.09.009>
- Bello-Medina, P.C., Flores, G., Quirarte, G.L., McGaugh, J.L., Prado Alcalá, R.A., 2016. Mushroom spine dynamics in medium spiny neurons of dorsal striatum associated with memory of moderate and intense training. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E6516–E6525. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613680113>
- Benarroch, E.E., 2015. Organización funcional y su participación en trastornos neurológicos 12.
- Bennur, S., Shankaranarayana Rao, B.S., Pawlak, R., Strickland, S., McEwen, B.S., Chattarji, S., 2007. Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator. *Neuroscience* 144, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.075>
- Binley, K.E., Ng, W.S., Tribble, J.R., Song, B., Morgan, J.E., 2014. Sholl analysis: A quantitative comparison of semi-automated methods. *J. Neurosci. Methods* 225, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.01.017>
- Bowman, R.E., Ferguson, D., Luine, V.N., 2002. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. *Neuroscience* 113, 401–410. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00156-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00156-2)
- Bram, Z., Louiset, E., Ragazzon, B., Renouf, S., Wils, J., Duparc, C., Boutelet, I., Rizk-Rabin, M., Libé, R., Young, J., Carson, D., Vantghem, M.-C., Szarek, E., Martinez, A., Stratakis, C.A., Bertherat, J., Lefebvre, H., 2016. PKA regulatory subunit 1A inactivating mutation induces serotonin signaling in primary pigmented nodular adrenal disease. *JCI Insight* 1, e87958. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.87958>
- Callahan, L.B., Tschetter, K.E., Ronan, P.J., 2013. Inhibition of corticotropin releasing factor expression in the central nucleus of the amygdala attenuates stress-induced behavioral and endocrine responses. *Front. Neurosci.* 7, 195. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00195>
- Cannon, W.B., 1935. STRESSES AND STRAINS OF HOMEOSTASIS: *Am. J. Med. Sci.* 189, 13–14. <https://doi.org/10.1097/00000441-193501000-00001>
- Cannon, W.B., 1932. The Wisdom of the Body. *Nature* 133, 82–82. <https://doi.org/10.1038/133082a0>
- Chávez, C., Paulina, B., Herrera, M., Acosta, L., 2016. Estrés en poblaciones de mamíferos silvestres expuestas al impacto humano. 7.
- Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M.C., Wakabayashi, C., Kunugi, H., 2012. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.05.018>
- Chrousos, G.P., 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>

- Chrousos, G.P., 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851, 311–335. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09006.x>
- Coburn-Litvak, P.S., Pothakos, K., Tata, D.A., McCloskey, D.P., Anderson, B.J., 2003. Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 80, 11–23. [https://doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00019-4)
- Cohen, H., Matar, M.A., Joseph, Z., 2013. Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder. *Curr. Protoc. Neurosci.* 64. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0945s64>
- Colyn, L., Venzala, E., Marco, S., Perez-Otaño, I., Tordera, R.M., 2019. Chronic social defeat stress induces sustained synaptic structural changes in the prefrontal cortex and amygdala. *Behav. Brain Res.* 373, 112079. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112079>
- Conde, C., Nieto, J., Orozco, L.C., 2008. Análisis comportamental de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado bajo dos horarios de alimentación 10.
- Contreras, C.M., Rodríguez-Landa, J.F., García-Ríos, R.I., Cueto-Escobedo, J., Guillen-Ruiz, G., Bernal-Morales, B., 2014. Myristic Acid Produces Anxiolytic-Like Effects in Wistar Rats in the Elevated Plus Maze. *BioMed Res. Int.* 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/492141>
- Cook, S.C., Wellman, C.L., 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J. Neurobiol.* 60, 236–248. <https://doi.org/10.1002/neu.20025>
- Cosío, B.G., Torrego, A., Adcock, I.M., 2005. Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Arch. Bronconeumol.* 41, 34–41. <https://doi.org/10.1157/13070282>
- Cruz, A.P., Frei, F., Graeff, F.G., 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 171–176. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90472-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90472-3)
- Davis, M., 1992. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 353–375. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.15.030192.002033>
- de Kloet, E.R., Karst, H., Joëls, M., 2008. Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 268–272. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.10.002>
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1996. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 157, 1638–1644.
- Dueñas-Amaya, L.J., 2019. Factores de predisposición genéticos y epigenéticos de los trastornos de ansiedad. *Rev. Iberoam. Psicol.* 12. <https://doi.org/10.33881/2027-1786.rip.12206>
- Dunn, J.D., Whitener, J., 1986. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology* 42, 211–217. <https://doi.org/10.1159/000124442>
- Duval, F., González, F., Rabia, H., 2010. Neurobiología del estrés. *Rev. Chil. Neuro-Psiquiatr.* 48, 307–318. <https://doi.org/10.4067/S0717-92272010000500006>
- Duvarci, S., Pare, D., 2014. Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron* 82, 966–980. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.042>
- Flandreau, E.I., Ressler, K.J., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2012. Chronic overexpression of corticotropin-releasing factor from the central amygdala

- produces HPA axis hyperactivity and behavioral anxiety associated with gene-expression changes in the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Psychoneuroendocrinology* 37, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.04.014>
- Flores, G., Alquicer, G., Silva-Gómez, A.B., Zaldivar, G., Stewart, J., Quirion, R., Srivastava, L.K., 2005. Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience* 133, 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.02.021>
- Ganeshina, O., Berry, R.W., Petralia, R.S., Nicholson, D.A., Geinisman, Y., 2004. Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. *J. Comp. Neurol.* 468, 86–95. <https://doi.org/10.1002/cne.10950>
- García-Iglesias, B.B., Mendoza-Garrido, M.E., Gutiérrez-Ospina, G., Rangel-Barajas, C., Noyola-Díaz, M., Terrón, J.A., 2013. Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: involvement of 5-HT₇ receptors. *Neuropharmacology* 71, 216–227. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.013>
- Gibb, R., Kolb, B., 1998. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J. Neurosci. Methods* 79, 1–4. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(97\)00163-5](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(97)00163-5)
- Gilpin, N.W., Herman, M.A., Roberto, M., 2015. The Central Amygdala as an Integrative Hub for Anxiety and Alcohol Use Disorders. *Biol. Psychiatry* 77, 859–869. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.09.008>
- Gómez-González, Escobar, 2002. Neuroanatomía del estrés. *Rev. Mex. Neurocienc.* 3, 273–82.
- Gorman, J.M., Docherty, J.P., 2010. A Hypothesized Role for Dendritic Remodeling in the Etiology of Mood and Anxiety Disorders. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 22, 256–264. <https://doi.org/10.1176/jnp.2010.22.3.256>
- Gregus, A., Wintink, A.J., Davis, A.C., Kalynchuk, L.E., 2005. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav. Brain Res.* 156, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.013>
- Harms, K.J., Dunaevsky, A., 2007. Dendritic spine plasticity: Looking beyond development. *Brain Res.* 1184, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.094>
- Harris, K., Jensen, F., Tsao, B., 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation [published erratum appears in *J Neurosci* 1992 Aug;12(8):following table of contents]. *J. Neurosci.* 12, 2685–2705. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-07-02685.1992>
- Harris, K.M., 1999. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 343–348. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)80050-6](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80050-6)
- Hauger, R.L., Millan, M.A., Lorang, M., Harwood, J.P., Aguilera, G., 1988. Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology* 123, 396–405. <https://doi.org/10.1210/endo-123-1-396>

- Hazim, A.I., Ramanathan, S., Parthasarathy, S., Muzaimi, M., Mansor, S.M., 2014. Anxiolytic-like effects of mitragynine in the open-field and elevated plus-maze tests in rats. *J. Physiol. Sci.* 64, 161–169. <https://doi.org/10.1007/s12576-014-0304-0>
- Hellión-Ibarrola, M.C., Ibarrola, D.A., Montalbetti, Y., Kennedy, M.L., Heinichen, O., Campuzano, M., Tortoriello, J., Fernández, S., Wasowski, C., Marder, M., De Lima, T.C.M., Mora, S., 2006. The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. *J. Ethnopharmacol.* 105, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.013>
- Hering, H., Sheng, M., 2001. Dendritic spines : structure, dynamics and regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 880–888. <https://doi.org/10.1038/35104061>
- Herlyn, S., 2015. Bases biológicas de la ansiedad. Parte I.
- Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Cullinan, W.E., 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* 24, 151–180. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2003.07.001>
- Herman, J.P., Prewitt, C.M., Cullinan, W.E., 1996. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit. Rev. Neurobiol.* 10, 371–394. <https://doi.org/10.1615/critrevneurobiol.v10.i3-4.50>
- Hibberd, C., Yau, J.L.W., Seckl, J.R., 2000. Glucocorticoids and the ageing hippocampus. *J. Anat.* 197, 553–562. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19740553.x>
- Hill, M.N., Kumar, S.A., Filipowski, S.B., Iverson, M., Stuhr, K.L., Keith, J.M., Cravatt, B.F., Hillard, C.J., Chattarji, S., McEwen, B.S., 2013. Disruption of fatty acid amide hydrolase activity prevents the effects of chronic stress on anxiety and amygdalar microstructure. *Mol. Psychiatry* 18, 1125–1135. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.90>
- Hilton, S.M., Zbrozyna, A.W., 1963. Amygdaloid region for defence reactions and its efferent pathway to the brain stem. *J. Physiol.* 165, 160–173. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1963.sp007049>
- Holsen, L.M., Lancaster, K., Klibanski, A., Whitfield-Gabrieli, S., Cherkerzian, S., Buka, S., Goldstein, J.M., 2013. HPA-axis hormone modulation of stress response circuitry activity in women with remitted major depression. *Neuroscience* 250, 733–742. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.07.042>
- Hopkins, D.A., Holstege, G., 1978. Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. *Exp. Brain Res.* 32. <https://doi.org/10.1007/BF00239551>
- Hotta, M., Shibasaki, T., Masuda, A., Imaki, T., Demura, H., Ling, N., Shizume, K., 1986. The responses of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotropin-releasing hormone (CRH) and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62, 319–324. <https://doi.org/10.1210/jcem-62-2-319>
- Ildfonso, B.C., 2017. GENERALIDADES DE LA NEUROBIOLOGÍA DE LA ANSIEDAD. *Revista electrónica de psicología Iztacala* 20, 13.
- Iñiguez, S.D., Aubry, A., Riggs, L.M., Alipio, J.B., Zanca, R.M., Flores-Ramirez, F.J., Hernandez, M.A., Nieto, S.J., Musheyev, D., Serrano, P.A., 2016. Social defeat stress induces depression-like behavior and alters spine morphology in the

- hippocampus of adolescent male C57BL/6 mice. *Neurobiol. Stress* 5, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.07.001>
- Jankord, R., Herman, J.P., 2008. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1148, 64–73. <https://doi.org/10.1196/annals.1410.012>
- Joëls, M., Karst, H., Krugers, H.J., Lucassen, P.J., 2007. Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front. Neuroendocrinol.* 28, 72–96. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.04.001>
- Johansen, J.P., Cain, C.K., Ostroff, L.E., LeDoux, J.E., 2011. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 147, 509–524. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.009>
- Johansen, J.P., Tarpley, J.W., LeDoux, J.E., Blair, H.T., 2010. Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. *Nat. Neurosci.* 13, 979–986. <https://doi.org/10.1038/nn.2594>
- Johnson, S.A., Wang, J.-F., Sun, X., McEwen, B.S., Chattarji, S., Young, L.T., 2009. Lithium treatment prevents stress-induced dendritic remodeling in the rodent amygdala. *Neuroscience* 163, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.06.005>
- Kalogeras, K.T., Nieman, L.K., Friedman, T.C., Doppman, J.L., Cutler, G.B., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., Gold, P.W., Yanovski, J.A., 1996. Inferior petrosal sinus sampling in healthy subjects reveals a unilateral corticotropin-releasing hormone-induced arginine vasopressin release associated with ipsilateral adrenocorticotropin secretion. *J. Clin. Invest.* 97, 2045–2050. <https://doi.org/10.1172/JCI118640>
- Kaplowitz, E.T., Savenkova, M., Karatsoreos, I.N., Romeo, R.D., 2016. Somatic and Neuroendocrine Changes in Response to Chronic Corticosterone Exposure During Adolescence in Male and Female Rats. *J. Neuroendocrinol.* 28. <https://doi.org/10.1111/jne.12336>
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., Nakahara, H., 2003. Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26, 360–368. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00162-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00162-0)
- 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. *J. Neuroendocrinol.* 18, 330–338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01422.x>
- Keller-Wood, M.E., Dallman, M.F., 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.* 5, 1–24. <https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-1>
- Kim, J.J., Diamond, D.M., 2002. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 453–462. <https://doi.org/10.1038/nrn849>
- Kolb, B., Forgie, M., Gibb, R., Gorny, G., Rowntree, S., 1998. Age, experience and the changing brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 143–159. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(97\)00008-0](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(97)00008-0)
- Krahn, D.D., Gosnell, B.A., Majchrzak, M.J., 1990. The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposures. *Biol. Psychiatry* 27, 1094–1102. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(90\)90046-5](https://doi.org/10.1016/0006-3223(90)90046-5)
- Le Mestre, J., Duparc, C., Reznik, Y., Bonnet-Serrano, F., Touraine, P., Chabre, O., Young, J., Suzuki, M., Sibony, M., Gobet, F., Stratakis, C.A., Raverot, G.,

- Bertherat, J., Lefebvre, H., Louiset, E., 2019. Illicit Upregulation of Serotonin Signaling Pathway in Adrenals of Patients With High Plasma or Intra-Adrenal ACTH Levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104, 4967–4980. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00425>
- LeDoux, J.E., 1994. The amygdala: contributions to fear and stress. *Semin. Neurosci.* 6, 231–237. <https://doi.org/10.1006/smns.1994.1030>
- LeDoux, J.E., Iwata, J., Cicchetti, P., Reis, D.J., 1988. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 8, 2517–2529.
- Leem, Y.-H., Yoon, S.-S., Jo, S.A., 2020. Imipramine Ameliorates Depressive Symptoms by Blocking Differential Alteration of Dendritic Spine Structure in Amygdala and Prefrontal Cortex of Chronic Stress-Induced Mice. *Biomol. Ther.* 28, 230–239. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2019.152>
- Leuner, B., Falduo, J., Shors, T.J., 2003. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 659–665.
- Leuner, B., Shors, T.J., 2013. Stress, anxiety, and dendritic spines: What are the connections? *Neuroscience* 251, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.021>
- Liston, C., Miller, M.M., Goldwater, D.S., Radley, J.J., Rocher, A.B., Hof, P.R., Morrison, J.H., McEwen, B.S., 2006. Stress-Induced Alterations in Prefrontal Cortical Dendritic Morphology Predict Selective Impairments in Perceptual Attentional Set-Shifting. *J. Neurosci.* 26, 7870–7874. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1184-06.2006>
- Louiset, E., Contesse, V., Groussin, L., Cartier, D., Duparc, C., Barrande, G., Bertherat, J., Vaudry, H., Lefebvre, H., 2006. Expression of Serotonin γ 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, 4578–4586. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0538>
- Louiset, E., Isvi, K., Gasc, J.M., Duparc, C., Cauliez, B., Laquerrière, A., Kuhn, J.M., Lefebvre, H., 2008. Ectopic expression of serotonin γ receptors in an adrenocortical carcinoma co-secreting renin and cortisol. *Endocr. Relat. Cancer* 15, 1025–1034. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0085>
- Makino, S., Gold, P.W., Schulkin, J., 1994. Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 640, 105–112. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91862-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91862-7)
- Marcuzzo, S., Dall'Oglio, A., Ribeiro, M.F.M., Achaval, M., Rasia-Filho, A.A., 2007. Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci. Lett.* 424, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.07.019>
- Margioris, A.N., Tsatsanis, C., 2000. ACTH Action on the Adrenals, in: Feingold, K.R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J.M., Kaltsas, G., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., McLachlan, R., Morley, J.E., New, M., Perreault, L., Purnell, J., Rebar, R., Singer, F., Trencze, D.L., Vinik, A., Wilson, D.P. (Eds.), *Endotext*. MDTText.com, Inc., South Dartmouth (MA).

- McEwen, B.S., 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 886, 172–189. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02950-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02950-4)
- McEwen, B.S., 1999. Stress and hippocampal plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 105–122. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.105>
- McEwen, B.S., 1998. Protective and Damaging Effects of Stress Mediators. *N. Engl. J. Med.* 338, 171–179. <https://doi.org/10.1056/NEJM199801153380307>
- Medina, P.C.B., Pérez, M.E.G., Quirarte, G.L., Alcalá, R.A.P., Fragoso, A.C.M., 2018. Consolidación de la memoria: de las moléculas a las espinas dendríticas 24.
- Mitra, R., Jadhav, S., McEwen, B.S., Vyas, A., Chattarji, S., 2005. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9371–9376. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504011102>
- Nikolenko, V.N., Oganesyán, M.V., Rizaeva, N.A., Kudryashova, V.A., Nikitina, A.T., Pavliv, M.P., Shchedrina, M.A., Giller, D.B., Bulygin, K.V., Sinelnikov, M.Y., 2020. Amygdala: Neuroanatomical and Morphophysiological Features in Terms of Neurological and Neurodegenerative Diseases. *Brain Sci.* 10, 502. <https://doi.org/10.3390/brainsci10080502>
- Okajima, D., Kudo, G., Yokota, H., 2011. Antidepressant-like behavior in brain-specific angiogenesis inhibitor 2-deficient mice. *J. Physiol. Sci.* 61, 47–54. <https://doi.org/10.1007/s12576-010-0120-0>
- Pacák, K., Palkovits, M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22, 502–548. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.4.0436>
- Padilla-Coreano, N., Do-Monte, F.H., Quirk, G.J., 2012. A time-dependent role of midline thalamic nuclei in the retrieval of fear memory. *Neuropharmacology* 62, 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.037>
- Pape, H.-C., Pare, D., 2010. Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear. *Physiol. Rev.* 90, 419–463. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2009>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- Penzo, M.A., Robert, V., Li, B., 2014. Fear Conditioning Potentiates Synaptic Transmission onto Long-Range Projection Neurons in the Lateral Subdivision of Central Amygdala. *J. Neurosci.* 34, 2432–2437. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4166-13.2014>
- Pinzón-Parra, C., Vidal-Jiménez, B., Camacho-Abrego, I., Flores-Gómez, A.A., Rodríguez-Moreno, A., Flores, G., 2019. Juvenile stress causes reduced locomotor behavior and dendritic spine density in the prefrontal cortex and basolateral amygdala in Sprague-Dawley rats: XXXX. *Synapse* 73, e22066. <https://doi.org/10.1002/syn.22066>
- Prewitt, C.M.F., Herman, J.P., 1997. Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Regulation Following Lesions of the Central Nucleus of the Amygdala. *Stress* 1, 263–279. <https://doi.org/10.3109/10253899709013746>
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x)

- Qin, M., Xia, Z., Huang, T., Smith, C.B., 2011. Effects of chronic immobilization stress on anxiety-like behavior and basolateral amygdala morphology in Fmr1 knockout mice. *Neuroscience* 194, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.047>
- Radley, J.J., Rocher, A.B., Rodriguez, A., Ehlenberger, D.B., Dammann, M., McEwen, B.S., Morrison, J.H., Wearne, S.L., Hof, P.R., 2008. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J. Comp. Neurol.* 507, 1141–1150. <https://doi.org/10.1002/cne.21588>
- Rauch, S.L., Whalen, P.J., Shin, L.M., Mclnerney, S.C., Macklin, M.L., Lasko, N.B., Orr, S.P., Pitman, R.K., 2000. Exaggerated amygdala response to masked facial stimuli in posttraumatic stress disorder: a functional MRI study. *Biol. Psychiatry* 47, 769–776. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)00828-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)00828-3)
- Rivier, C., Vale, W., 1987. Diminished responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat during exposure to prolonged stress: a pituitary-mediated mechanism. *Endocrinology* 121, 1320–1328. <https://doi.org/10.1210/endo-121-4-1320>
- Rizvi, T.A., Ennis, M., Behbehani, M.M., Shipley, M.T., 1991. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: Topography and reciprocity. *J. Comp. Neurol.* 303, 121–131. <https://doi.org/10.1002/cne.903030111>
- Romero, C.E.C., Noriega, A.E., Ruiz, J.C., Rodríguez, G.S., Reboredo, T.B., Pliego, M.V., 2018. Estrés y cortisol: implicaciones en la ingesta de alimento 15.
- Roosendaal, B., 2003. Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 1213–1223. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.09.015>
- Russell, P.A., 1973. RELATIONSHIPS BETWEEN EXPLORATORY BEHAVIOUR AND FEAR: A REVIEW. *Br. J. Psychol.* 64, 417–433. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1973.tb01369.x>
- Saroj, N., Shanker, S., Fernández-Parilla, M.A., López-Sánchez, P., Terrón, J.A., 2019. Effect of chronic corticosterone treatment on expression and distribution of serotonin 5-HT7 receptors in rat adrenal glands. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 97, 924–931. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0080>
- Selye, H., 1956. THE STRESS OF LIFE. *Ind. Med. Surg.* 33, 621–625.
- Selye, H., 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 6, 117–230. <https://doi.org/10.1210/jcem-6-2-117>
- Semple, W.E., Goyer, P.F., McCORMICK, R., Donovan, B., Muzic, R.F., Ruge, L., Mccutcheon, K., Lewis, C., Liebling, D., Kowaliw, S., Vapenik, K., Semple, M.A., Flener, C.R., Schulz, S.C., 2000. Higher Brain Blood Flow at Amygdala and Lower Frontal Cortex Blood Flow in PTSD Patients with Comorbid Cocaine and Alcohol Abuse Compared with Normals. *Psychiatry* 63, 65–74. <https://doi.org/10.1080/00332747.2000.11024895>
- Shanker, S., Saroj, N., Cordova, E.J., Jarillo-Luna, R.A., López-Sánchez, P., Terrón, J.A., 2020. Chronic restraint stress induces serotonin transporter expression in the rat adrenal glands. *Mol. Cell. Endocrinol.* 518, 110935. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110935>
- Shekhar, A., Truitt, W., Rainnie, D., Sajdyk, T., 2005. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. *Stress* 8, 209–219. <https://doi.org/10.1080/10253890500504557>

- Shepard, J.D., Barron, K.W., Myers, D.A., 2003. Stereotaxic localization of corticosterone to the amygdala enhances hypothalamo-pituitary–adrenal responses to behavioral stress. *Brain Res.* 963, 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03978-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03978-1)
- Shepard, J.D., Barron, K.W., Myers, D.A., 2000. Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. *Brain Res.* 861, 288–295.
- Shin, L.M., Liberzon, I., 2010. The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacology* 35, 169–191. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.83>
- Sholl, D.A., 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J. Anat.* 87, 387–406.
- Silberman, D.M., Wald, M., Genaro, A.M., 2002. Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response. Participation of serum thyroid hormones and corticosterone. *Int. Immunopharmacol.* 2, 487–497. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00190-4](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00190-4)
- Silberman, D.M., Wald, M.R., Genaro, A.M., 2003. Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *J. Neuroimmunol.* 144, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.08.031>
- Silva-Gómez, A.B., Rojas, D., Juárez, I., Flores, G., 2003. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain Res.* 983, 128–136. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)03042-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)03042-7)
- Stein, M.B., Simmons, A.N., Feinstein, J.S., Paulus, M.P., 2007. Increased amygdala and insula activation during emotion processing in anxiety-prone subjects. *Am. J. Psychiatry* 164, 318–327. <https://doi.org/10.1176/ajp.2007.164.2.318>
- Stenzel-Poore, M.P., Heinrichs, S.C., Rivest, S., Koob, G.F., Vale, W.W., 1994. Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 2579–2584.
- Straube, T., Mentzel, H.-J., Miltner, W.H.R., 2006. Neural Mechanisms of Automatic and Direct Processing of Phobogenic Stimuli in Specific Phobia. *Biol. Psychiatry* 59, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.06.013>
- Sudakov, S.K., Nazarova, G.A., Alekseeva, E.V., Bashkatova, V.G., 2013. Estimation of the level of anxiety in rats: differences in results of open-field test, elevated plus-maze test, and Vogel's conflict test. *Bull. Exp. Biol. Med.* 155, 295–297. <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2136-y>
- Sunanda, null, Rao, M.S., Raju, T.R., 1995. Effect of chronic restraint stress on dendritic spines and excrescences of hippocampal CA3 pyramidal neurons--a quantitative study. *Brain Res.* 694, 312–317. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00822-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00822-8)
- Tarcic, N., Ovadia, H., Weiss, D.W., Weidenfeld, J., 1998. Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *J. Neuroimmunol.* 82, 40–46. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(97\)00186-0](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(97)00186-0)
- Taylor, N.E., Pei, J., Zhang, J., Vlasov, K.Y., Davis, T., Taylor, E., Weng, F.-J., Van Dort, C.J., Solt, K., Brown, E.N., 2019. The Role of Glutamatergic and Dopaminergic Neurons in the Periaqueductal Gray/Dorsal Raphe: Separating Analgesia and Anxiety. *eneuro* 6, ENEURO.0018-18.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0018-18.2019>

- Terrón, J.A., 2014. Novel insights into the potential involvement of 5-HT7 receptors in endocrine dysregulation in stress-related disorders. *Rev. Neurosci.* 25, 439–449. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0017>
- Trucco, M., 2002. Estrés y trastornos mentales: aspectos neurobiológicos y psicosociales. *Rev. Chil. Neuro-Psiquiatr.* 40. <https://doi.org/10.4067/S0717-92272002000600002>
- Ulrich-Lai, Y.M., Figueiredo, H.F., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Engeland, W.C., Herman, J.P., 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E965–973. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00070.2006>
- Van de Kar, L.D., Piechowski, R.A., Rittenhouse, P.A., Gray, T.S., 1991. Amygdaloid Lesions: Differential Effect on Conditioned Stress and Immobilization-Induced Increases in Corticosterone and Renin Secretion. *Neuroendocrinology* 54, 89–95. <https://doi.org/10.1159/000125856>
- van den Heuvel, O.A., Veltman, D.J., Groenewegen, H.J., Witter, M.P., Merkelbach, J., Cath, D.C., van Balkom, A.J.L.M., van Oppen, P., van Dyck, R., 2005. Disorder-Specific Neuroanatomical Correlates of Attentional Bias in Obsessive-compulsive Disorder, Panic Disorder, and Hypochondriasis. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 922. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.8.922>
- Ventura-Silva, A.P., Melo, A., Ferreira, A.C., Carvalho, M.M., Campos, F.L., Sousa, N., Pêgo, J.M., 2013. Excitotoxic lesions in the central nucleus of the amygdala attenuate stress-induced anxiety behavior. *Front. Behav. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00032>
- Vyas, A., Bernal, S., Chattarji, S., 2003. Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Res.* 965, 290–294. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)04162-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)04162-8)
- Vyas, A., Chattarji, S., 2004. Modulation of different states of anxiety-like behavior by chronic stress. *Behav. Neurosci.* 118, 1450–1454. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.6.1450>
- Vyas, A., Jadhav, S., Chattarji, S., 2006. Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. *Neuroscience* 143, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.003>
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., 2002. Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons. *J. Neurosci.* 22, 6810–6818. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06810.2002>
- Vyas, A., Pillai, A.G., Chattarji, S., 2004. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience* 128, 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.013>
- Watanabe, Y., Gould, E., McEwen, B.S., 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.* 588, 341–345. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91597-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91597-8)
- Weidenfeld, J., Itzik, A., Feldman, S., 1997. Effect of glucocorticoids on the adrenocortical axis responses to electrical stimulation of the amygdala and the ventral noradrenergic bundle. *Brain Res.* 754, 187–194. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00078-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00078-4)

- Willis, M.A., Haines, D.E., 2018. The Limbic System, in: *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications*. Elsevier, pp. 457-467.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39632-5.00031-1>
- You, C., Zhang, H., Sakharkar, A.J., Teppen, T., Pandey, S.C., 2014. Reversal of deficits in dendritic spines, BDNF and Arc expression in the amygdala during alcohol dependence by HDAC inhibitor treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 313–322. <https://doi.org/10.1017/S1461145713001144>
- Zhang, J.-Y., Liu, T.-H., He, Y., Pan, H.-Q., Zhang, W.-H., Yin, X.-P., Tian, X.-L., Li, B.-M., Wang, X.-D., Holmes, A., Yuan, T.-F., Pan, B.-X., 2019. Chronic Stress Remodels Synapses in an Amygdala Circuit–Specific Manner. *Biol. Psychiatry* 85, 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.06.019>
- Ziegler, D.R., 2002. Neurocircuitry of Stress Integration: Anatomical Pathways Regulating the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis of the Rat. *Integr. Comp. Biol.* 42, 541–551. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.541>