



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dra. María Inés Forray

Dpto. de Biología Celular y Molecular

Facultad de Ciencias Biológicas

P. Universidad Católica de Chile

Profesor Co- Patrocinante

Dra. Ilena Concha G

Instituto de Bioquímica

Facultad de Ciencias

Universidad Austral de Chile

**EFEECTO DE LA DESREGULACION DEL EJE HIPOTALAMO-PITUITARIA-
SUPRARRENAL SOBRE LA EXPRESION DEL GEN DE CRH EN EL NUCLEO DEL
LECHO DE LA ESTRIA TERMINAL DE LA RATA**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
grado de *Licenciado en*
Bioquímica y Título Profesional de
Bioquímico

MARCOS ALEJANDRO SANTIBAÑEZ TORO

VALDIVIA – CHILE

2005

A mi madre, por que sin tu preocupación no hubiera podido ser la persona que soy

A Paola mi compañera, mi amiga y apoyo. Compartir los sueños contigo es empezar a convertirlos en realidad.

A la Dra. María Inés Forray Claps por guiarme, aconsejarme y formarme como investigador. Además de ser una amiga.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Austral de Chile por entregarme las herramientas para desarrollarme como profesional en el área de las ciencias.

A la Dra. Ana María Zarraga le agradezco sus consejos y ayuda, lo cuales he seguido en la vida para crecer como una mejor persona y científico.

Al Dr. Esteban Rodríguez le agradezco la gentil donación del anticuerpo anti-CRH, sin el cual no habría sido posible el desarrollo de este trabajo de tesis.

A Marco, Nicolás y Marcela, mis compañeros de laboratorio

A las doctoras Katia Gysling, Estela Andrés, gracias por aconsejarme en el desarrollo de mi tesis

A los doctores Gonzalo Bustos y Jorge Belmar, por su amabilidad y cooperación

A la Sra. Lucy, Sra. Sole, Don Héctor y Don Emilio, gracias por su amistad

A mis compañeros y amigos, Rolando Cuevas, Rolando Rojas, Elías, Paola, Claudia, Gabriel, Pepe, Andrea Vechiola, Andrea Gómez, Danny, Eduardo, Don Jorge, Tamara, Cony, Cristian y Viviana O.

Esta Tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1020940 otorgado a la Dra. María Inés Forray Claps.

INDICE

1	RESUMEN	1
1.1	ABSTRACT	3
2	INTRODUCCIÓN	5
2.1	PAPEL DEL SISTEMA LÍMBICO EN LA REGULACIÓN DEL EJE HPA	8
2.1.1	HIPOCAMPO	8
2.1.2	COMPLEJO AMIGDALINO	8
2.1.3	NÚCLEO LECHO DE LA ESTRÍA TERMINAL	9
2.2	LA HORMONA LIBERADORA DE CORTICOTROPINA (CRH)	11
2.2.1	PROMOTOR CRH.	15
2.2.2	RECEPTORES DE CRH.	15
2.2.3	RITMO CIRCADIANO DE LA EXPRESIÓN DE CRH.	16
2.2.4	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CRH	17
2.2.4.1	Núcleo Paraventricular del Hipotálamo	17
2.2.4.2	Núcleo Central de la Amígdala	19
2.2.4.3	Núcleo lecho de la estría terminal	20
3	HIPOTESIS	23

3.1	HIPÓTESIS DE TRABAJO	23
3.2	OBJETIVOS GENERALES	23
3.2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	MATERIALES	25
4.1	REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS EN ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DEL ARNm Y PÉPTIDO DE CRH.	25
5	MÉTODOS	27
5.1	MANIPULACIÓN DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	27
5.2	SUPRARRENALECTOMÍA BILATERAL	27
5.2.1	ANESTESIA.	27
5.2.2	EXTRACCIÓN DE LAS GLÁNDULAS SUPRARRENALES	27
5.2.3	GRUPOS EXPERIMENTALES OCUPADOS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPRARRENALECTOMÍA EN LA EXPRESIÓN DEL GEN CRH	28
5.3	ESTRÉS CRÓNICO POR INMOVILIZACIÓN (ECI)	28
5.3.1	GRUPOS EXPERIMENTALES EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO POR INMOVILIZACIÓN EN LA EXPRESIÓN DEL GEN DE CRH.	29
5.3.2	GRUPOS EXPERIMENTALES EN EL ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ANTIDEPRESIVOS EN LA EXPRESIÓN DE CRH	29
5.4	OBTENCIÓN DEL CEREBRO DE RATA	30
5.4.1	FIJACIÓN DEL TEJIDO Y OBTENCIÓN DE CORTES DE CEREBRO PARA ESTUDIAR LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE CRH.	30

5.4.2	FIJACIÓN DEL TEJIDO Y OBTENCIÓN DE CORTES DE CEREBRO PARA ESTUDIAR LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO DE CRH.	30
5.5	MÉTODO DE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> Y DETECCIÓN DE CÉLULAS QUE EXPRESAN ARNm CRH	31
5.5.1	CONSIDERACIONES TÉCNICAS	31
5.5.2	MARCACIÓN DE LAS SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS	32
5.5.3	CONTROL DE LA MARCACIÓN DE LA SONDAS	33
5.5.4	PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	33
5.5.5	DETECCIÓN DE LAS SONDAS MARCADAS	35
5.6	TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	37
5.7	ANÁLISIS DE RESULTADOS	38
5.7.1	CUANTIFICACIÓN DE LA MARCA DE HIBRIDACIÓN NO ISOTÓPICA.	38
5.7.1.1	Número de células que expresan el ARNm de CRH	38
5.7.1.2	Análisis de la intensidad de la marca del ARNm CRH	38
5.7.2	ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE LA MARCA CORRESPONDIENTE A LA INMUNORREACTIVIDAD TIPO CRH.	39
5.8	CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	39
5.8.1	EXPRESIÓN ARNm DE CRH.	39
5.8.2	EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO DE CRH.	40
6	RESULTADOS	41
6.1	PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	41
6.1.1	EFFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE EL PESO CORPORAL	41
6.1.1.1	Efecto de la suprarrenalectomía	41
6.1.1.2	Efecto del estrés crónico por inmovilización	43
6.1.1.3	Efecto del tratamiento con desipramina (DMI)	45

6.1.2	EFFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE EL PESO DE GLÁNDULA SUPRARRENAL	47
6.1.2.1	Efecto del estrés crónico por inmovilización	47
6.1.2.2	Efecto del tratamiento con desipramina (DMI)	47
6.2	HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> (HIS) NO ISOTÓPICA PARA EL ARNm CRH	49
6.2.1	HIS PARA EL ARNm DE CRH.	51
6.2.2	EFFECTO DE LA SUPRARRENALECTOMÍA SOBRE EL NÚMERO DE CÉLULAS QUE EXPRESAN EL ARNm DE CRH EN EL NLETDL.	54
6.2.3	ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DEL EFECTO DE LA SUPRARRENALECTOMÍA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE CRH.	56
6.2.4	EFFECTO DE LA SUPRARRENALECTOMÍA SOBRE LA INTENSIDAD DE LA MARCA DEL ARNm DE CRH EN EL NLETVL.	56
6.2.5	EFFECTO DE LA SUPRARRENALECTOMÍA SOBRE LA INTENSIDAD DE LA MARCA DEL ARNm CRH EN EL PVN.	56
6.3	INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL PÉPTIDO DE CRH.	58
6.3.1	CONTROL DEL ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-CRH.	58
6.3.2	EFFECTO DE LA SUPRARRENALECTOMÍA SOBRE LA EXPRESIÓN DE PÉPTIDO DE CRH.	58
6.3.3	ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DEL EFECTO DE LA SUPRARRENALECTOMÍA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO DE CRH.	60
6.3.3.1	Efecto de la suprarrenalectomía en la expresión péptido CRH	60
6.3.4	EFFECTO DEL ECI SOBRE LA EXPRESIÓN DE PÉPTIDO DE CRH.	62
6.3.5	ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DEL EFECTO DEL ECI EN LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO DE CRH	62
6.3.5.1	Efecto del ECI en la expresión péptido CRH	62
6.3.5.2	Efecto del DMI en la expresión péptido CRH	65
6.3.5.3	Comparación de la inmunorreactividad del péptido de CRH en el PVN en ADX y ECI	65

6.3.6	ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE LA INMUNORRECTIVIDAD DEL PÉPTIDO DE CRH EN LA EMINENCIA MEDIA	68
6.3.6.1	Efecto de la ADX sobre la expresión de péptido de CRH.	68
6.3.6.2	Efecto del ECI sobre la expresión de péptido de CRH.	68
7	DISCUSIÓN	70
7.1	EFFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	70
7.2	CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS	71
7.3	EFFECTO DE LA ADX SOBRE LA EXPRESIÓN DE CRH	73
7.4	EFFECTO DEL ECI SOBRE LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO DE CRH	75
8	CONCLUSIONES	79
9	PROYECCIONES	80
10	BIBLIOGRAFIA	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Respuesta a estrés	7
Figura 2. Ubicación anatómica del núcleo del lecho de la estría terminal	13
Figura 3. Distribución de células que expresan CRH en el cerebro de la rata	14
Figura 4. Sondas oligonucleotídicas utilizadas en la detección del ARNm de CRH en cerebro de rata	36
Figura 5. Efecto de la suprarrenalectomía sobre el peso corporal	42
Figura 6. Efecto del ECI sobre el peso corporal de las ratas	44
Figura 7. Efecto del tratamiento con desipramina sobre el peso corporal de las ratas	46
Figura 8 . Efecto del ECI y del tratamiento con desipramina sobre el peso glándula suprarrenal de las ratas	48
Figura 9. HIS para el ARNm de CRH en el PVN	50
Figura 10. HIS para el ARNm de CRH en NLETdl de ratas suprarrenalectomizadas	52
Figura 11. HIS para el ARNm de CRH en el NLETvl	53
Figura 12. Cuantificación del número de células que expresan el ARNm de CRH. Efecto de la suprarrenalectomía	55
Figura 13. Efecto de la suprarrenalectomía en la intensidad de la marca del ARNm de CRH	57
Figura 14. Efecto de la ADX en la expresión del péptido de CRH	59
Figura 15. Efecto de la suprarrenalectomía en la inmunorreactividad péptido de CRH	61
Figura 16. Efecto del ECI en la inmunorreactividad del péptido CRH	63
Figura 17. Efecto del ECI en la inmunorreactividad del péptido de CRH	64

Figura 18. Efecto de la administración crónica de DMI en la inmunorreactividad del péptido de CRH	66
Figura 19. Comparación del efecto de la ADX v/s ECI en la inmunorreactividad del péptido de CRH	67
Figura 20. Inmunorreactividad del péptido de CRH en la eminencia media (EM)	69

ABREVIATURAS

ADX	Suprarrenalectomía.
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica.
AMPc	Adenosil monofosfato cíclico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero heteronuclear
AVP	Arginina-vasopresina.
C	Control
CRE	Elemento de respuesta a AMPc.
CRH	Hormona liberadora de corticotropina.
CRH-R	Receptor de CRH.
DMI	Desipramina.
EAI	Estrés agudo por inmovilización.
ECI	Estrés crónico por inmovilización.
EM	Eminencia media.
HPA	Eje hipotálamo-pituitaria-suprarrenal.
HIS	Hibridación <i>in situ</i> .
NCeA	Núcleo central de la amígdala.
nGRE	Elemento negativo de respuesta a glucocorticoides
NLET	Núcleo del lecho de la estría terminal.
NLETdl	Subnúcleo dorsal lateral del lecho de la estría terminal.
NLETvl	Subnúcleo ventral lateral del lecho de la estría terminal.
NMeA	Núcleo medial de la amígdala.

1 RESUMEN

La hormona liberador de corticotropina (CRH), es un péptido de 41 aminoácidos que se sintetiza principalmente en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y que juega un papel esencial en la respuesta a estrés, donde CRH inicia la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Suprarrenal (HPA). Además, CRH se expresa en núcleos extra-hipotalámicos, tales como el núcleo central de la amígdala (NCeA) y el núcleo lecho de la estría terminal (NLET). Ambos núcleos han sido involucrados en la regulación del eje HPA durante la respuesta a estrés. Por otra parte, cambios en la expresión de CRH han sido asociados a desórdenes psiquiátricos tales como la depresión melancólica, el estrés post-traumáticos y la adicción. El NLET es una estructura del sistema límbico donde converge información proveniente del hipocampo, el NCeA y de los grupos celulares noradrenérgicos A1 y A2 del bulbo raquídeo, todas estas estructuras han sido involucradas en la regulación de la respuesta a estrés. Además, el NLET proyecta hacia todas las divisiones del PVN, sugiriendo que esta estructura actúa como un centro de integración de información desde circuitos límbicos hacia el PVN. Por otra parte, el sub-núcleos dorsal lateral y ventral lateral NLET contienen neuronas CRHérgicas, y estas neuronas al igual que las de la NCeA son sensibles a los niveles circulantes de corticosterona. El propósito del presente trabajo de tesis es estudiar el efecto de la desregulación del eje HPA sobre la expresión de CRH en los núcleos dorsal lateral y ventral lateral del NLET, el NCeA y el PVN. Con este propósito se utilizaron dos modelos opuestos de desregulación del eje HPA, la ausencia de la glándula suprarrenal y el aumento de actividad de la glándula inducida por estrés crónico por inmovilización (ECI). Los resultados obtenidos muestran que en el NLET y NCeA la suprarrenalectomía bilateral produce una disminución de la expresión de CRH. En cambio, en el PVN se produce un aumento de la expresión de CRH. En contraste, el ECI que va acompañado

de una hipertrofia de la glándula suprarrenal, produce un aumento de la expresión del péptido CRH en el NLET, el NCeA y el PVN. Además, la administración de desipramina durante el periodo de ECI evita el aumento de la expresión de CRH en el NLET y PVN. Los presentes resultados sugieren que los glucocorticoides ejercen un control excitatorio sobre la expresión de CRH en el NLET y el NCeA. En cambio, ejercen un control inhibitorio en el PVN en condiciones normales, y que este control inhibitorio se pierde en condiciones de estrés crónico. En conclusión, los presentes resultados sugieren que en condiciones normales el NLET y el NCeA están regulados por los niveles circulantes de glucocorticoides en una forma opuesta al PVN. En cambio, en condiciones de estrés crónico los niveles circulantes de glucocorticoides pierden su capacidad de ejercer el control de retroalimentación negativa sobre la expresión de CRH en el PVN, pero persiste su control por retroalimentación positiva en el NLET y el NCeA. Finalmente, la evidencia que un antidepresivo, como la desipramina, evite el efecto del estrés crónico sobre la expresión de CRH apoya la hipótesis de que cambios en la expresión de CRH están involucrados en padecimientos psiquiátricos.

1.1 ABSTRACT

The corticotropin releasing hormone (CRH) is a 41 amino acid peptide synthesized in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) that plays an essential role in the stress response. CRH initiates the activation of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis (HPA). CRH is also expressed in extra-hypothalamic nuclei, such as the central nucleus of the amygdala (CeA) and the bed nucleus of stria terminalis (BNST). These nuclei have also been involved in the regulation of the HPA axis during the stress response. Moreover, changes in CRH expression have been associated with psychiatric disorders, such as the melancholic depression, post-traumatic stress and addiction. The BNST is a limbic structure that conveys information from the hippocampus, the amygdala and of the noradrenergic cell groups A1 and A2 of the brainstem, all brain regions that have been implicated in the regulation of the HPA axis during the stress response. Furthermore, the BNST projects to all the subdivisions of the PVN, suggesting that the BNST integrates and relays information from limbic circuits to the PVN. On the other hand, the dorsal lateral and ventral lateral BNST sub-nuclei, and the CeA contain CRHergic neurons that are sensitive to the plasma corticosterone levels. The purpose of the present work is to study the effect of the deregulation of the HPA axis on the CRH expression in the dorsal lateral and ventral lateral sub nuclei of the BNST, the CeA and the PVN. For this purpose, two opposite models of deregulation of the HPA axis were used, the absence of the adrenal gland produced by the bilateral adrenalectomy (ADX), and the increase in the adrenal gland activity induced by chronic immobilization stress (CIS). The present results show that ADX significantly decreases CRH expression in the BNST and the CeA. In contrast, ADX increases CRH expression in the PVN. In addition, the hypertrophy of the adrenal gland induced by CIS also significantly increases CRH expression in the BNST, the CeA and the PVN. Moreover, the administration of

desipramine during the period of CIS prevents the CIS-induced increase in CRH expression in the BNST and the PVN. The present results suggest that glucocorticoids exert an excitatory control over the expression of CRH in the BNST and the CeA, in both normal and chronic stress conditions. In contrast, glucocorticoids exert an inhibitory control over the expression of CRH in the PVN in normal conditions. This inhibitory control is lost during chronic stress. In conclusion, the present results suggest that in normal conditions the BNST and the CeA are regulated by the glucocorticoid plasma levels in an opposite manner compared to the PVN. Instead, in chronic stress conditions glucocorticoid plasma levels fail to exert its negative feedback control over CRH expression in the PVN, however glucocorticoids maintain their positive feedback control over CRH expression in the BNST and the CeA. Furthermore, the present evidence shows that the antidepressant desipramine, prevents the effect of chronic stress over the CRH expression giving support to the hypothesis that changes in the CRH expression are involved in psychiatric disorders.

2 INTRODUCCIÓN

La estabilidad del medio interno de un organismo es el resultado de un complejo equilibrio que cambia constantemente en respuesta a estímulos externos de naturaleza física o psicológica. El conjunto de fenómenos de autorregulación que mantienen el equilibrio del medio interno se denominan homeostasis. Los estímulos externos que demandan cambios del medio interno reciben el nombre de estímulos estresantes, los cuales son percibidos por el organismo como una amenaza a la homeostasis. Para preservar el equilibrio del medio interno, el organismo responde a estos cambios mediante respuestas fisiológicas y conductuales que forman parte de los mecanismos de adaptación. Por lo tanto, la respuesta a estrés (figura 1) forma parte de los mecanismos de adaptación (Akil y Morano, 1995; Chrousos y Gold, 1992). No todos los estímulos estresantes son nocivos para el organismo; cambios controlables pueden ser percibidos como estímulos positivos para el desarrollo intelectual y emocional, mientras que estímulos más intensos, persistentes e incontrolables, pueden generar una mala respuesta adaptativa (Tafet y Bernardini, 2003). Los principales componentes de la respuesta adaptativa a estrés son:

- A) El sistema Simpático–Adrenérgico-Noradrenérgico (SAN), involucra la biosíntesis y secreción de adrenalina desde la médula suprarrenal que está regulada por la división simpática del sistema nervioso autónomo, y la activación del sistema noradrenérgico del locus coeruleus que aumenta el estado de alerta (Chrousos y cols, 1998).
- B) El sistema límbico Hipotálamo–Pituitaria–Suprarrenal (HPA). La respuesta adaptativa a estrés involucra también al sistema límbico. El sistema límbico corresponde a estructuras del cerebro que establecen interacciones estrechas entre la actividad hipotalámica y el

procesamiento de la información cortical, el cual está involucrado en las emociones, el aprendizaje y la regulación autonómica (Swanson y Elliot, 2001), por lo cual se introdujo el término eje límbico-HPA. Las estructuras límbicas que han sido involucradas en la respuesta a estrés son los núcleos central y medial de la amígdala, el hipocampo y núcleo del lecho de la estría terminal (Herman, 1992; Chrousos y Gold, 1992). Estas estructuras límbicas regulan el eje HPA a través de diferentes circuitos neuronales sensibles al estrés, que integran dicha información y la envían al núcleo paraventricular del hipotálamo (Chrousos y Gold, 1992; Dunn y Berridge, 1990). Las neuronas de la región parvo celular medial del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), son las responsables de la síntesis de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual es secretada a la circulación portal desde la eminencia media (EM) y es transportada en la sangre para ejercer su efecto sobre células adrenocorticotropas de la pituitaria anterior, estimulando la secreción de la hormona adenocorticotropica (ACTH). La ACTH induce la secreción de glucocorticoides desde la corteza suprarrenal durante la respuesta a estrés (Whitnall, 1993). El aumento de la secreción de glucocorticoides desde la corteza suprarrenal, producido por la activación del eje HPA es la principal salida de este eje que permite responder a cambios físicos y/o psicológicos.

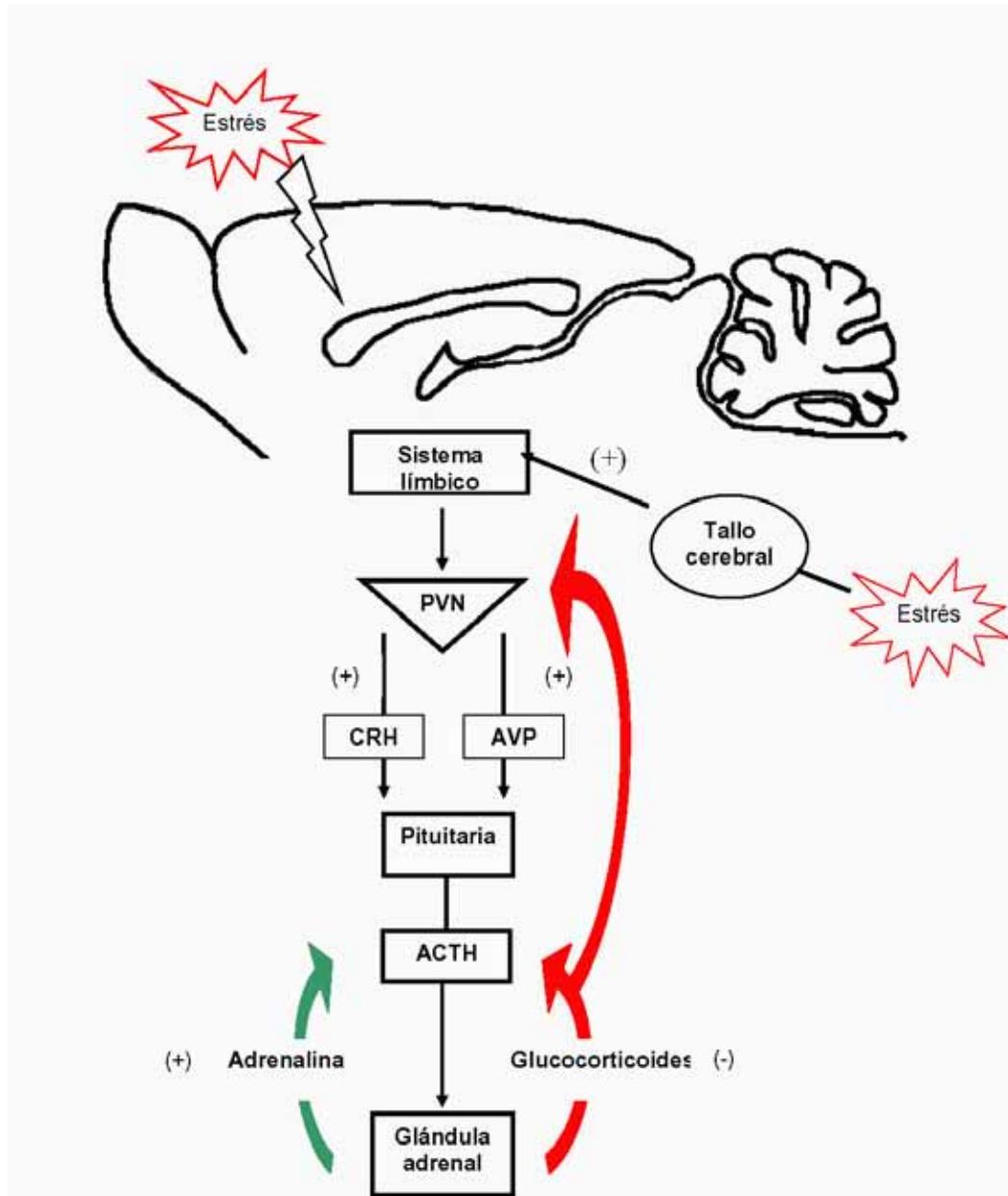


Figura 1. Respuesta a estrés. Los estímulos estresantes aumentan la síntesis de CRH en las neuronas del PVN y su liberación desde los terminales nerviosos que se localizan en la EM. CRH es liberado al sistema portal hipofisario y transportado por el torrente circulatorio a la pituitaria anterior, estimulando la síntesis y liberación de ACTH. La ACTH es secretada al torrente circulatorio y actúa en la corteza adrenal donde estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides, los cuales ejercen retroalimentación negativa sobre el PVN y la pituitaria.

2.1 Papel del sistema límbico en la regulación del eje HPA

2.1.1 Hipocampo

El hipocampo ha sido propuesto como el principal control inhibitorio de la actividad del eje HPA, controla la secreción basal y circadiana de glucocorticoides, además de la iniciación y terminación de la respuesta a estrés (Jacobson y Sapolsky, 1991; Herman y Cullinan, 1997). Aun cuando, el hipocampo juega un papel importante en la regulación de la actividad del eje HPA, los estudios neuroanatómicos usando marcaje retrógrado muestran que el hipocampo carece de proyecciones directas al PVN. En cambio, se ha mostrado que el hipocampo ejerce su efecto inhibitorio sobre el PVN a través de las proyecciones del núcleo subiculum ventral hacia diferentes subnúcleos del lecho de la estría terminal y de otros núcleos hipotalámicos (Cullinan y cols, 1993). Por otro lado, se ha descrito que las proyecciones del subiculum ventral son de naturaleza glutamatérgica por lo tanto excitatoria (Walaas y Fonnum, 1980). Además, se ha mostrado que una alta proporción de las neuronas que proyectan desde el núcleo lecho de la estría terminal (NLET) al PVN son de naturaleza GABAérgica, sugiriendo que el NLET participa en la transformación de la influencia excitatoria del hipocampo en una influencia inhibitoria sobre el PVN (Cullinan y cols, 1993).

2.1.2 Complejo Amigdalino

A diferencia del hipocampo, el complejo amigdalino ha sido involucrado principalmente en el control excitatorio de la actividad del eje HPA, de hecho la aplicación de estímulos eléctricos en los núcleos basolateral (NBLA), medial (NMeA) de la amígdala, induce un incremento de los niveles plasmáticos circulantes de corticosterona (Dunn y Whitener, 1986;

Feldman y Weidenfeld, 1998; Herman y cols, 1994). En cambio, el núcleo central de la amígdala (NCeA) ha sido involucrado tanto en el control inhibitorio como excitatorio del eje HPA. Algunos trabajos han mostrado que la estimulación eléctrica de los núcleos central, lateral y basolateral de la amígdala inducen una disminución sostenida de los niveles plasmáticos de corticosterona (Dunn y Whitner, 1986). Por otra parte, también se ha descrito que la estimulación eléctrica de NCeA induce el incremento de los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona, y disminuye el contenido de CRH en la eminencia media (Felman y Wiendfeld, 2004).

Los núcleos central y medial de la amígdala carecen de proyecciones directas al PVN (Herman y cols, 1994; Prewit y Herman, 1997 y 1998). Esta evidencia ha llevado a proponer que el NMeA ejerce su efecto excitatorio sobre el PVN a través del NLET y otros núcleos hipotalámicos. En cambio, la NCeA lo hace a través de circuitos multisinápticos que incluyen al NLET (Prewit y Herman, 1997 y 1998).

2.1.3 Núcleo lecho de la estría Terminal

El NLET es una estructura límbica del cerebro anterior (Figura 2), que limita dorsalmente con núcleo septal lateral, ventralmente con el área preóptica del hipotálamo, y que rodea la comisura anterior (Dong y cols, 2001).

El NLET fue inicialmente dividido en medial y lateral, basándose en las aferencias amigdalinas que proyectan al NLET (De Olmos y cols, 1985; Weller y Smith, 1982). Por otra parte, el NLET ha sido dividido en anterior y posterior, basándose en su citoarquitectura (Ju y Swanson, 1989). Además, la subdivisión anterior del NLET ha sido subdividida en dorsal y ventral (Ju y Swanson, 1989). En la división anterior del NLET se encuentran los subnúcleos dorsal lateral (NLETdl) y ventral lateral (NLETvl). Esta subdivisión lateral anterior del NLET

está extensamente conectada con áreas cerebrales que participan control de la respuesta autonómica, neuroendocrina y de las conductas alimenticias en respuesta al estrés (Loewky y McKellar, 1980; Dong y cols, 2001).

El NLET recibe aferencias glutamatérgicas desde el subiculum ventral del hipocampo, serotoninérgicas del núcleo del rafé dorsal y dopaminérgica del área tegmental ventral (Sofroniew, 1983). También, recibe importantes proyecciones catecolaminérgicas provenientes del tallo cerebral principalmente de naturaleza noradrenérgica desde los grupos celulares noradrenérgicos A1 y A2, y en menor medida del locus coeruleus, la cual converge en el NLET ventral (Phelix y cols, 1992; Forray y cols, 2000). De hecho, el NLET es la estructura del cerebro que contiene la mayor concentración de noradrenalina (Brownstein y Palkovits, 1984; Roder y Ciriello, 1994).

El NLET se encuentra estrechamente relacionado con el complejo amigdalino, se ha propuesto que el NLET es el principal campo de proyección de la amígdala. De hecho, se considera que el NLET forma parte de la amígdala extendida (De olmos y cols, 1985). Las aferencias amigdalinas llegan al NLET a través de la estría terminal y de la vía amigdalofugal ventral (Watson y cols, 1983). Algunos núcleos amigdalinos como la amígdala medial proyectan a todo el NLET, en cambio otras regiones de la amígdala proyectan a zonas más discretas del NLET, por ejemplo la amígdala central (NCeA) proyecta principalmente a la subdivisión anterior lateral del NLET (Weller y Smith 1982; Watson y cols, 1983; Prewit y Herman, 1997 y 1998).

Por otra parte, el NLET proyecta en forma homogénea a las distintas subdivisiones del PVN (Mulders, y cols, 1997). Se ha postulado que las proyecciones del NLET al PVN son sensibles a los glucocorticoides. Esta proposición se sustenta en el hecho que la suprarrenalectomía (ADX) disminuye significativamente las proyecciones del NLET hacia la

subdivisión parvo celular medial del PVN ((mpPVN: Mulders, y cols, 1997). Durante los últimos años, el NLET ha sido particularmente estudiado por su papel en la regulación del eje HPA durante el estrés, postulándose que esta información es integrada en el NLET y es enviada al PVN (Forray y Gysling, 2004).

2.2 La Hormona liberadora de corticotropina (CRH)

CRH es un neuropéptido de 41 aminoácidos que actúa de mediador de la respuesta endocrina, autonómica e inmune frente al estrés, a través de aumentar la síntesis y secreción de glucocorticoides desde la glándula suprarrenal, en repuestas a cambios fisiológicos y ambientales (Vale y cols, 1981). Los glucocorticoides inhiben la síntesis de CRH en el PVN y de la ACTH en la pituitaria, asegurándose que los niveles plasmáticos de glucocorticoides son los adecuados frente a una situación de estrés experimentada (Suda y cols, 1984; Dallman y cols, 1992). CRH es sintetizado principalmente en neuronas de la subdivisión mpPVN, se ha mostrado en estas neuronas colocación con otros neuropeptidos (Watts, 1996), seis diferentes péptidos han sido descritos en las neuronas mpPVN: arginina-vasopresina (AVP), colicistoquinina (CCK), encefalinas (ENK), neurotensina, angiotensina II (Bertini y Kiss, 1991; Watts, 1996). Mas aun, las neuronas magnocelulares del PVN en algunas circunstancias coexpresan CRH con AVP u oxitocina (Watts, 1996).

Neuronas extrahipotalámicas que expresan CRH han sido descritas en el NCeA, en el NLET, en el núcleo parabraquial, en el hipocampo, en el núcleo accumbens y en el cerebelo, entre otras (Smagin y cols, 2001). La ubicación neuroanatómica de las células que expresan CRH en el cerebro se muestran en la figura 3.

La CRH se encuentra ampliamente conservada en los mamíferos y es generada por un corte en el extremo carboxilo del pre-proCRH (Vale, 1997). El CRH de origen humano (h/CRH) y rata tiene un 100% de homología; pero difieren con el CRH ovino en 7 aminoácidos. La CRH ha sido secuenciada en muchas especies y es considerada como parte de una familia de péptidos que incluyen a la urotensina (peces), sauvagina (batracios), urocortina I, II y III en mamíferos (Dautzenberg y Hauger, 2002).

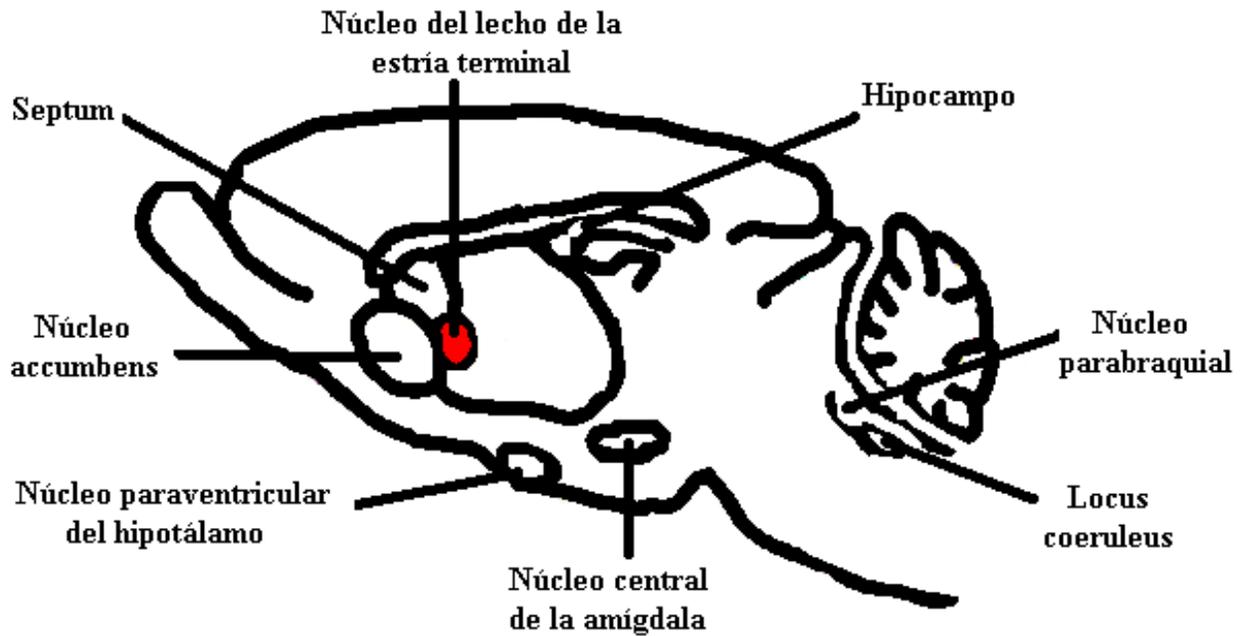


Figura 2. Ubicación anatómica del núcleo del lecho de la estría terminal. Esquema que ilustra la ubicación del núcleo del lecho de la estría terminal en un corte sagital de cerebro de rata adulta. Adaptación de Cooper, Bloom y Roth (1986).

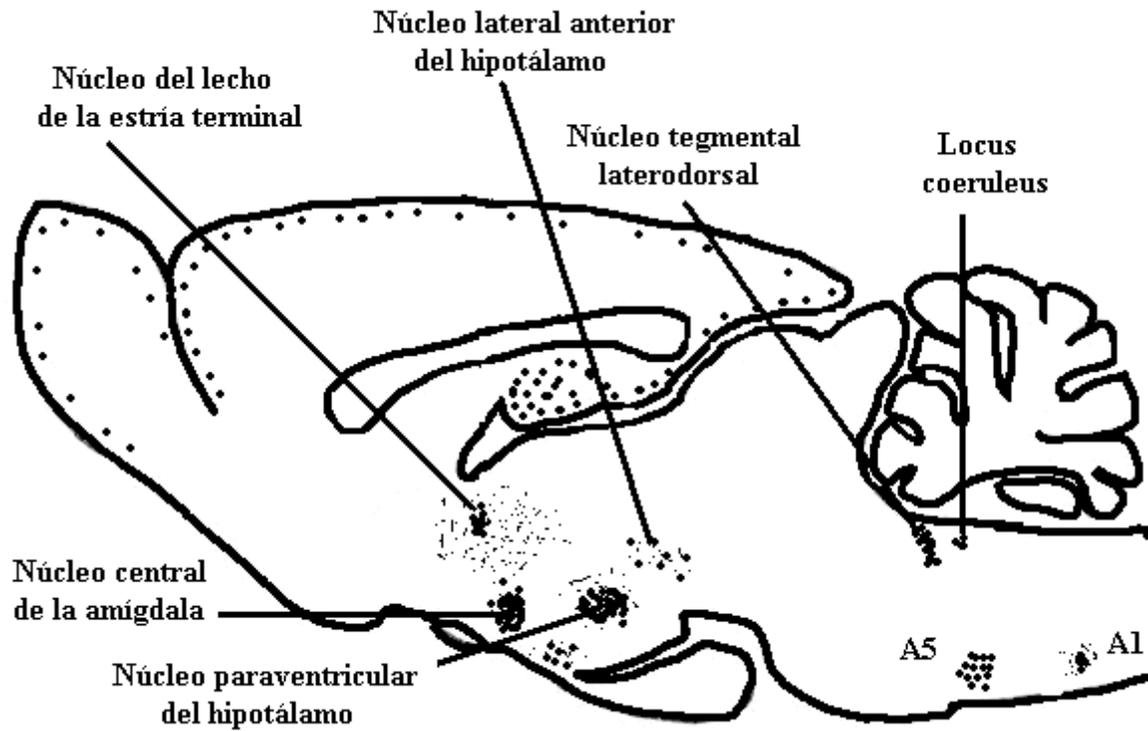


Figura 3. Distribución de células que expresan CRH en el cerebro de la rata. Esquema ilustrativo de las regiones del cerebro de la rata donde se localizan las neuronas que expresan CRH. Adaptación de Smagin y cols (2001). A1 y A5 grupos celulares noradrenérgicos del tallo cerebral.

2.2.1 Promotor CRH.

La comparación de la secuencia nucleotídica del extremo 5' del gen muestra un alto grado de similitud entre especies, particularmente en la región proximal del promotor. Estudios concernientes a las propiedades regulatorias del gen de la CRH en humanos y en ratas, muestran sitios de regulación por glucocorticoides los sitios GRE y nGRE, por AMPc los sitios CRE y los sitios AP1 (Burbach, 2002; King y cols, 2002).

2.2.2 Receptores de CRH.

La acción de la CRH es mediada a través de receptores con siete dominios transmembrana; estos receptores están acoplados a proteína Gs, se han descrito dos tipos de receptores los CRH-R1 y los CRH-R2, los cuales son productos de distintos genes, mientras que CRH-R1 existe en una sola forma funcional (CRH-R1 α), en el caso de los receptores CRH-R2 existen tres tipos funcionales, los cuales son productos de procesamiento alternativo del ARNm (CRH-R2 α , CRH-R2 β y CRH-R2 γ). Los receptores de CRH exhiben una alta homología de secuencia de aminoácidos, pero tienen perfiles farmacológicos distintos. Se ha demostrado a través de diferentes aproximaciones experimentales que la activación de los receptores CRH-R1 inducen respuestas conductuales de ansiedad, en cambio la activación de los receptores CRH-R2 produce disminución en las conductas de ansiedad, sugiriendo que la CRH tiene actividad ansiogénica mediada por receptores CRH-R1 y ansiolítica mediada por los receptores CRH-R2 (Chalmers y cols, 1995 y 1996; Arborelius y cols 1999). El ARNm del receptor CRH-R1 se expresa en una alta densidad en la pituitaria anterior y en áreas del cerebro como la corteza

cerebral, cerebelo, amígdala, hipocampo y bulbo olfatorio, además de otras regiones donde se expresa en una menor densidad (Smagin y cols, 2001; Dautzenberg y Hauger, 2002; Makino y cols, 2002).

El receptor CRH-R2 α ha sido descrito en el septum lateral, núcleo ventral medial del hipotálamo y diversos núcleos del complejo amigdaloides, por el contrario el CRH-R2 α no ha sido detectado en la neocorteza y cerebelo, a diferencia de los altos niveles encontrados en estas estructuras de CRH-R1. Similarmente, la expresión CRH-R2 β es casi indetectable en la pituitaria en donde la expresión de CRH-R1 es alta (Chang y cols, 1993; Lovenberg y cols, 1995). La expresión de la variante CRH-R2 γ ha sido descrita en el complejo amigdalino de humanos (Kostich y cols, 1998). Además, el ARNm del receptor CRH-R2 se expresa ampliamente en tejidos periféricos, particularmente cardiomiocitos, tracto gastrointestinal, pulmón, ovario y músculo esquelético (Lovenberg y cols, 1995; Grigoriadis y cols, 1996).

Referente al papel fisiológico de los receptores a CRH, se ha sugerido que el receptor CRH-1 es el responsable del inicio de la respuesta a estrés y que está involucrado en los aspectos cognitivos de la conducta; incluyendo emociones, aprendizaje, memoria y funciones ejecutoras. El CRH-2 estaría involucrado en los procesos de sobrevivencia, incluyendo alimentación y reproducción, además, estaría jugando un importante rol en la manutención y terminación de la respuesta a estrés (Coste y cols, 2001; Smagin y cols, 2001).

2.2.3 Ritmo circadiano de la expresión de CRH.

Estudios de la expresión del ARNm de CRH han mostrado la existencia de fluctuaciones durante el transcurso del día, observándose niveles máximos de ARNm CRH

alrededor de la mitad del ciclo de luz y niveles mínimos en la mitad del ciclo de oscuridad (Watts, 1996). Por otra parte, los niveles plasmáticos de corticosterona en ratas muestran niveles prácticamente indetectables durante las primeras horas de luz, llegando a su máximo al término del ciclo de luz.

2.2.4 Regulación de la expresión de CRH

2.2.4.1 Núcleo Paraventricular del Hipotálamo

Diversos estudios reportados en la literatura, han mostrado que la activación del eje HPA inducida por estrés, se inicia con la liberación de CRH desde la EM, seguida de la consecuente secreción de ACTH desde la pituitaria anterior y glucocorticoides desde la corteza suprarrenal (Rivier y cols, 1982; Rivier y Plotsky, 1986). Por otra parte, la respuesta a estrés finaliza cuando los glucocorticoides ejercen retroalimentación negativa en el PVN disminuyendo la secreción de CRH. La suprarrenalectomía bilateral (ADX) es uno de los modelos utilizados para estudiar los mecanismos de regulación que ejercen los glucocorticoides sobre el PVN y la pituitaria. La ADX induce un aumento de la expresión del ARNm de CRH en el PVN y de los niveles circulantes de ACTH, sugiriendo que los glucocorticoides ejercen una regulación inhibitoria sobre la expresión de CRH en el PVN y sobre la secreción de ACTH desde la pituitaria (Imaki y cols, 1991; Young y cols, 1986; Tanimura y cols, 1998; Tanimura y Watts, 2000). En cambio, la ADX acompañada de terapia de reemplazo con glucocorticoides muestra una disminución de la expresión del ARNm de CRH en el PVN, que es dependiente de los niveles circulantes de glucocorticoides que se alcanzan con dichas terapias (Akana y cols, 1988; Imaki y cols, 1991; Swanson y Simmons, 1989; Tanimura y Watts, 1998). Por otra parte, se ha

mostrado que el sistema CRHérgico del PVN responde en forma diferencial frente a los glucocorticoides. En los animales ADX que reciben terapias de reemplazo con dosis elevadas de glucocorticoides (< 60 -130 ng /ml), se observa un aumento en la expresión del ARNm de CRH en las neuronas de la región magnocelular del PVN, la cual corresponde al componente autonómico, y una disminución en las neuronas de la región parvocelular medial del PVN la cual forma parte del componente neuroendocrino (Swanson y Simmons, 1989).

La administración intracerebroventricular de CRH produce cambios fisiológicos, conductuales y autonómicos muy similares a los observados en ratas estresadas (Owens y Nemeroff, 1991). En este sentido, se ha descrito que en los animales sometidos estrés crónico (7 días) inducido por descarga eléctrica en la pata (sesiones 30 minutos, 2 veces al día) y sacrificados 24 horas después de la última sesión se observa un aumento en la expresión del ARNm CRH en el PVN. En cambio, no se observan diferencias en la expresión del ARNm de CRH en los animales sometidos a estrés agudo por descarga eléctrica en la pata (Imaki y cols, 1991). Referente al efecto del estrés inducido por inmovilización, se ha descrito que los animales sometidos el estrés agudo por inmovilización (2 hrs.) y sacrificados inmediatamente después de la sesión de estrés, muestran un aumento significativo en la expresión del ARNm de CRH en el PVN tanto en animales ADX tratados con corticosterona como en animales con operación simulada (sham). Además, el estrés crónico por inmovilización (2 hrs. diarias durante 14 días) induce un aumento significativo en la expresión del ARNm CRH en el PVN tanto en animales ADX tratados con corticosterona como en animales sometidos a operación simulada comparado con animales no sometidos a estrés (Makino y cols, 1995 y 2002).

Finalmente, se ha mostrado que el estrés inducido por hipovolemia (Tanimura y Watts, 1998 y 2000; Tanimura y cols, 1998) produce un aumento sostenido de la síntesis ACTH en la

pituitaria y un aumento del número de células que expresan el ARNm de CRH en el PVN en los animales control intacto. En cambio, en las ratas ADX hipovolémicas se observa una disminución de la expresión del ARNm de CRH, efecto que se revierte con la terapia de reemplazo con glucocorticoides.

2.2.4.2 Núcleo Central de la Amígdala

Makino y cols. (1994), han demostrado que los glucocorticoides tienen un control excitatorio sobre la expresión del ARNm de CRH en la NCeA. El tratamiento crónico con glucocorticoides en dosis altas (200 mg pellet subcutáneo/14 días) produce niveles circulantes de corticosterona de 170 ng/ml equivalentes a los que se obtienen en respuesta al estrés y aumentan la expresión del ARNm de CRH en NCeA. Los estudios anteriores condujeron a estudiar el efecto de la ADX en la expresión de CRH en NCeA, observándose que las ratas ADX no muestran cambios en la expresión del ARNm de CRH. Sin embargo, en los animales ADX la terapia de reemplazo con glucocorticoides aumenta la expresión del ARNm de CRH (Makino y cols, 1994; Watts y Sánchez-Watts, 1995). Además, la administración de aldosterona durante 9 días seguido de la administración de corticosterona durante los siguientes 8 días potencia el aumento de la expresión del ARNm de CRH en la NCeA. (Watts y Sánchez-Watts, 1995). Estas evidencias sugieren que la expresión de CRH en la NCeA es sensible a los niveles circulantes de glucocorticoides.

Referente al efecto del estrés, estudios realizados en animales sometidos a estrés agudo por inmovilización muestran un aumento en la expresión del ARNm de CRH en la NCeA una hora después de la inmovilización (Hsu y cols 1998).

2.2.4.3 Núcleo lecho de la estría terminal

El NLET posee dos poblaciones neuronales que expresan CRH, localizados en los sub-núcleos NLETdl y NLETvl, respectivamente (Phelix y Paull, 1990; Moga y Saper, 1994). Además, presenta una alta densidad de terminales que contienen CRH, siendo ésta mayor en el NLETvl que en el NLETdl (Phelix y Shaper, 1994). Por otra parte, se ha descrito que los terminales del NLET que expresan CRH se originan en la NCeA, y que una parte importante de dichos terminales co-expresan GABA (Sakanaka y cols, 1986). El PVN recibe aferencias directas provenientes del NLETvl, entre las cuales están las aferencias CRHérgicas (Moga y cols, 1994).

Estudios neuroanatómicos muestran que los terminales dopaminérgicos que llegan al NLETdl y los terminales noradrenérgicos que llegan al NLETvl establecen sinapsis con dendritas y somas de las neuronas que expresan CRH en dichos sub-núcleos (Phelix y cols, 1992, 1993, 1994).

Las células del subnúcleo del NLETdl que expresan CRH son sensibles a los niveles circulantes de glucocorticoides. La administración crónica de corticosterona aumenta la expresión del ARNm de CRH (Makino y cols, 1994). En cambio, en el NLETvl se observa un aumento de la expresión del ARNm de CRH solamente durante el tratamiento crónico con niveles altos de corticosterona (Makino y cols, 1994; Watts y Sánchez-Watts, 1995). Por otra parte, la ADX que produce niveles circulantes indetectables de glucocorticoides no alteran significativamente la expresión del ARNm de CRH en el NLETdl y el NLETvl (Makino y cols, 1994; Watts y Sánchez-Watts, 1995).

Finalmente, estudios realizados lesionando diferentes regiones del NLET, sugieren que este núcleo participa en la regulación tanto excitatoria como inhibitoria del eje HPA. Lesiones del NLET lateral producen una disminución de la secreción de glucocorticoides y CRH inducidos por

estrés (Gray y cols, 1993). Además, la lesión de la región anterolateral del NLET disminuye la expresión de CRH en el PVN, en cambio la lesión de la región posterior intermedia del NLET produce un aumento en la expresión del ARNm de CRH en el PVN (Herman y cols, 1994).

El conjunto de evidencias mencionadas en los párrafos anteriores, sugieren que el sistema CRHérgico del NLET y de la NCeA participan en la regulación de eje HPA y son sensibles a las concentraciones circulantes de corticosterona. Por otra parte, CRH ha sido involucrado en trastornos del ánimo tales como la depresión melancólica y el estrés postraumático (Koob, 1999; Kasckow y cols, 2002). De hecho, los pacientes con depresión melancólica muestran niveles elevados de CRH y noradrenalina en el líquido cefalorraquídeo (Wong y cols, 2000). Estudios recientes, muestran que la administración crónica de antidepresivos inhibidores de la recaptación tanto de serotonina como de noradrenalina, disminuyen la expresión del ARNm de CRH en el PVN en ratas sometidas a estrés agudo por inmovilización y a estrés crónico variable, comparado con sus respectivos control salino. Sin embargo, los animales sometidos el estrés crónico variable tratados con antidepresivos no muestran una disminución de la concentración de CRH en la EM, comparados con sus respectivos animales control tratados con salino, los autores sugieren que los antidepresivos no modifican la síntesis de CRH en el PVN, pero atenúan la respuesta de estas neuronas al estrés (Stout y cols, 2000). Se propuesto que los antidepresivos actúan a través de factores de transcripción que regulan el elemento de respuesta a cAMP (CRE). En este sentido, Conti y cols. (2004) estudiaron el efecto del represor temprano inducible de cAMP (ICER), factor de transcripción pertenece a la familia de moduladores de CRE (CREM), y mostraron que el tratamiento sub-crónico y crónico con desipramina aumenta la expresión del ARNm de ICER en el PVN. Estudiaron además, el efecto de ICER en la expresión del ARNm de CRH en el PVN de

ratones silvestres y deficientes del gen ICER, los resultados muestran que el tratamiento con desipramina inhibe el aumento de la expresión de CRH inducida por estrés en los animales silvestres comparado con los animales deficientes en ICER, sugiriendo que desipramina disminuye la expresión del ARNm de CRH a través de inducir la expresión de ICER (conti y cols., 2004). En este contexto, el presente trabajo de tesis se plantea estudiar los cambios en la expresión de CRH en el NLET, NCeA y el PVN, en dos modelos opuestos de desregulación del eje HPA, la ADX y el estrés crónico por inmovilización (ECI). Además, se propone evaluar el efecto de la administración de desipramina (DMI) sobre la inmunorreactividad CRH en el modelo de ECI.

3 HIPOTESIS

3.1 Hipótesis de trabajo

La desregulación del eje HPA inducida por la ausencia o por el aumento de actividad de la corteza suprarrenal produce cambios diferenciales en la expresión del ARNm y del péptido de CRH, en los núcleos NLETdl y NLETvl. Para evaluar esta hipótesis se utilizaron como modelos opuestos de desregulación del eje HPA.

- La suprarrenalectomía bilateral
- Estrés crónico por inmovilización.

3.2 Objetivos generales

Estudiar en dos modelos opuestos de desregulación del eje HPA la expresión de:

- El ARNm CRH en el NLET y el PVN por hibridación *in situ*- no isotópica.
- El péptido de CRH en el NLET, el PVN y la NCeA por inmunohistoquímica.

3.2.1 Objetivos específicos

Estudiar en ratas macho adultas la expresión del ARNm CRH en el NLET dorsal lateral y ventral lateral, y en el PVN, en animales sacrificados 28 días después de la ADX y sus respectivos controles “Sham”, así como animales intactos.

Estudiar en ratas macho adultas la expresión del péptido de CRH en el NLET dorsal lateral y ventral lateral, el NCeA y el PVN:

- Animales sacrificados 28 días después de suprarrenalectomía y sus respectivos controles “Sham”, así como animales intactos.

- Animales sacrificados 24 h después de la última sesión de estrés por inmovilización, ya sea crónico (15 días) o agudo (1 sesión), y sus respectivos controles no sometidos a estrés.
- Animales tratados con desipramina durante los 15 días que fueron sometidos a inmovilización y sus respectivos controles. Los animales fueron sacrificados 24 h después de la última sesión de tratamiento.

4 MATERIALES

4.1 Reactivos y equipos utilizados en estudios de expresión del ARNm y péptido de CRH.

Los reactivos utilizados en estos estudios fueron adquiridos en:

- Aventis Pastuer S.A: Clorhidrato de ketamina/ clorhidrato de xilazina.
- Dr. Esteban Rodríguez (Instituto de Histología, Universidad Austral de Chile): Obsequió gentilmente el anticuerpo policlonal anti-CRH hecho en conejo.
- Electrón Microscopy Science: Medio de montaje Eukitt.
- Farmacéutica Santiago S.A: H₂O₂, povidona yodada.
- GIBCO BRL: dATP, ARNt, Kit NBT-BCIP, suero fetal bovino (FBS), tampón TdT; oligonucleótidos sintéticos, complementarios a dos diferentes regiones del ARNm CRH.
- GraphPad Prism 2.3: Programa estadístico.
- Harvard Apparatus: Conos plásticos para inmovilizar roedores.
- Invitrogen: Tris base.
- Island Spinning Co: Suturas quirúrgicas
- Kruuse: Ganchos y cuchillas quirúrgicas.
- Laboratorio Sanderson S.A: Cloruro de sodio 0.9% estéril.
- Laboratorios Andromaco: Bacitracina/neomicina (povos dérmicos).
- Laboratorios Vector: Kit ABC Vectastain Elite, anticuerpo anti-conejo conjugado con biotina hecho en cabra.
- Leica: Críostato modelo 1510.
- Media Cybernetics: Programa Image- Pro Plus, para análisis de imágenes.

- Merck: Hidrato de cloral, gelatina, azida de sodio.
- Merck: Hidrato de cloral, LiCl, gelatina, azida de sodio, etanol absoluto.
- Nikon, INC: Microscopio de luz Labophot.
- Olympus, INC: Microscopio de luz BX51, cámara digital C-3030.
- Roche: DIG-11-dUTP, anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina hecho en oveja, transferasa terminal, tampón TdT, CoCl_2 , dATP.
- Sigma: Paraformaldehído, sarcosil, EDTA, Tritón X-100, diaminobencidina (DAB), suero normal de cabra (GNS), albúmina bovina (BSA), carregenina tipo IV, ácido pícrico, desipramina .
- Silo Scientific Co: Programa de análisis de imágenes UN-SCAN-IT
- Technical Products Internacional: Vibrátomo 3000.
- Winkler Ltda.: NaH_2PO_4 (PBS), NaCl, dietilpirocarbonato (DEPC), solución de Denhart, DTT, formamida, MgCl_2 , sacarosa, Tris ácido.

5 MÉTODOS

5.1 Manipulación de animales de experimentación

Los animales utilizados en todos los experimentos corresponden a ratas de la cepa Sprague–Dawley, proveniente del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los animales se mantuvieron con alimentación y agua a libre disposición (ad libitum); a temperatura controlada dentro de un rango de 20-25° C y sometidas a ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

5.2 Suprarrenalectomía bilateral

5.2.1 Anestesia.

Se utilizaron ratas macho Sprague–Dawley (180-200g), las cuales fueron sometidas a extirpación bilateral de la glándula suprarrenal (ADX) o a operación simulada (Sham). Para realizar la ADX las ratas fueron anestesiadas con una solución de clorhidrato de ketamina (50 mg/Kg.) mas clorhidrato de xilazina (10 mg/Kg.), por vía intraperitoneal (i.p.).

5.2.2 Extracción de las glándulas suprarrenales

Una vez anestesiadas las ratas, se rasuró la zona a intervenir; luego se realizó una incisión única en la región central del dorso del animal, desinfectando la zona a operar con H₂O₂ y povidona yodada. A través de esta incisión se realizaron dos pequeños cortes de 1 cm. aproximadamente, a cada lado del dorso del animal, para ubicar las glándulas suprarrenales, una vez ubicadas se procedió a extirparlas en forma rápida y completa, evitando dejar remanente.

Luego se procedió a ligar los planos musculares con suturas biodegradables y la aplicación de antibióticos bacitracina/neomicina (povos dérmicos), posteriormente se procedió a unir la piel con ganchos quirúrgicos, Como control se usaron ratas con operación simulada (Sham), que fueron sometidas al mismo procedimiento sin realizar la extirpación de las suprarrenales. Veintiocho días después de la operación se extrajo el cerebro. Durante el período de manutención, las ratas tienen acceso libre a alimento y agua; en el caso de las ratas ADX, el agua se reemplazó por solución salina 0.9%.

5.2.3 Grupos experimentales ocupados en el estudio del efecto de la suprarrenalectomía en la expresión del gen CRH

- Ratas control: Ratas macho cuyo peso fluctúa entre 250-400 g.
- Ratas suprarrenalectomizadas: Ratas macho con 28 días de suprarrenalectomía (ADX 28), cuyo peso fluctúa entre 220-320g.
- Ratas “Sham”: Ratas macho con 28 días de operación simulada de la extirpación de las glándulas suprarrenales, cuyo peso fluctúa 280-400g.

5.3 Estrés crónico por inmovilización (ECI)

Se utilizaron ratas macho Sprague–Dawley (240-260 g), para el protocolo de estrés crónico por inmovilización, según protocolo descrito en la literatura (Vyas y cols, 2002), con algunas modificaciones. Ratas macho (240-250g), asignadas de modo aleatorio al grupo experimental, fueron sometidas durante 15 días consecutivos, 2 horas diarias (10-12 A.M) a una restricción completa de movimientos del cuerpo en conos de plástico para inmovilizar ratas. Las

ratas estresadas crónicamente fueron aisladas del grupo control. Las ratas macho asignadas de modo aleatorio al grupo control no fueron sometidas a estrés por inmovilización.

5.3.1 Grupos experimentales en el estudio del efecto del estrés crónico por inmovilización en la expresión del gen de CRH.

- Ratas estresadas: Ratas macho cuyo peso fluctúa entre 270-280g, fueron sacrificadas 24 horas después de la última sesión de estrés crónico por inmovilización.
- Ratas control: Ratas macho cuyo peso fluctúa entre 310-320 g, fueron sacrificadas 24 horas después de los 15 días de haber sido trasladadas a la sala de manutención.

5.3.2 Grupos experimentales en el estudio de la administración crónica de antidepresivos en la expresión de CRH

- Ratas estresadas + salino: Ratas macho cuyo peso fluctúa entre 270-300g, se les administro i.p 300µl de solución salina 0.9 % durante los 15 días del ECI, fueron sacrificadas 24 horas después de la última sesión de estrés crónico por inmovilización.
- Ratas estresadas + DMI: Ratas macho cuyo peso fluctúa entre 270-300g, se les administró desipramina i.p (10/mg Kg) durante los 15 días del ECI, fueron sacrificadas 24 horas después de la última sesión de estrés crónico por inmovilización.
- Ratas control + salino: Ratas macho cuyo peso fluctúa entre 310-340 g, se les administró i.p. 300 µl de solución salina 0.9 % durante los 15 días del ECI, fueron sacrificadas 24 horas después de los 15 días de haber sido trasladadas a la sala de manutención.
- Ratas control +DMI: Ratas macho cuyo peso fluctúa entre 310-340 g, se les administró desipramina i.p (10/mg Kg) durante los 15 días del ECI, fueron sacrificadas 24 horas después de los 15 días de haber sido trasladadas a la sala de manutención.

5.4 Obtención del cerebro de rata

5.4.1 Fijación del tejido y obtención de cortes de cerebro para estudiar la expresión del ARNm de CRH.

Las ratas control, “Sham” y ADX se anestesiaron con hidrato cloral al 16% (400mg/Kg. i.p). Se practicó una incisión torácica y abdominal de manera de alcanzar rápidamente el corazón. Luego, mediante un corte en el ventrículo izquierdo, se instaló una cánula de perfusión en el ventrículo izquierdo y se abrió la aurícula para permitir el flujo de salida. Inicialmente, se perfundió 80 ml aproximadamente de una solución de NaCl al 0.9 % estéril, y luego se perfundió con 500 ml de paraformaldehído al 3 % en tampón PB (NaH_2PO_4 0.1 M; pH 9,5) a un flujo de 16 ml/min con una bomba peristáltica.

Después de la perfusión, el cerebro se removió cuidadosamente y se cortó en trozos, los que se mantuvieron en la misma solución de paraformaldehído para su post-fijación por 30 min. Transcurrido este tiempo los trozos de cerebro se transfirieron a una solución de sacarosa al 15 % en PBS estéril (NaH_2PO_4 0.1M y NaCl 0.9 %; pH 7,4) manteniéndose durante 48 horas a 4° C. Finalmente, el tejido se cortó utilizando un vibrátomo 3000 (Technical Products Internacional), Se obtuvieron cortes de 30 μm , los que se recibieron en PBS estéril para los procedimientos de HIS.

5.4.2 Fijación del tejido y obtención de cortes de cerebro para estudiar la expresión del péptido de CRH.

Las ratas control y estresadas crónicamente, se anestesiaron con hidrato cloral al 16 % (400 mg/Kg. i.p) después de 24 horas del último día del protocolo de estrés crónico por

inmovilización. Se practicó una incisión torácica y abdominal de manera de alcanzar rápidamente el corazón. Luego, mediante un corte en el ventrículo izquierdo, se instaló una cánula de perfusión y se abrió la aurícula para permitir el flujo de salida. Inicialmente se perfundieron con 80 ml de una solución de NaCl al 0.9% estéril y luego se perfundió con 500ml de paraformaldehído al 4 %, ácido pícrico 7.5% en tampón PB (NaH_2PO_4 0.1 M; pH 7.5) a un flujo de 16 ml/min, con una bomba peristáltica.

Después de la perfusión, el cerebro se removió cuidadosamente y se cortó en trozos, los que se mantuvieron en la misma solución de paraformaldehído para su post-fijación por 24 horas. Transcurrido este tiempo, los trozos de cerebro se transfirieron a una solución de sacarosa al 15% en PBS estéril (NaH_2PO_4 0.1 M y NaCl 0.9%; pH 7.4) manteniéndose durante 48 horas a 4° C. Finalmente, se realizaron cortes de 30 μm utilizando un criostato (modelo CM 1510, Leica) a una temperatura de -19° C, los que se recibieron en PBS para los procedimientos ICQ.

5.5 Método de hibridación *in situ* y detección de células que expresan ARNm CRH

5.5.1 Consideraciones técnicas

La hibridación *in situ* es una técnica estandarizada para detectar ARNm en células, para ello se utiliza una sonda de oligonucleótidos marcada que es de secuencia complementaria a una porción de ARNm. Todas las soluciones utilizadas previamente, y durante la hibridación están esterilizadas. Dichas soluciones son esterilizadas por tratamiento con DEPC, éste es un componente alquilante, el DEPC es potencialmente carcinógeno y para destruirlo se autoclavan las soluciones con DEPC, generando dióxido de carbono y etanol, después del paso de la hibridación el híbrido DNA/RNA es resistente a ribonucleasas. Es importante indicar que cuando

se diseñan sondas de oligonucleótidos de una secuencia conocida, es necesario tener un 50% o mas pares de bases de GC, de lo contrario, oligonucleótidos con un gran porcentaje de pares de bases de AT son de baja estabilidad en formación del híbrido DNA/RNA (Wisden y cols, 1991).

Las sondas utilizadas en esta tesis son de oligonucleótidos marcados con digoxigenina. La hibridación de la sonda marcada con el ARNm en el tejido, se puede llevar a cabo con una estrictez razonable, con lo cual la especificidad de la sonda es mayor (Kadkol y cols, 1999).

5.5.2 Marcación de las sondas de oligonucleótidos

Las sondas utilizadas en los ensayos de hibridación son oligonucleótidos sintéticos, complementarios al ARNm CRH (figura 4):

CRH A: 5'-CAG TTT CCT GTT GCT GTG AGC TTG CTG AGC TAA CTG CTC-3'

CRH 1: 5'-TTC CCC AGG CGG AGG AAG TAT TCT TCA CCC ATG CGG ATC-3'

Las sondas se marcaron en el extremo 3' con digoxigenina-dUTP (DIG-dUTP), usando la enzima transferasa terminal (TdT). Cien pmoles del oligonucleótido disuelto en 10 µl de agua libre de RNasa se mezclaron a 0° C con 1 µl de DIG-dUTP (1 nmol); 0.9 µl dATP (10 mM); 5 µl de tampón Tdt 5X (cacodilato de K⁺ 1 M; Tris acido 125 mM; albúmina de suero de bovino (BSA) 1.25 mg/ml; pH 6,6) 2.2 µl de Tdt (25 U/µl); 2.5 µl de CoCl₂ 10 mM y 3.4 µl de H₂O. La mezcla se incubo durante 30 minutos a 37° C y luego se coloco en hielo.

Para finalizar la reacción se agregó 1µl de solución de detención (ARNt 135 U/ml, EDTA 0.22 M; pH 7.2), el oligonucleótido marcado se precipitó con 2.5 µl de LiCl 4 M y 75 µl de etanol frío, se agitó y se dejó precipitar toda la noche a – 80° C. Luego se centrifugó 30

minutos a 20800 g, para recuperar el oligonucleótido marcado. Finalmente, se secó al vacío y resuspendido en agua DEPC.

5.5.3 Control de la marcación de las sondas

La marca de las sondas se verificó mediante la realización del ensayo de reconocimiento de la DIG por un anticuerpo anti-DIG, y posterior reacción de fosfatasa alcalina con las sondas oligonucleotídicas fijadas en una membrana de nylon. Para ello, una alícuota de cada una de las sondas marcadas (2 μ l) se diluyó en 400 μ l de TE 1X (Tris base 10 mM y EDTA 1 mM; pH 7.6) y se aplicó mediante vacío a una membrana de nylon, previamente lavada con agua (2 veces por 10 minutos cada uno) y TE 10X (1 vez, 10 min). A continuación la membrana se secó a temperatura ambiente y se expuso a la luz UV durante 5 minutos para fijar los oligonucleótidos a la membrana. Finalmente, se trató del mismo modo que el tejido para realizar la unión del anticuerpo y la posterior revelación con sustrato para fosfatasa alcalina.

5.5.4 Protocolo de Hibridación *in situ*

Luego de permanecer los cerebros en sacarosa durante 48 horas, aproximadamente, se cortaron en un Vibrátomo (Serie 1000, USA) y se obtuvieron cortes coronales de 30 μ m del NLETdl, NLetvl, PVN, los que fueron recibidos en PBS estéril (NaH_2PO_4 0.1 M y NaCl 0.9 %; pH 7.4) y posteriormente lavados tres veces en PBS estéril. A continuación se incubaron por 30 minutos a 37° C (inactivar las fosfatasas endógenas) con una solución de pre-hibridación compuesta de SSC 4X (SSC 20X: NaCl 3M y citrato de sodio 0.3M; pH 7.4) y Denhart 1x

(Denhart 100X: polivinilpirrolidona 2%; ficoll 2% y BSA 2%), la finalidad de la pre-hibridación es reducir la tinción de fondo.

Posteriormente, los cortes se incubaron durante 18 horas a 38° C con la solución de hibridación 5X (Tris-HCl 0.3 M; NaCl 3 M; EDTA 22 mM; sarcosil 34 mM; pH 7.5), además de formamida 50 % y DTT 100 mM. Esta solución contiene las sondas de oligonucleótidos marcadas anteriormente con DIG-11-dUTP a una concentración de de 10 pmoles/ml en volumen de 1 ml.

La temperatura de hibridación se fijó a 23° C bajo la temperatura de fusión (Tm). El valor de Tm indica la temperatura en la cual, la mitad de los oligonucleótidos, se encuentran como una cadena simple, ésta se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula (Sambrook y cols, 1989). La temperatura de hibridación se fijó a 23° C bajo la temperatura de fusión (Tm). El valor de Tm indica la temperatura en la cual, la mitad de los oligonucleótidos, se encuentran como una cadena simple, ésta se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula (Sambrook y cols, 1989).

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 0.41 (\% GC) - 675/N - 0.66 (\% F)$$

F= Formamida

N= N° nucleótidos

[Na⁺]= Concentración de sodio

%GC= porcentaje de guaninas y citosinas

Después de la hibridación los cortes se lavaron para remover las sondas no marcadas y/o las sondas unidas inespecíficamente al ARNm de CRH de la siguiente forma:

SSC 2X, dos veces, 10 minutos c/u a 44° C

SSC 1X, una vez ,10 minutos a 44° C

Los experimentos controles se realizaron incubando los cortes con las sondas marcadas en exceso (100x) de sonda no marcada, en las mismas condiciones. Del mismo modo, se realizó otro control con la incubación de los cortes sin sonda marcada.

5.5.5 Detección de las sondas marcadas

La detección de las sondas marcadas (CRH-1; CRH-A) con DIG-11-dUTP, se realizó modificando el protocolo de Andrés y cols (1996). Todas las incubaciones de los cortes se realizaron a temperatura ambiente y con agitación constante. En primer lugar, los cortes se incubaron con tampón TAT (Tris base 0.1M; NaCl 1M; pH 7.6) durante 10 minutos, luego se incubaron con anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina, durante 2 horas. El anticuerpo se utilizó a una dilución final de 1/1000, diluido en tampón TAT, con suero fetal de origen bovino (FBS) 0.03% y Tritón 0.1 %. Posteriormente, los cortes se lavaron tres veces con tampón TAT por 10 minutos cada una, y una vez con tampón TC (Tris base 0.1M; NaCl 1M y $MgCl_2$ 50mM; pH 9.5) por 5 minutos. Para la detección de las sondas, los cortes se incubaron sin agitación y a temperatura ambiente en una solución fresca con el sustrato de fosfatasa alcalina, NBT y BCIP, en tampón TC y guardado en la oscuridad por 10 horas. Cuando la fosfatasa alcalina remueve el grupo fosfato de BCIP, la molécula resultante dimeriza bajo condiciones de oxidación para dar paso a un precipitado azul; durante la reacción el NBT es reducido para potenciar la reacción de color azul. La reacción se detuvo cuando la señal era prominente, transfiriendo los cortes a PBS. Finalmente los cortes se montaron con gelatina 0.1% y azida 0.1% en portaobjetos y se observaron bajo microscopía de luz.

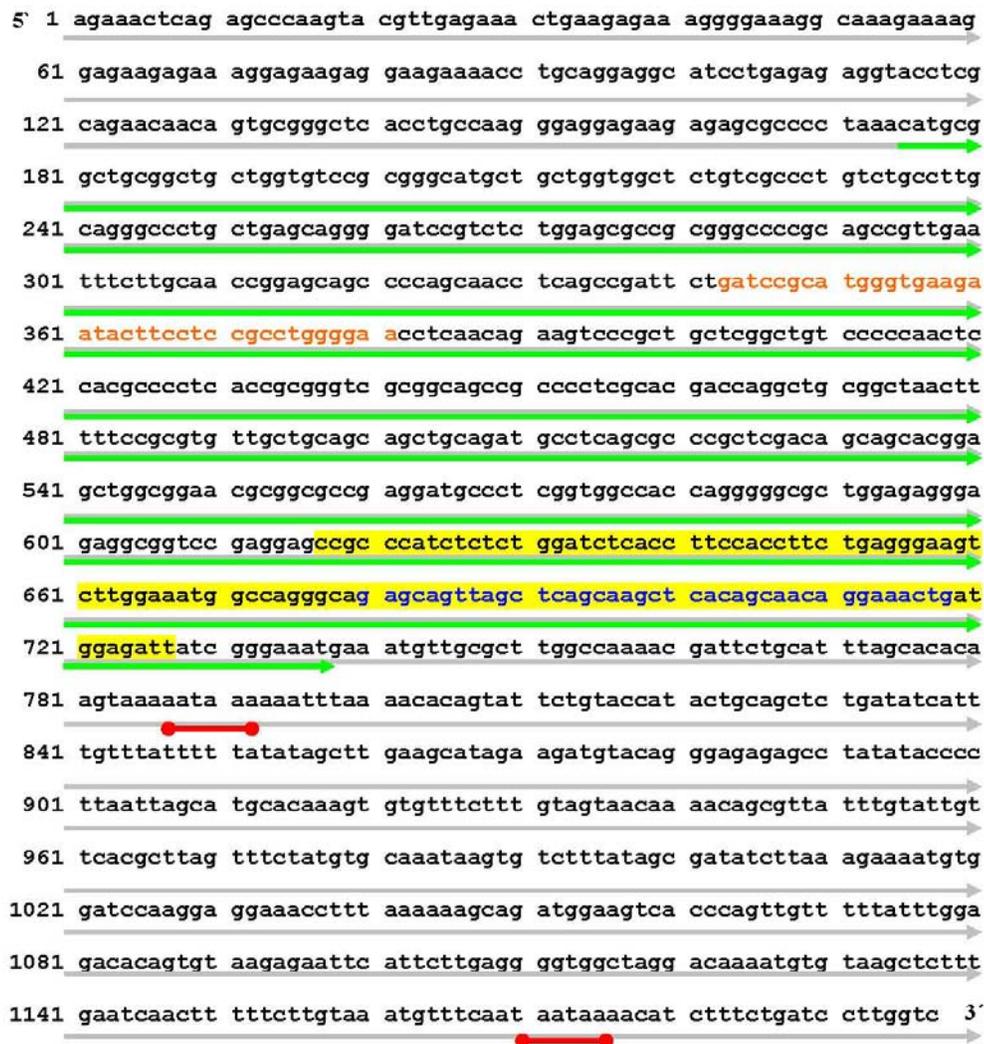


Figura 4. Sondas oligonucleotídicas utilizadas en detección del ARNm de CRH en cerebro de rata. En plomo el ARNm de CRH, amarillo la zona del ARNm que codifica al péptido de de CRH maduro, verde el ARNm que codifica para el pro-péptido de CRH, rojo secuencias de poly A. Las zonas naranjas y azules muestran las regiones de la secuencia de ARNm, a las cuales se unen las sondas. Las sondas utilizadas fueron controladas en el programa BLAST (Basic local alignment search tool”) de alineamiento para detectar complementariedad y similitud con secuencias conocidas de ácidos nucleicos.

5.6 Técnica de Inmunohistoquímica

Se obtuvieron cortes coronales de cerebro de 30 μm de espesor en criostato (modelo CM 1510, Leica) a una temperatura de -21°C). Estos cortes se transfirieron a placas de cultivo en PBS (NaH_2PO_4 0.1 M y NaCl 0.9 %; pH 7.4), luego fueron lavados tres veces en PBS y posteriormente se trataron con H_2O_2 al 0.5 % por 30 minutos para inactivar las peroxidasas endógenas, las cuales alteran la coloración inmunoenzimático que utiliza una reacción de enzima – sustrato para convertir a los cromógenos sin color en un producto final coloreado (figura 5). Enseguida, los cortes se lavaron tres veces por 10 minutos con PBS, luego se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo compuesta por 3% de suero normal de cabra (GNS), 0.5 % tritón X-100, 0.4% carregenina, 0.02 % azida y PBS, para completar un volumen final de 1 ml. Esta solución se descartó y los cortes se incubaron durante 19 horas a temperatura ambiente con solución de bloqueo que contenía anticuerpo policlonal anti-CRH fabricado en conejo (donado gentilmente por el Dr. Esteban Rodríguez, Instituto de Histología, Universidad Austral de Chile); con una dilución de 1:1000.

Después de incubar los cortes con el primer anticuerpo, se lavaron cinco veces con PBS y luego se incubaron durante una hora con un segundo anticuerpo, anti-conejo biotinilado. El anticuerpo se utilizó 1:1000 en una solución compuesta de 1.5% GNS, 0.4% Tritón y PBS para completar un volumen final de 1 ml. Posteriormente, los cortes se lavaron cuatro veces con PBS y luego fueron incubados por 1 hora con avidina – biotina conjugada con peroxidasa de rábano a una dilución 1:500 en PBS. A continuación, se lavaron los cortes cuatro veces por 10 minutos con PBS. La marca se reveló con 0.05 % de 3.3 diaminobencidina (DAB), 0.01 % H_2O_2 y tampón Tris (Tris–HCl 50 mM y NaCl 150 mM; pH 7.6) durante 8 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, luego se procedió a lavar los cortes con PBS tres veces por 10

minutos. Finalmente los cortes se montaron en gelatina al 0.1 % y azida 0.01 % en portaobjetos, y se observaron bajo microscopio de luz.

5.7 Análisis de resultados

5.7.1 Cuantificación de la marca de hibridación no isotópica.

5.7.1.1 Número de células que expresan el ARNm de CRH

Las células marcadas producto de la reacción de la fosfatasa alcalina con los sustratos NBT y BCIP se contaron mediante análisis computacional de imagen, usando el programa Image-Pro plus (Media Cybernetics). Para cada medición se analizaron tres cortes, provenientes de al menos tres experimentos independientes. Todos los cortes fueron analizados manualmente utilizando un microscopio de luz (OLYMPUS BX51) con un objetivo 20x, acoplado a una cámara digital OYMPUS “Camedia” C-3030, lo que nos entrega un área por cuadrante de $98.8 \mu\text{m}^2$, para el análisis del NLETdl, NLETvl y PVN.

5.7.1.2 Análisis de la intensidad de la marca del ARNm CRH

La intensidad de la marca de las células que expresan el ARNm de CRH se cuantificó por densidad óptica. Se utilizó un microscopio de luz (Nikon, Labophot), el cual tiene acoplada una cámara de video (Sony), lo que permite transferir la imagen observada a un aumento del 20x a un computador Macintosh. Las imágenes digitalizadas fueron analizadas con un programa de análisis computacional de imágenes UN-SCAN-IT (Silo Scientific Co, Orem, UT, USA), en un computador PC Olidata AMD athlon (tm) XP 2000. Para el análisis del NLETvl se uso un área

total de $15.69 \mu\text{m}^2$; PVN $35.731 \mu\text{m}^2$. Además, se analizó la eminencia media (EM) el cual es lugar de terminación de los axones de CRH del PVN, para lo cual se utilizó un área de $41.1 \mu\text{m}^2$.

5.7.2 Análisis de la intensidad de la marca correspondiente a la inmunorreactividad tipo CRH.

La intensidad de la marca correspondiente a la inmunorreactividad tipo CRH (ir-CRH) en células y terminales se cuantificaron midiendo densidad óptica en píxeles. Para ello se utilizó un microscopio de luz (Nikon, Labophot), el cual tiene una cámara de video (Sony) acoplada, lo que permite transferir la imagen observada a 10x a un computador Macintosh. Las imágenes digitalizadas se analizaron usando el programa de análisis computacional de imágenes UN-SCAN-IT (Silo Scientific Co, Orem, UT, USA), en un computador PC Olidata AMD athlon (tm) XP 2000. Para el análisis del NLETdl se usó un área total de $109 \mu\text{m}^2$; NLETvl $94.09 \mu\text{m}^2$; PVN $71.95 \mu\text{m}^2$ y NCeA $133.9 \mu\text{m}^2$.

5.8 Cálculos y análisis estadísticos

5.8.1 Expresión ARNm de CRH.

Los resultados corresponden al promedio del número de células obtenidos de 3 a 4 cortes que provenían de la misma altura de bregma, a -0.26 mm de Bregma para NLETdl y NLETvl, y -1.8 mm de Bregma para el PVN, por rata, de 3-4 experimentos. Además, se analizó la intensidad de la marca correspondiente a la expresión del ARNm de CRH obtenida por HIS en el NLETvl a -0.26 mm y el PVN a -1.8 mm de bregma. Los resultados corresponden al promedio de intensidad de la marca obtenido a partir de 3-4 cortes por rata de 3-4 experimentos

independientes. Los datos obtenidos de ambos tipos de estudio se analizaron usando análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Newman-Keuls usando el programa estadístico GraphPad Prism 2.3.

5.8.2 Expresión del péptido de CRH.

Los resultados corresponden al promedio de la intensidad (píxeles/área) de la ir-CRH obtenida de 3-4 cortes de cada animal de 5-9 experimentos independientes. Los cortes provenían de los núcleos NLETdl, NLETvl (-026 mm de bregma), PVN (-1.4 a 2.12 mm de bregma) y NCeA (-2.3 mm de bregma. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 2.3 para analizar los diferentes grupos experimentales usando un análisis de varianza (ANOVA) seguido por la prueba de Newman-Keuls para comparar más de dos grupos experimentales.

6 RESULTADOS

6.1 Parámetros fisiológicos

6.1.1 Efecto de los diferentes tratamientos sobre el peso corporal

6.1.1.1 Efecto de la suprarrenalectomía

Como se muestra en la Figura 6, la suprarrenalectomía produce una disminución de la ganancia de peso corporal. En la Figura 5 A, se muestra el gráfico del curso temporal del efecto y en la figura 6 B se muestra el gráfico del efecto neto en la pérdida de peso que se produce 28 días después de la ADX, observándose una disminución significativa del peso corporal en los animales ADX comparado con los animales “Sham” ($p < 0.05$, prueba “test de Student”, no paramétrico).

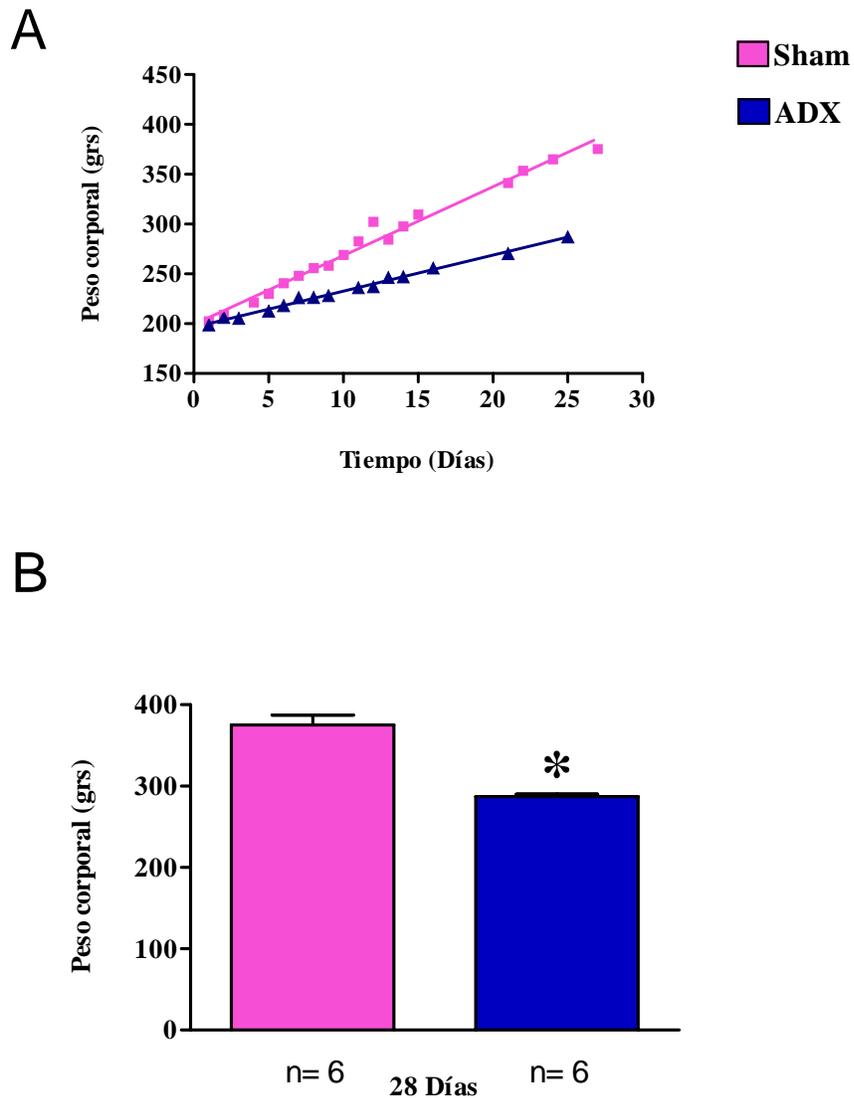


Figura 5. Efecto de la suprarrenalectomía sobre el peso corporal. A) Curso temporal del efecto de la ADX. B) Efecto neto de la ADX sobre la ganancia de peso. Se observa en ambas figuras una disminución significativa del peso corporal en los animales ADX comparado con los animales “sham”. Los resultados representan el promedio \pm EEM de 6 ratas tomadas como experimentos independientes, * $p < 0.05$ Ratas ADX comparado con ratas “Sham” (Test de Student no pareado).

6.1.1.2 Efecto del estrés crónico por inmovilización

Como se muestra en la Figura 6, el estrés crónico por inmovilización (ECI) produce una disminución significativa en la ganancia de peso corporal. En la Figura 6 A, se muestra el gráfico del curso temporal del efecto y en la figura 6 B se muestra el gráfico del efecto neto en la pérdida de peso que se produce en los animales sometidos a ECI durante 15 días, observándose una disminución significativa del peso corporal en los animales sometidos a ECI comparado con los animales control que no fueron sometidos a estrés ($p < 0.05$, prueba “test de Student”, no paramétrico).

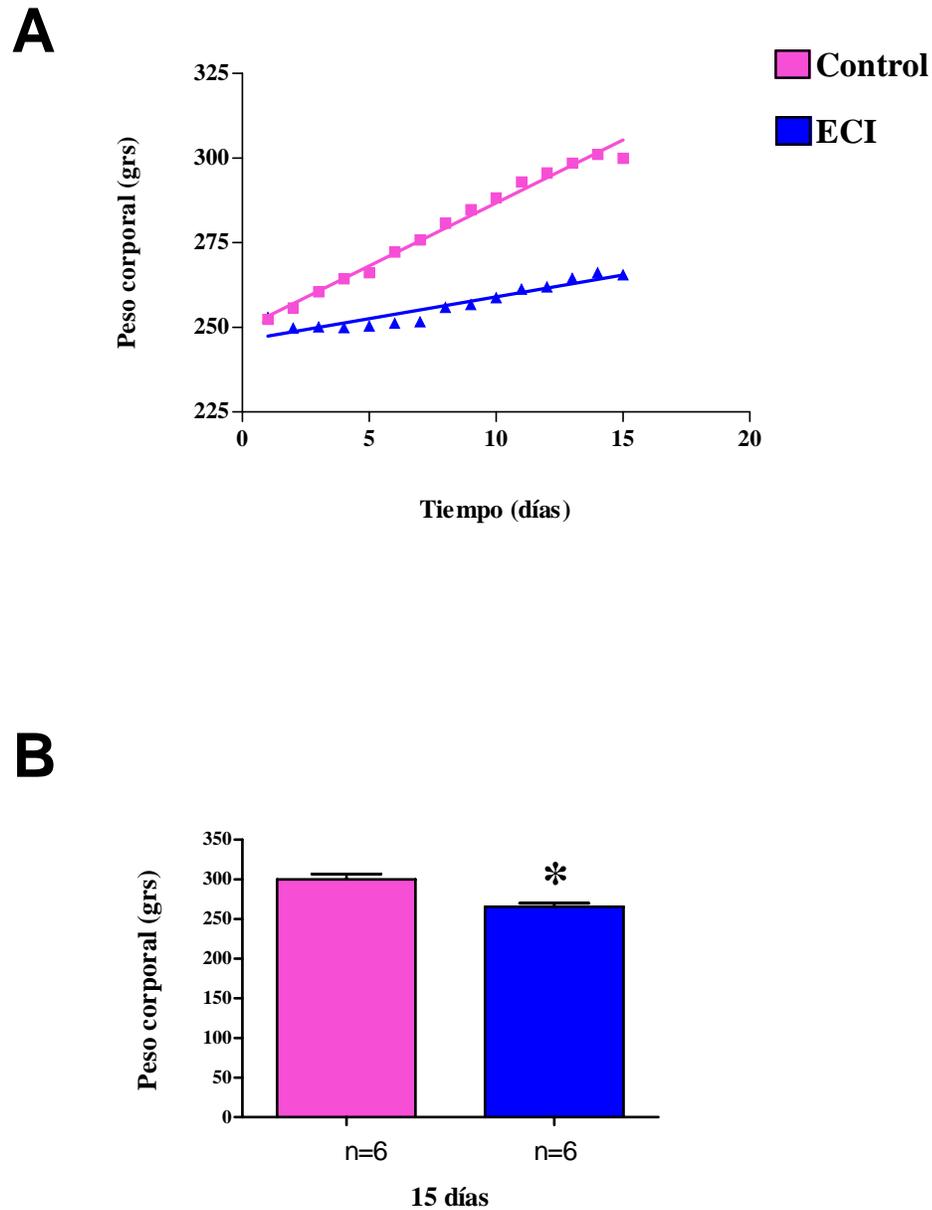
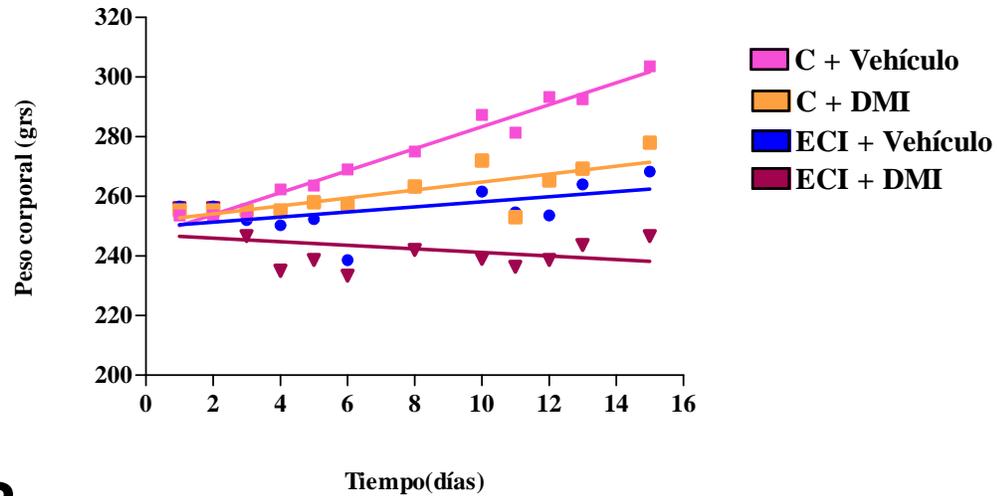


Figura 6. Efecto del ECI sobre el peso corporal de las ratas. A) Curso temporal del efecto del ECI. B) Efecto neto del ECI sobre la ganancia de peso. Se observa en ambas figuras una disminución significativa del peso corporal en los animales ECI comparado con los animales control. Los resultados representan el promedio \pm EEM de 6 ratas tomadas como experimentos independientes, $*p < 0.05$ Ratras ECI comparado con ratas control (Test de Student no pareado).

6.1.1.3 Efecto del tratamiento con desipramina (DMI)

Como se muestra en la Figura 7, el tratamiento con DMI durante 15 días no impide la disminución del peso corporal. De hecho produce una disminución significativa en el peso corporal comparado con los animales tratados con vehículo. En la Figura 7 A, se muestran el gráfico del curso temporal del efecto y en la figura 7 B se muestra el gráfico del efecto neto en la pérdida de peso que se produce frente a los distintos tratamientos, observándose una disminución significativa del peso corporal en los animales control administrados con DMI y los animales sometidos a ECI administrados con DMI comparado con los animales control administrados con vehículo ($p < 0.05$, análisis de varianza ANOVA, seguida de un análisis *post hoc* Newman-Keuls).

A



B

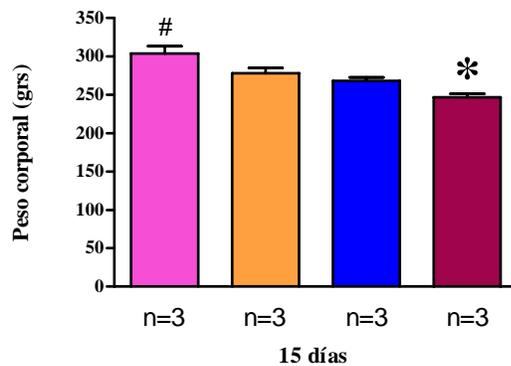


Figura 7. Efecto del tratamiento con desipramina sobre el peso corporal de las ratas.

A) Curso temporal del efecto de administración crónica de DMI. B) Efecto neto sobre la ganancia de peso. Ambas figuras muestran una disminución significativa del peso corporal en los animales control administrados con DMI y animales sometidos a ECI con DMI comparados con los animales control administrados con vehículo. Los resultados representan el promedio \pm EEM de 3 ratas tomadas como experimentos independientes, # $p < 0.05$ Ratras control (C) comparado con ratas control + DMI y ratas ECI + vehículo, * $p < 0.05$ Ratras ECI + DMI comparado con Control + vehículo y control DMI (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

6.1.2 Efecto de los diferentes tratamientos sobre el peso de glándula suprarrenal

6.1.2.1 Efecto del estrés crónico por inmovilización

Como se muestra en la Figura 8 A, en animales sometidos ECI durante 15 días, se observa un aumento significativo del peso de la glándula suprarrenal comparado con animales control que no fueron sometidos a estrés ($p < 0.05$, prueba “test de Student”, no paramétrico).

6.1.2.2 Efecto del tratamiento con desipramina (DMI)

Como se muestra en la Figura 8 B, animales con ECI tratados con DMI durante 15 días no evita el incremento del peso de la glándula observado en animales con ECI. De hecho, en animales ECI con tratamiento con DMI y vehículo se observa un aumento significativo en el peso glándula suprarrenal comparado con los animales tratados con vehículo y DMI ($p < 0.05$, análisis de varianza ANOVA, seguida de un análisis *post hoc* Newman-Keuls).

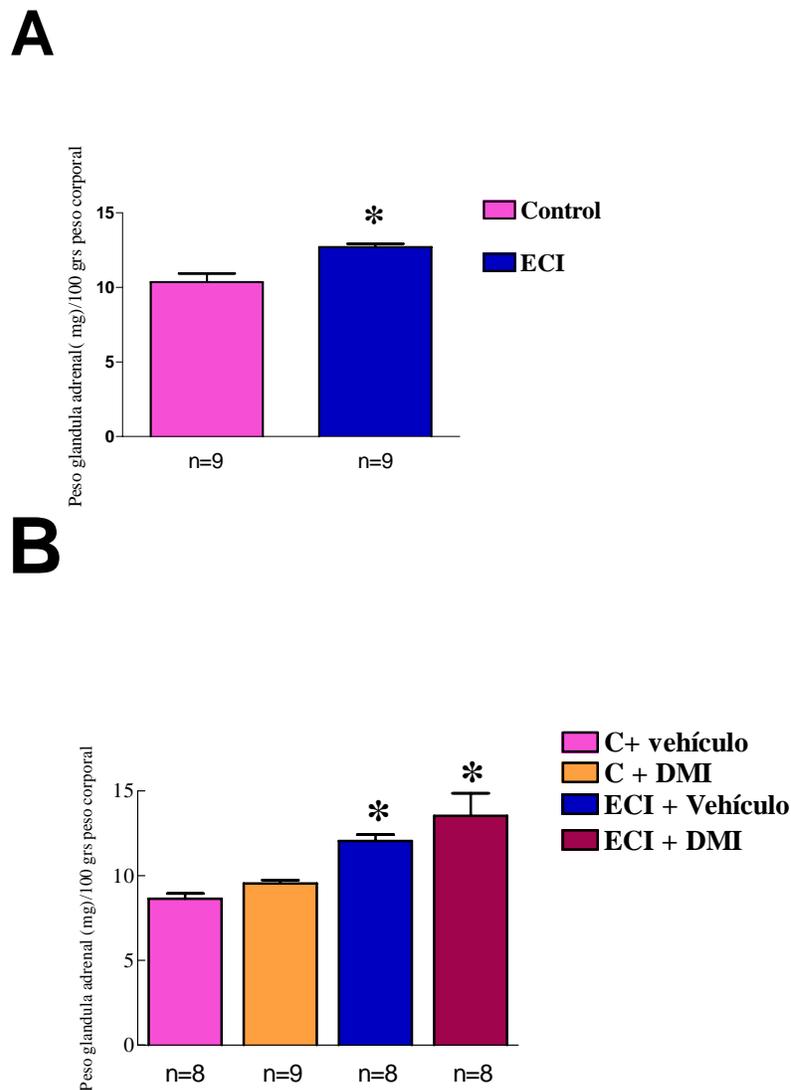


Figura 8. Efecto del ECI y del tratamiento con desipramina sobre el peso glándula suprarrenal de las ratas. A) Las ratas sometidas a ECI presentan un aumento de peso de glándula suprarrenal comparado con el ratas control (* $p < 0.05$ Test de Student no pareado), B) Efecto de administración crónica de DMI, las ratas sometidas a ECI + vehículo y DMI muestran un aumento del peso de la glándula suprarrenal, comparado con ratas vehículo y control + DMI (* $p < 0.05$ ANOVA seguido por Newman-Keuls). Los resultados representan el promedio \pm EEM de 8-9 ratas tomadas como experimentos independientes.

6.2 Hibridación *in situ* (HIS) no isotópica para el ARNm CRH

La detección del ARNm de CRH, se realizó tal como se describió en métodos, se utilizaron dos sondas de oligonucleótidos distintos, que son complementarios a diferentes zonas del ARNm. En la figura 9 A muestra un esquema de un corte coronal de rata que ilustra una región del PVN que fue estudiada. (Paxinos and Watson, 1997). La figura 9 B, corresponde a un corte de PVN - 1.8 mm de bregma, en el cual es posible apreciar claramente las células marcadas positivamente. Además, es posible visualizar la marca perinuclear típica al realizar una HIS con digoxigenina, ya que se híbrida el ARNm que esta en el citoplasma (Fig.9 C). Para comprobar la especificidad de la marca se hibridó en presencia de un exceso de 100 veces la concentración de cada sonda sin marcar. Como se observa en la figura 9 D y 9 E, por consiguiente el exceso de sonda fría elimina la marca, señalando que la marca obtenida es específica para CRH.

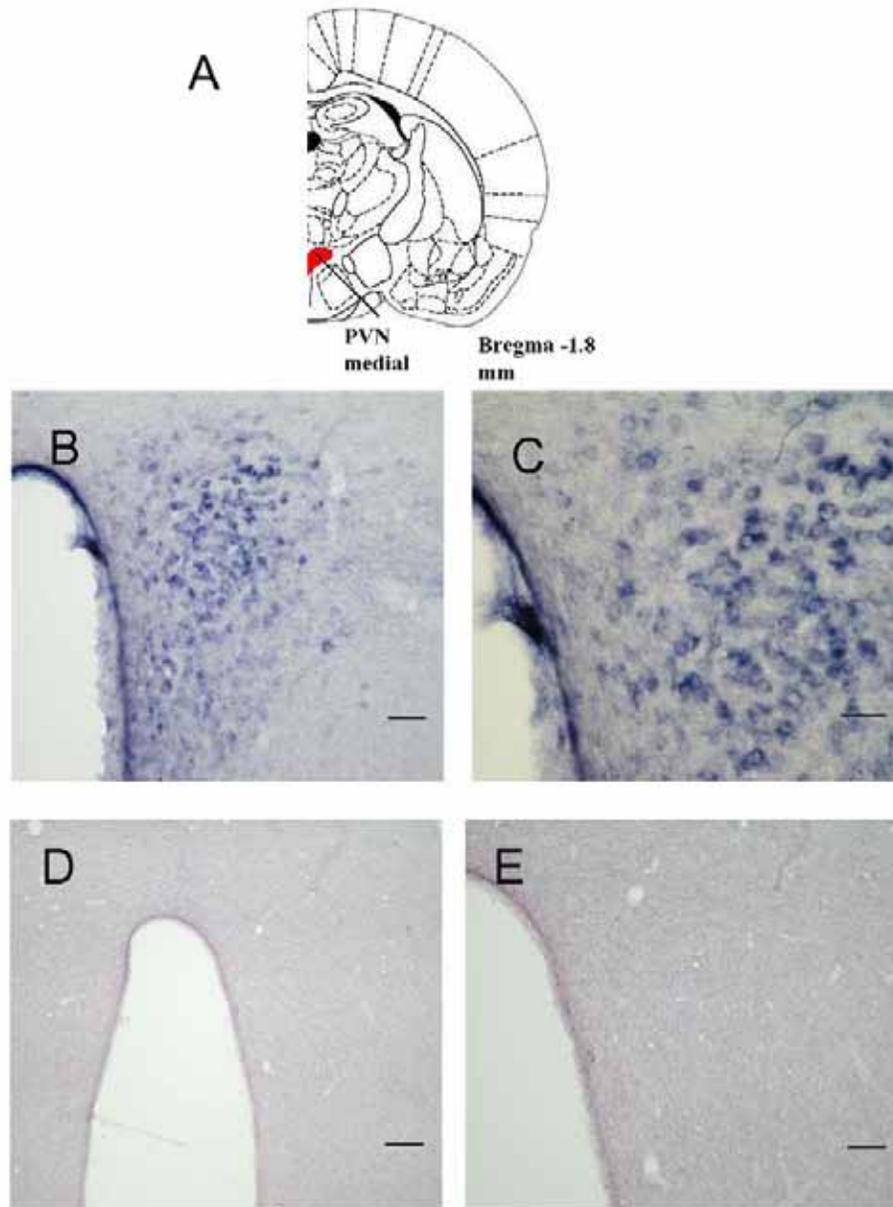


Figura 9. HIS del ARNm CRH en el PVN. A) se muestra un esquema de un corte coronal de rata que ilustra una región del PVN que fue estudiada. (Paxinos and Watson, 1997). B) se puede observar las células marcadas con los oligonucleótidos CRH-1 y CRH-A, a una concentración de 10 pmoles/ml. C) se observan las células marcadas a mayor aumento. D) y E) se muestran los controles realizados con un exceso de 100 veces de sonda no marcada con DIG-11-dUTP. Barra de escala; A, D= 30 μ m; B= 20 μ m; C= 60 μ m.

6.2.1 HIS para el ARNm de CRH.

En La figura 10, se muestran cortes coronales de cerebro de rata a nivel del NLETdl, donde se observa la expresión del ARNm de CRH. En 10 A se muestra un esquema de un corte coronal de rata que ilustra la región del NLETdl estudiada. (Paxinos and Watson, 1997). Como se muestra en la figura 10 B y 10 C, 28 días después de la ADX bilateral se observa una disminución en el número de células que expresan ARNm de CRH, comparado con los animales control (Figura 10 D y E) y animales “Sham” (Figura 10 F y G).

En la Figura 11, se muestran cortes coronales de cerebro de rata a nivel del NLETvl, tomados a diferentes aumentos, donde se observan las células que expresan el ARNm de CRH.

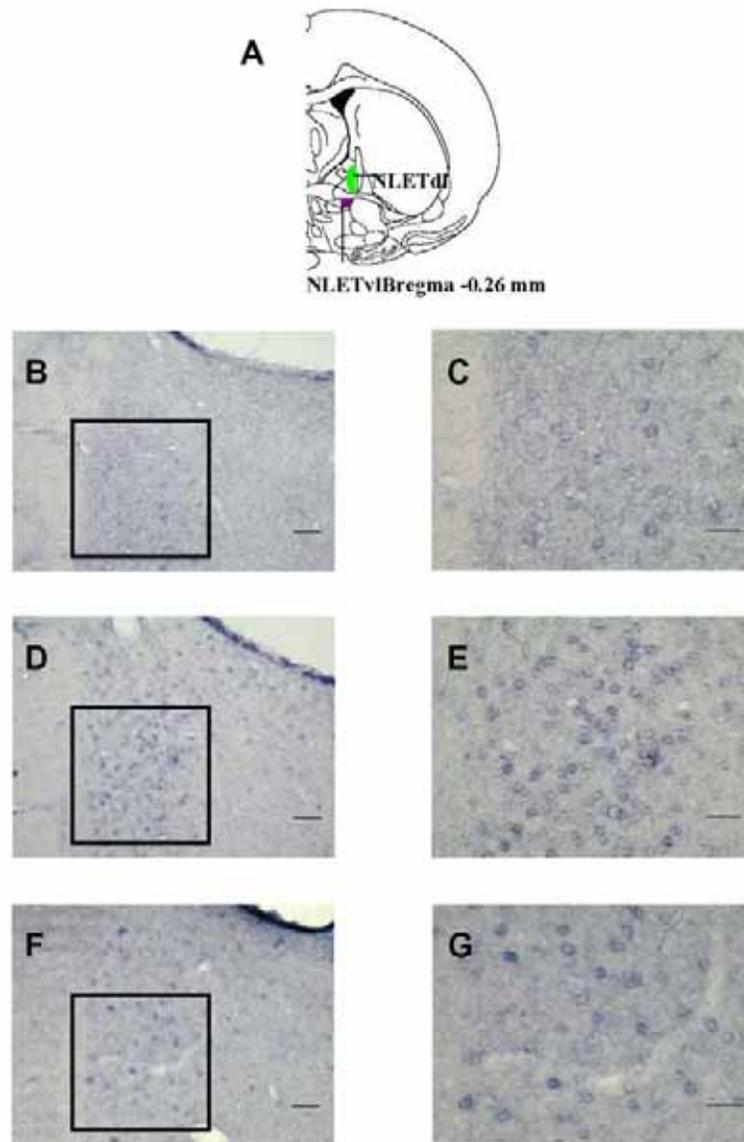


Figura 10. HIS del ARNm de CRH en NLETdl de ratas suprarrenalectomizadas.

A) Muestra un esquema de un corte coronal de rata que ilustra la región del NLETdl que fue estudiada. (Paxinos and Watson, 1997). B) NLETdl de rata ADX con aumento 20X. C) NLETdl de rata ADX con aumento 40X. D) NLETdl de rata control con aumento 20X. E) NLETdl de rata control con aumento 40X. F) NLETdl de rata Sham con aumento 20X. G): NLETdl de rata Sham con aumento 40X. Barra de escala; A, C, E= 30 μ m; B, D, F= 20 μ m

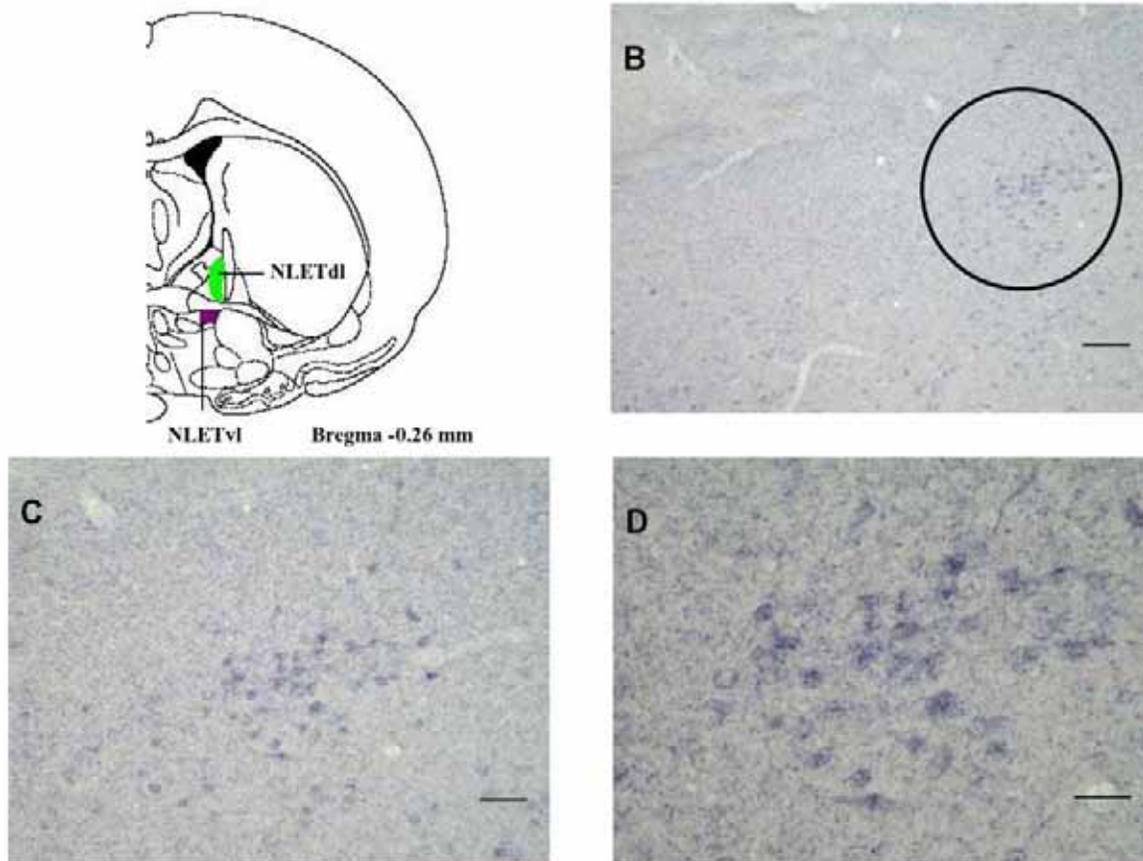


Figura 11. HIS del ARNm de CRH en NLETvl. A) Muestra un esquema de un corte coronal de rata que ilustra la región del NLETdl que fue estudiada. (Paxinos and Watson, 1997). B) NLETvl de rata control con aumento 10X. C) NLETvl de rata control con aumento 20X. D) NLETvl de rata control con aumento 40X. Barra de escala; A= 60 μ m; B= 30 μ m; C= 20 μ m.

6.2.2 Efecto de la suprarrenalectomía sobre el número de células que expresan el ARNm de CRH en el NLETdl.

La Figura 12 A, corresponde al análisis cuantitativo del número de células que expresan el ARNm de CRH en el NLETdl, en ella se observa que la ADX produce una disminución significativa en el número de células que expresan el ARNm de CRH comparado con los animales control intactos y los animales “Sham” ($p < 0.05$, análisis de varianza ANOVA, seguida de un análisis *post hoc* Newman-Keuls). Sin embargo en las figuras 12B y 12C en el NLETvl y PVN respectivamente, no se observan diferencias significativas en el número de células que expresan el ARNm de CRH en los animales ADX comparado con sus respectivos controles animales intactos y “Sham”.

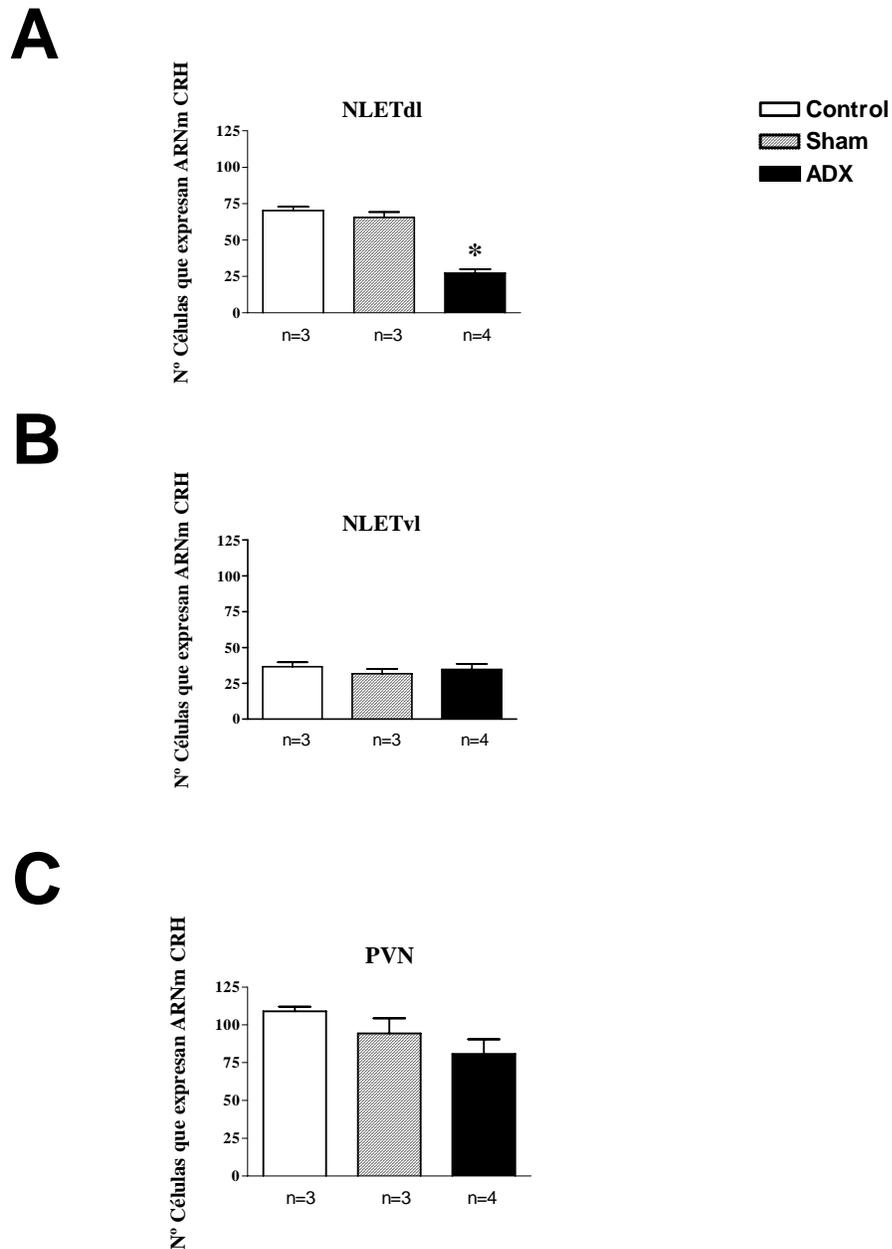


Figura 12. Cuantificación del número de células que expresan el ARNm de CRH, efecto de la suprarrenalectomía. El análisis cuantitativo muestra que la ADX disminuye significativamente el número de células que expresan CRH en el NLEtdl. Los resultados se muestran como promedio \pm EEM 3-4 ratas tomadas como experimentos independientes, análisis de varianza ANOVA seguido por Newman-Keuls, * $p < 0.05$ Ratas ADX comparado con ratas control y “Sham”.

6.2.3 Análisis semicuantitativo del efecto de la suprarrenalectomía sobre la expresión del ARNm de CRH.

6.2.4 Efecto de la suprarrenalectomía sobre la intensidad de la marca del ARNm de CRH en el NLETvl.

Como se explicó en métodos, se analizó la expresión del ARNm de CRH cuantificando la intensidad de la marca, solamente en NLETvl y PVN, esto se debe a que por sensibilidad del método de análisis utilizado no es capaz de detectar la muy escasa marca en NLETdl. La Figura 13 A, muestra que la ADX no produce una disminución cambios en la intensidad de la marca del ARNm CRH entre las ratas “Sham” y ADX.

6.2.5 Efecto de la suprarrenalectomía sobre la intensidad de la marca del ARNm CRH en el PVN.

La Figura 13 B, muestra que la ADX produce un aumento significativo de la intensidad de la marca del ARNm CRH en el PVN comparado con ratas control y “Sham” ($p < 0.05$, análisis de varianza ANOVA, seguida de un análisis *post hoc* Newman-Keuls).

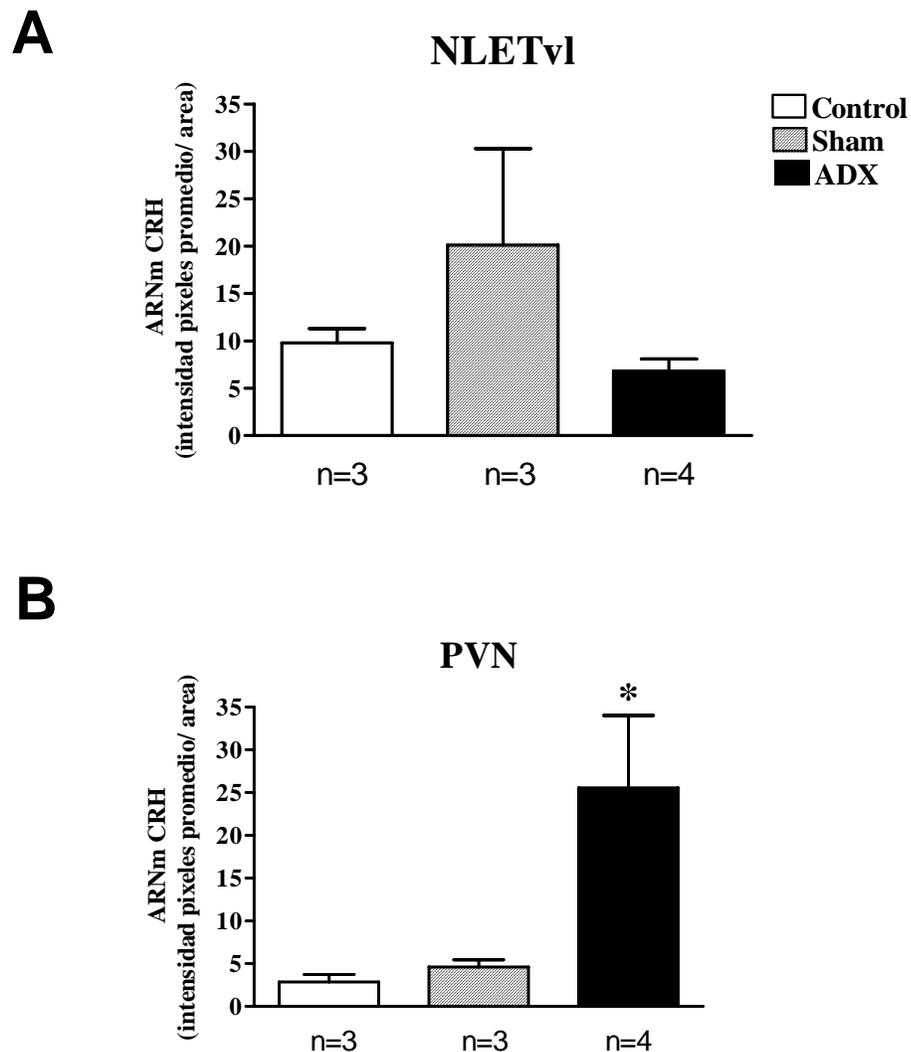


Figura 13 Efecto de la suprarrenalectomía en la intensidad de la marca del ARNm de CRH. El análisis semicuantitativo muestra que la suprarrenalectomía produce un aumento significativo en la intensidad de marca del ARNm CRH en el PVN, en cambio la suprarrenalectomía no produce cambios en la intensidad de la marca del ARNm CRH en el NLETvl en ratas ADX comparado con ratas control y “Sham”. Los resultados representan el promedio \pm EEM de 3 - 4 ratas tomadas como experimentos independientes (ANOVA seguido por Newman-Keuls). * $p < 0.05$ Ratas ADX comparado con ratas control y “Sham”.

6.3 Inmunohistoquímica para el péptido de CRH.

En las figuras 14 A, 14 B y 14 C se muestran esquemas ilustrativos de regiones del cerebro de rata que se utilizaron para estudiar los efectos de la ADX, el ECI y el efecto DMI sobre la expresión del péptido de CRH (Paxinos and Watson, 1997).

6.3.1 Control del anticuerpo policlonal anti-CRH.

La omisión del anticuerpo anti-CRH en los cortes de cerebro sometidos a esta condición no mostraron ningún tipo de marca, lo cual indica que la marca observada se produce por la presencia del anticuerpo. Además, para descartar que el anticuerpo anti-CRH tenga reacción cruzada con Urocortina, se estudio la expresión de CRH en cortes coronales del núcleo Edinger-Westphal, el cual expresa una alta concentración de urocortina, los resultados muestran que el anticuerpo anti-CRH no produce marca en dicho núcleo (datos no mostrados).

6.3.2 Efecto de la suprarrenalectomía sobre la expresión de péptido de CRH.

Se compara en la figura 14 la expresión del péptido de CRH en cortes coronales obtenidos de ratas control y ADX. Como se muestra en las figuras 14 D y 14 F, 28 días después de la ADX bilateral se observa una disminución en la ir-CRH en el NLETdl y NCeA respectivamente comparado con los animales control (Figuras 14 G y 14 I). Por el contrario la figura 14 E, 28 días después de la ADX bilateral se observa un aumento de la ir-CRH en el PVN comparado con los animales control (Figura 14 H)

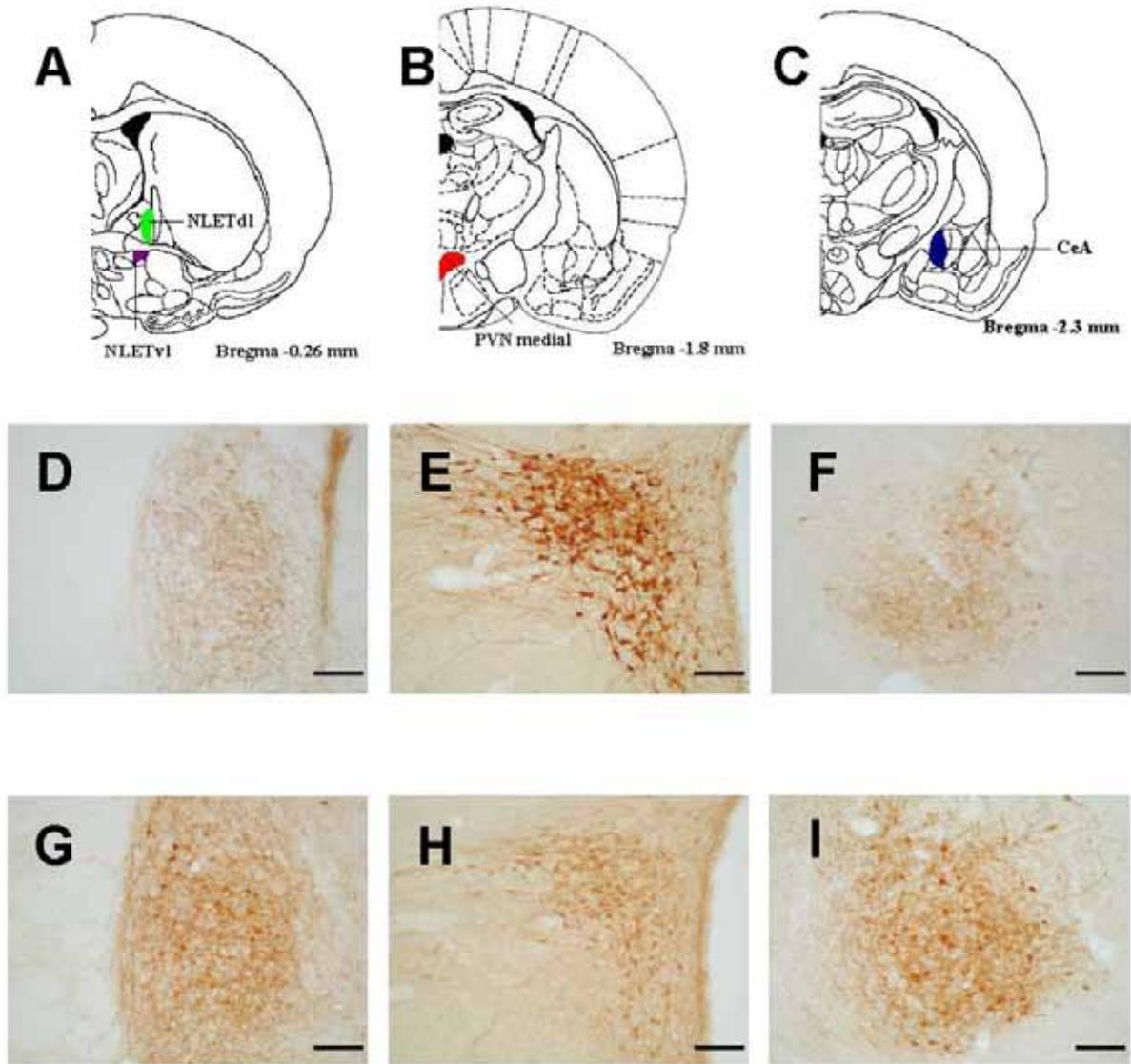


Figura 14. Efecto de la ADX en inmunorreactividad de CRH. A), B) y C) Muestran un esquema de un corte coronal de rata que ilustra la región del NLETdl, PVN y NCeA que fueron estudiadas, respectivamente. (Paxinos and Watson, 1997). D) Muestra el NLETdl ADX. E) PVN ADX. F) NCeA ADX. G) NLETdl control. H) PVN control. I) NCeA control. Las fotografías fueron tomadas con un aumento del 20X. Barra de escala representa 100 μ m.

6.3.3 Análisis semicuantitativo del efecto de la suprarrenalectomía sobre la expresión del péptido de CRH.

6.3.3.1 Efecto de la suprarrenalectomía en la expresión péptido CRH

Como se explico en métodos, se analizo la expresión del péptido CRH cuantificando la densidad de la inmunorreactividad tipo-CRH (ir-CRH) en cada uno de los núcleos del cerebro estudiados. Las Figura 15 A, 15 B y 15 C muestran que la ADX produce una disminución significativa en la ir-CRH en el NLETdl, NLETvl y NCeA respectivamente comparados con ratas control y “Sham” ($p < 0.05$, análisis de varianza ANOVA, seguida de un análisis *post hoc* Newman-Keuls). Por el contrario la figura 15D, muestra que la ADX produce una disminución significativa de la ir-CRH en el PVN comparado con ratas control y “Sham” ($p < 0.01$, análisis de varianza ANOVA, seguida de un análisis *post hoc* Newman-Keuls).

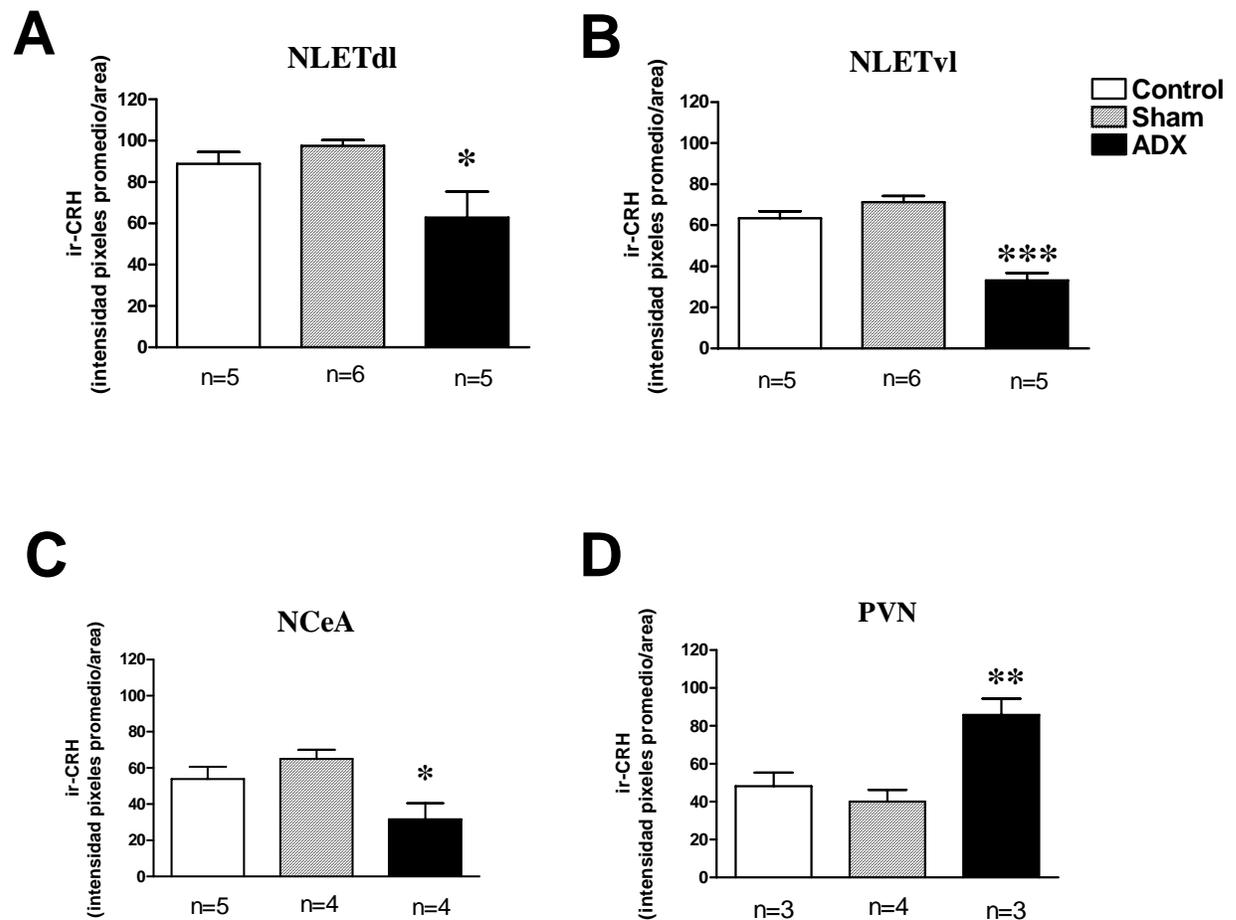


Figura 15. Efecto de la suprarrenalectomía en la inmunorreactividad péptido CRH. El análisis semicuantitativo muestra que la ADX produce una disminución significativa en la ir-CRH en el NLETdl, NLETvl y NCeA. Por el contrario la ADX produce un aumento significativo de ir-CRH en el PVN. Los resultados representan el promedio \pm EEM de 3 – 6 ratas tomadas como experimentos independientes (ANOVA seguido por Newman-Keuls). * $p < 0.05$ Ratras ADX comparado con ratas control y “Sham”, ** $p < 0.01$ Ratras ADX comparado con ratas control y “Sham”, *** $p < 0.001$ Ratras ADX comparado con ratas y “Sham”.

6.3.4 Efecto del ECI sobre la expresión de péptido de CRH.

En la Figura 16, se muestra la ir-CRH en animales control columna izquierda y animales sometidos a ECI columna derecha, en el NLET (A y B), PVN a diferentes alturas (C y D a -1.4 mm y E y F a -2.12 mm de Bregma), NCeA (G y H).

6.3.5 Análisis semicuantitativo del efecto del ECI en la expresión del péptido de CRH

6.3.5.1 Efecto del ECI en la expresión péptido CRH

Como se muestra en las Figuras 17A, 17B , 17 C, 17 D el ECI produce un aumento significativo de la ir-CRH en el NLETdl, NLETvl, NCeA y PVN comparado con ratas sometidas a estrés agudo por inmovilización (EAI) y ratas control ($p < 0.05$, análisis de varianza ANOVA, seguida de un análisis *post hoc* Newman-Keuls).

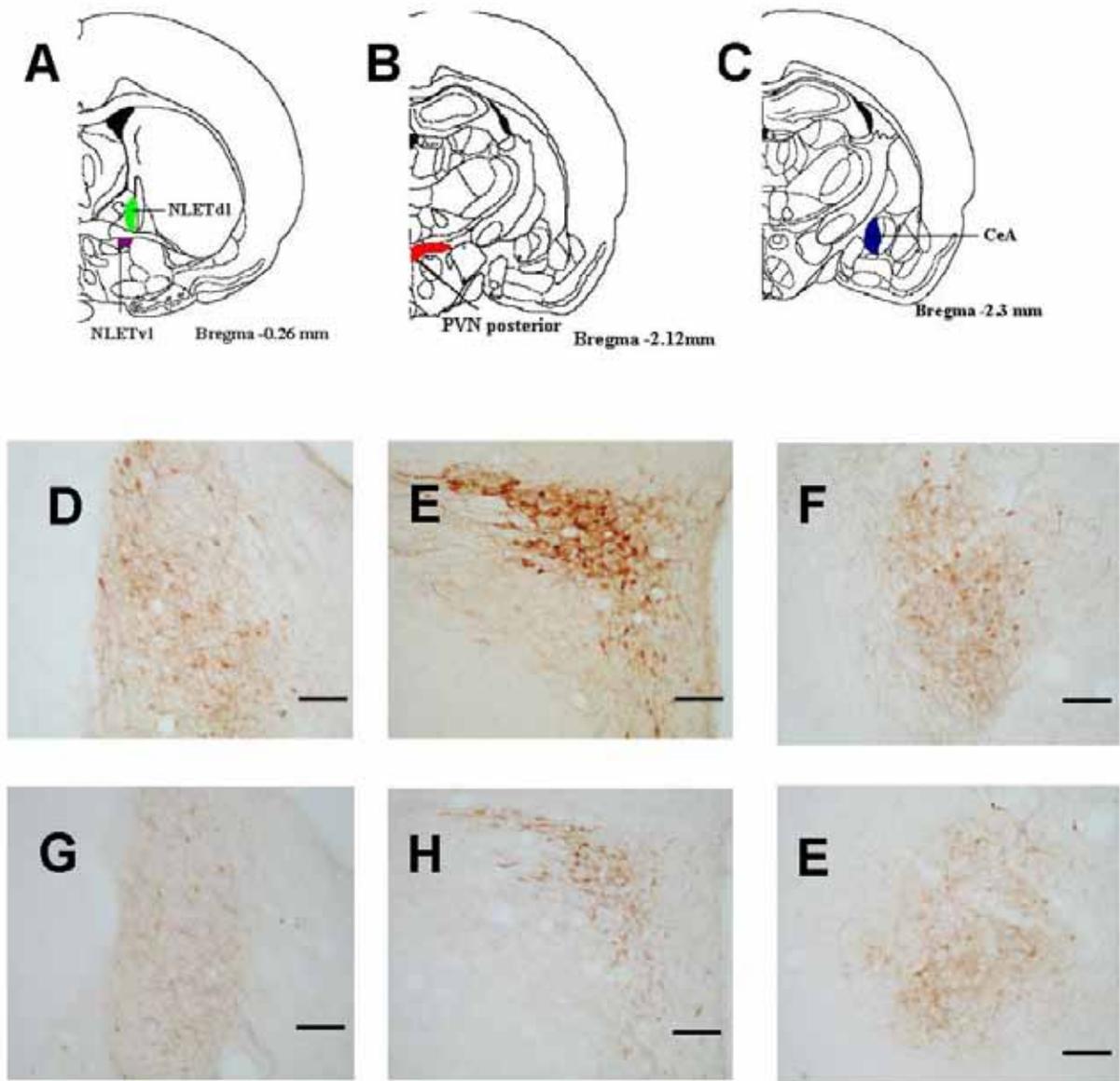


Figura 16. Efecto del ECI en la inmunorreactividad del péptido CRH. A), B) y C) Muestran un esquema de un corte coronal de rata que ilustra la región del NLETdl, PVN y NCeA que fueron estudiadas, respectivamente. (Paxinos and Watson, 1997). D) NLETdl ECI. E) PVN ECI. F) NCeA ECI. G) NLETdl control H) PVN control. I) NCeA control. Las fotografías fueron tomadas con un aumento del 20X, Barra de escala representa 100 μ m.

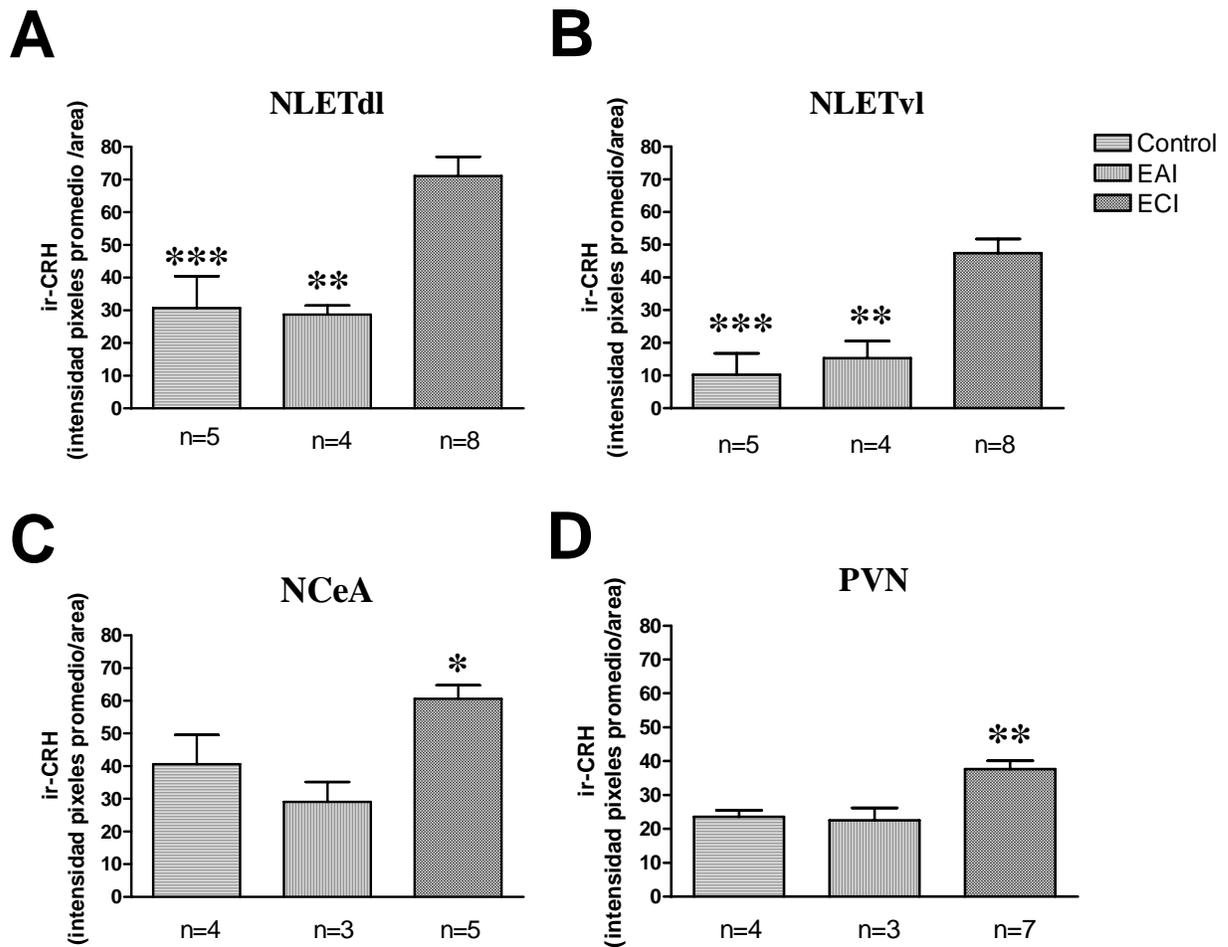


Figura 17. Efecto del ECI en la inmunorreactividad del péptido CRH. El análisis semicuantitativo muestra que el ECI produce un aumento significativo en la ir-CRH en el NLETdl, NLETvl, NCeA y PVN. Los resultados representan el promedio \pm EEM de 3 – 8 ratas tomadas como experimentos independientes (ANOVA seguido por Newman-Keuls). * $p < 0.05$, Ratas sometidas a ECI comparado con ratas control y EAI; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ratas control y EAI comparado con grupo ECI.

6.3.5.2 Efecto del DMI en la expresión péptido CRH

Como se muestra en las Figuras 18A, 18B, 18D la administración crónica de DMI durante 15 días de ECI evita el aumento de la ir-CRH en el NLETdl, NLETvl y PVN comparado con ratas control con vehículo y DMI, además de ECI con DMI ($p < 0.05$, análisis de varianza ANOVA, seguida de un análisis *post hoc* Newman-Keuls).

6.3.5.3 Comparación de la inmunorreactividad del péptido de CRH en el PVN en ADX y ECI

Como se muestra en las Figuras 19 la ir-CRH en el PVN es significativamente mayor en los animales ADX a los observados en animales sometidos a ECI ($p < 0.001$, prueba “test de Student”, no paramétrico).

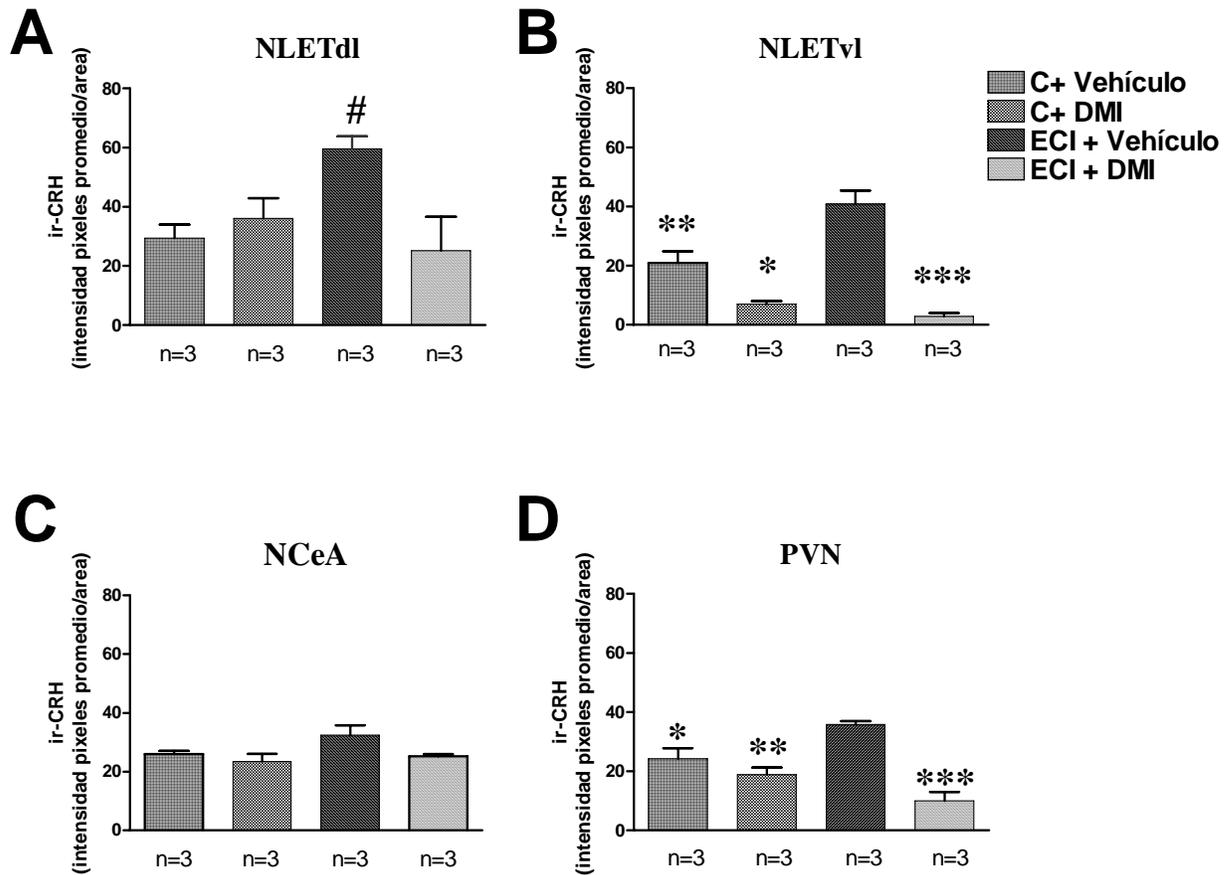


Figura 18. Efecto de la administración crónica de DMI en la inmunorreactividad del péptido CRH. El análisis semicuantitativo muestra que administración crónica de DMI durante 15 días de ECI evita el aumento de la ir-CRH en el NLETdl, NLETvl y PVN comparado con ratas control con vehículo, control DMI y ECI DMI. Los resultados se muestran como promedio \pm EEM de 3 ratas tomadas como experimentos independientes (ANOVA seguido por Newman-Keuls) # $p < 0.05$ Ratas ECI tratadas con vehículo comparado con ratas control tratadas con vehículo y con DMI, y ECI con DMI; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Ratas control tratadas con vehículo y con DMI, y ECI con DMI comparado con ratas ECI con vehículo.

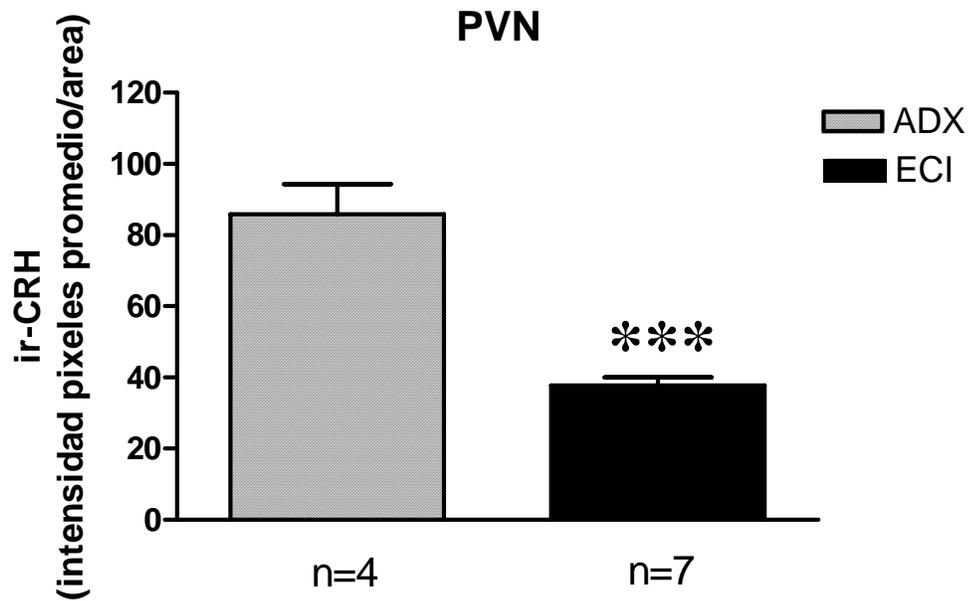


Figura 19. Comparación efecto ADX v/s ECI en la inmunorreactividad del péptido de CRH. El análisis semicuantitativo muestra que la ir-CRH es significativamente mayor en ratas ADX comparado con ratas con ECI en el PVN. Los resultados se muestran como promedio \pm EEM de 4-7 ratas como experimentos independientes, *** $p < 0.001$ mediante un test de student no pareado.

6.3.6 Análisis semicuantitativo de la inmunorreactividad del péptido de CRH en la eminencia media

6.3.6.1 Efecto de la ADX sobre la expresión de péptido de CRH.

Como se muestra en las Figuras 20 A la ADX produce una disminución significativa en la ir-CRH comparado con ratas control y “Sham” ($p < 0.05$, análisis de varianza ANOVA, seguida de un análisis *post hoc* Newman-Keuls).

6.3.6.2 Efecto del ECI sobre la expresión de péptido de CRH.

Como se muestra en las Figuras 20 B el ECI no produce cambios en la ir-CRH con ratas control.

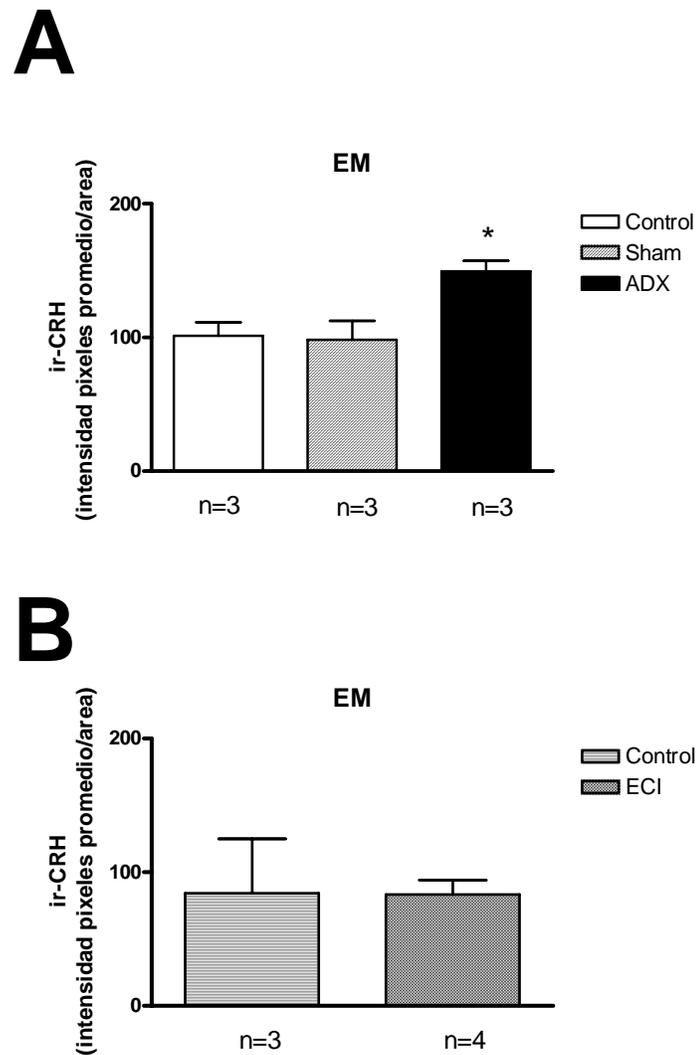


Figura 20. Inmunorreactividad del péptido de CRH en la eminencia media (EM).

Los resultados representan el promedio \pm EEM de 3- 4 ratas tomadas como experimentos independientes., A) El análisis semicuantitativo muestra que la ir-CRH es significativamente mayor en ratas ADX comparado con ratas control y “Sham” en la EM, * $p < 0.05$ análisis mediante un ANOVA seguido por Newman-Keuls, B) El análisis semicuantitativo no muestra cambios en la ir-CRH en ratas con ECI comparadas con ratas control

7 DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo de tesis muestran que las neuronas CRHérgicas del NLET y de la NCeA son reguladas por los niveles circulantes de glucocorticoides. En estos núcleos la ADX produce una disminución de la expresión del gen de CRH, en cambio en el PVN se produce un aumento de la expresión del gen de CRH. Por otra parte, el ECI que va acompañado de una hipertrofia de la glándula suprarrenal produce un aumento de la expresión del péptido CRH en el NLET dorsal y ventral lateral, NCeA y PVN. Los presentes resultados sugieren que los glucocorticoides ejercen un efecto excitatorio sobre la expresión de CRH en el NLET y de la NCeA, apoyando la hipótesis que el NLET y la NCeA tienen un papel relevante en la modulación de la actividad del eje HPA. Además, las condiciones experimentales utilizadas permiten cuantificar cambios en la expresión del ARNm y del péptido de CRH, así como evaluar cambios en parámetros fisiológicos como el peso corporal y de glándula suprarrenal.

7.1 Efecto de los diferentes tratamientos sobre los parámetros fisiológicos

Las ratas ADX experimentan una disminución significativa del peso corporal comparado con ratas “Sham”, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura (Gossellin y Cabanac, 1997). Por otra parte, el ECI produce una disminución significativa en el peso corporal comparado con ratas no estresadas, lo cual concuerda con los cambios inducidos por estrés por inmovilización en el peso corporal descritos en la literatura (Harris y cols, 1998). Además, el tratamiento con DMI durante 15 días no evita la disminución del peso corporal producido por el ECI.

Referente al efecto del ECI sobre la glándula suprarrenal, este produce un incremento significativo en el peso de la glándula, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura. La hipertrofia de la glándula suprarrenal va acompañada de un aumento en los niveles circulantes de corticosterona (Sadessal y cols, 1993; Makino y cols, 1995; Vyas y cols, 2002). Sin embargo, la administración concomitante de DMI durante los 15 días de inmovilización no evita el aumento del peso de la glándula suprarrenal producido por el ECI.

Cabe destacar que el cambio en los parámetros fisiológicos inducidos por el ECI son semejantes a las manifestaciones clínicas observadas en pacientes con depresión melancólica; incremento de cortisol (glucocorticoide), aumentó del tamaño de la pituitaria y de la glándula suprarrenal. En este sentido, se ha sugerido que estos cambios son secundarios a la hipersecreción de CRH en el cerebro que se observa como un aumento de CRH en el líquido cefalorraquídeo (Wong y cols, 2000; Slattery y cols, 2004).

7.2 Consideraciones metodológicas

Para el estudio de la expresión del ARNm de CRH se utilizaron sondas no marcadas isotópicamente que tienen las siguientes características: sensibilidad; libres de la exposición a radioactividad; largos períodos de vida; reproducibilidad; buena resolución celular y morfológica; permanencia del color en el tiempo; facilidad de la sonda para penetrar en los tejidos, etc. (Trembleau y Bloom, 1995). Además, a las condiciones establecidas para la técnica de HIS, se controla en forma estricta el pH de las soluciones de lavado, para evitar la floculación del $MgCl_2$ en un medio básico, también son reducidos los tiempos de incubación para la detección de las sondas, para evitar la formación *in situ* de complejos inespecíficos. Para controlar la especificidad de las sondas, se incubaron los cortes de cerebro con las sondas marcadas con DIG-UTP en

presencia de exceso de sondas no marcadas (100X), los resultados muestran ausencia de marca indicando un desplazamiento de las sondas marcadas por competencia con las no marcadas. Del mismo modo, se realizó otro control incubando los cortes de cerebro en ausencia de sonda marcada, los resultados muestran ausencia de marca. Estos controles indican que la marca obtenida con las sondas marcadas con DIG-UTP es específica.

En los estudios de HIS se observó marca para el ARNm de CRH, que se caracteriza por ser tipo perinuclear, la cual es típica en la utilización de esta técnica para detectar el ARNm, observándose una marca circular que rodea el núcleo, lo cual corresponde al ARNm que está en el citoplasma. (Trembleau y Bloom, 1995).

Para el estudio de la expresión del péptido de CRH se utilizó la técnica de inmunohistoquímica. Los factores que determinan la calidad de la marca y la posibilidad de observar diferencias en la intensidad de la marca son; la dilución del anticuerpo de CRH, el tiempo y la temperatura de incubación. Otro elemento importante es la utilización de una solución de bloqueo (3% de suero normal de cabra (GNS), 0.5 % Tritón X-100, 0.4% caragenina, 0.02 %, además del anticuerpo de CRH) adecuada, de esta manera se evita que el anticuerpo anti-CRH se fije de manera inespecífica a otras células y terminales nerviosos que no expresan CRH, favoreciendo la especificidad de la reacción, maximizando el contraste de color existente entre las células y terminales que expresan CRH comparado con el fondo. Este procedimiento permite además una buena relación marca/fondo que es fundamental durante el análisis semicuantitativo de la intensidad, lo cual permite obtener una mayor sensibilidad para detectar cambios producto de la desregulación del eje HPA inducida por la ausencia o por el aumento de actividad de la glándula suprarrenal.

7.3 Efecto de la ADX sobre la expresión de CRH

El análisis de los resultados muestra que la ADX, que va acompañada de la ausencia de corticosterona circulante, produce una disminución significativa del número de células que expresan el ARNm de CRH en NLETdl, con respecto a los animales control y “Sham”. Sin embargo, los animales ADX no muestran cambios en el número de células que expresan ARNm de CRH en NLETvl y PVN comparado con los animales control y “Sham”. En este sentido cabe mencionar, que otros autores han mostrado por HIS isotópica que la ADX de 15 días produce aumento de la expresión del ARNm de CRH en el PVN y no cambia la expresión del ARNm de CRH en el NLETdl y NLETvl de la rata (Makino y cols, 1994; Watts y Sánchez-Watts, 1995). Esta discrepancia puede deberse a las diferentes metodologías utilizadas y/o al tiempo de suprarrenalectomía. La cuantificación del número de células que expresan el ARNm de CRH está limitada por los niveles de sensibilidad, por lo cual una disminución sugiere una menor expresión dado que el nivel de sensibilidad no permite observar todas las células que expresan el ARNm de CRH. Por otra parte, el hecho que en el PVN no se observe el aumento del número de células que expresan podría ser un reflejo de que estamos en el máximo de sensibilidad, sugiriendo que estamos observando todas las células que expresan el ARNm de CRH, pero no permite evaluar los posibles cambios en la intensidad de la marca. Para evaluar si se producen cambios en la intensidad de la marca se realizó un análisis semicuantitativo de la intensidad de la marca del ARNm de CRH, analizándose solamente las áreas del NLETvl y PVN. Los resultados así obtenidos confirman que no hay cambio en el NLETvl. En cambio, muestran un aumento significativo de la intensidad de la marca del ARNm de CRH en el PVN comparado con los animales control y “Sham”, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura donde la ADX produce un aumento de la expresión del ARNm CRH en el PVN (Young y cols, 1986; Imaki y

cols, 1991; Tanimura y cols, 1998; Tanimura y Watts, 2000). En el caso del NLETdl, los algoritmos predeterminados del programa computacional no son capaces de distinguir entre marca y fondo, debido a la poca intensidad de marca que se observa después de la ADX. El conjunto de resultados muestran que el NLETdl y el PVN cambian en sentidos opuestos frente a la ADX, mientras que el NLETvl es menos sensible a la disminución de corticosterona.

El análisis de los resultados obtenidos por análisis semicuantitativo de la intensidad de la marca correspondiente a la ir-CRH, muestra que la ausencia de corticosterona circulante producto de la ADX, produce una disminución significativa de la expresión del péptido de CRH en ambos subnúcleos del NLET y la NCeA comparado con los animales control y “Sham”. En el caso del NCeA, se ha mostrado que la suprarrenalectomía de 15 días no cambia la expresión del ARNm de CRH (Makino y cols, 1994; Watts y Sánchez-Watts, 1995). Los resultados del presente trabajo muestran además, que la ADX induce un aumento significativo en la expresión del péptido de CRH en el PVN comparado con los animales control y “Sham”, corroborando evidencia previa obtenida por detección inmuno-radiográfica del péptido de CRH que muestra que la ADX induce un aumento de la expresión del péptido (Herman and Morrison, 1996). Estos resultados sugieren que la biosíntesis de CRH en el PVN esta determinada por la cantidad de ARNm disponible.

Los resultados del presente trabajo de tesis muestran que la suprarrenalectomía de 28 días disminuye la expresión del gen de CRH en el NLETdl y aumenta la expresión del gen de CRH en el PVN, sugiriendo que los glucocorticoides circulantes ejercen un control excitatorio sobre el gen de CRH en el NLETdl. Además, corroboran la hipótesis previa que establece que los glucocorticoides circulantes ejercen un control inhibitorio sobre la expresión del gen de CRH en el PVN (Makino y cols, 1994; Watts y Sánchez-Watts, 1995). Finalmente, cabe mencionar que

los presentes resultados corroboran la hipótesis que el NLET_{vl} es menos sensible a los niveles circulantes de glucocorticoides, lo que ha sido explicado por la menor densidad de receptores a glucocorticoides presentes en este subnúcleo del NLET (Makino y cols, 1994).

7.4 Efecto del ECI sobre la expresión del péptido de CRH

Los resultados obtenidos del análisis de la intensidad de la marca correspondiente a la ir-CRH en; los subnúcleos dorsal y ventral lateral del NLET, la NCeA y el PVN muestran aumento significativo de la ir-CRH en los animales sometidos ECI durante 15 días y sacrificados 24 hrs. después de la última sesión de estrés, comparado con animales sometidos a EAI y a animales no sometidos a estrés. Cabe mencionar, que éste es el primer estudio que evalúa cambios en la ir-CRH. Por otra parte, se ha reportado en la literatura que el ECI produce pérdida en el peso corporal acompañado de una hipertrofia de la glándula suprarrenal que induce un aumento de la corticosterona circulante (Sadessal y cols, 1993; Makino y cols, 1995; Vyas y cols, 2002).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el aumento de corticosterona circulante, inducida por el ECI, aumenta la ir-CRH en el NLET dorsal y ventral lateral y el NCeA. Estos resultados son consistentes con evidencia previa que muestra que un aumento significativo de la expresión del ARNm de CRH en estos núcleos después de la administración crónica de dosis altas de corticosterona (Makino y cols, 1994). Estos resultados en conjunto con los obtenidos en los animales ADX sugieren que la expresión de CRH en el NLET y el NCeA esta regulada en forma excitatoria por los corticoides circulantes. Sin embargo, es importante mencionar que el aumento de expresión del péptido, medido como el aumento de la ir-CRH, en estos núcleos corresponde tanto a cuerpos neuronales como a terminales nerviosos

que llegan desde otros núcleos del cerebro. Además, para corroborar esta hipótesis es necesario realizar el estudio de expresión del ARNm de CRH en los animales sometidos ECI. En el caso del PVN, el aumento de la corticosterona circulante, inducida por ECI, no es capaz de inhibir el aumento de ir-CRH en los somas de las neuronas CRHérgicas del PVN en condiciones de estrés sostenido, este aumento de CRH en los cuerpos neuronales no va acompañado de un aumento de CRH en los terminales CRH que se localizan en la eminencia media, sugiriendo un aumento del recambio de CRH, mecanismo que podría estar involucrado en el aumento de corticosterona circulante. En este sentido, se ha mostrado que el estrés crónico, pero no el estrés agudo, por descarga eléctrica en la pata induce un aumento en la expresión del ARNm de CRH en el PVN (Imaki y cols, 1991), sugiriendo que los glucocorticoides ejercen un control por retroalimentación positiva en condiciones de estrés crónico. En cambio, la ausencia de corticosterona inducida por la ADX muestra un aumento de la expresión del gen CRH en las neuronas del PVN que va acompañado de un aumento de la expresión del péptido en los terminales de la eminencia media. Este tipo de evidencia ha llevado a proponer que en ausencia de corticosterona disminuye la liberación de CRH al sistema portal, acumulándose en los terminales nerviosos de eminencia media (Vale y Creer, 1985; Young y cols, 1986). Sin embargo, para evaluar el recambio de CRH en condiciones de estrés sostenido es necesario estudiar la expresión del ARNm de CRH en el PVN. Por otra parte, se ha demostrado que el estrés agudo induce un aumento transitorio de la expresión del ARNm de CRH en el PVN, el cual regresa a niveles basales 4 horas después del estímulo estresante (Imaki y cols, 1991; Aguilera, 1998). De hecho, el aumento de la ir-CRH en el PVN es significativamente mayor en los animales ADX a los observados en animales sometidos a ECI.

Los pacientes con depresión melancólica muestran niveles de cortisol circulantes mayores que los pacientes sin depresión. Además, no responden a la prueba de supresión de cortisol inducida por la administración ya sea de dexametasona o de CRH. En este sentido, el modelo de ECI en ratas comparte ciertas características con la depresión melancólica, entre ellas el aumento de los glucocorticoides circulantes, el aumento de ir-CRH observado en el PVN en los animales sometidos a ECI. Más aun, los pacientes con depresión melancólica muestran niveles elevados de CRH y noradrenalina en el líquido cefalorraquídeo (Wong y cols, 2000). En este sentido cabe mencionar, que resultados obtenidos en el laboratorio por estudios de microdiálisis cerebral muestran un aumento de los niveles extracelulares basales de noradrenalina en el NLET en los animales sometidos a ECI. Además, resultados recientes muestran que el ECI (10 días) produce hipertrofia de las neuronas del NLET y del NBLA (Vyas y cols, 2002 y 2003), sin embargo no induce cambios en la NCeA (Vyas y cols, 2003), sugiriendo cambios persistentes en áreas específicas del sistema límbico que incluyen al NLET. Dado que uno de los objetivos del laboratorio es buscar modelos animales de depresión, y que el modelo de ECI muestra cambios tanto en la noradrenalina como el CRH, además de anhedonia, observada como disminución de la ingesta de alimentos, y cambios en conductas durante la prueba forzada que se utiliza para medir el efecto de los antidepresivos, se estudió el efecto de la administración de DMI, un antidepresivo que actúa inhibiendo la recaptación de noradrenalina, sobre la ir-CRH en animales sometidos a ECI. El tratamiento con DMI durante los 15 días de ECI disminuye significativamente la ir-CRH en el NLET dorsal lateral y ventral lateral y el PVN, comparado con los animales sometidos a ECI administrados con vehículo y no se observan cambios en el NCeA entre los diferentes grupos experimentales. En el NLETvl de los animales control administrados con DMI se observó una disminución significativa de la CRH-ir comparado con los animales control administrados con

vehículo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la administración de DMI evita el aumento de la ir-CRH inducido por el ECI, resultado que es consistente con evidencias reportadas en la literatura (Stout y cols, 2002). Además, la administración de DMI disminuye la ir-CRH en el NLETvl en condiciones basales en los animales control, dado que no se observa una disminución en el NCeA desde donde se ha propuesto que llegan una parte importante de los terminales nerviosos de CRH. Se requieren nuevos estudios para explicar este cambio en la ir-CRH en el NLETvl. Sin embargo, la administración de DMI no revierte la hipertrofia de la glándula suprarrenal, ni evita la disminución del peso corporal. Referente al mecanismo a través del cual la DMI evita el aumento o bien disminuye la ir-CRH aun no se conocen, Conti y cols. (2004) mostraron que la administración de antidepresivos a ratones silvestres induce una disminución en la expresión del ARNm de CRH en el PVN inducida por estrés agudo, este efecto no se observa en los animales deficientes del gen ICER. Además, esta disminución en la expresión del ARNm de CRH va acompañada de aumento en la expresión del factor de represor ICER. En este sentido, se requieren nuevos estudios para conocer los mecanismos que median el aumento de expresión del factor represor ICER tanto en animales controles como sometidos a estrés agudo y crónico.

8 Conclusiones

- 1.- La ADX disminuye significativamente la expresión del ARNm de CRH en el NLETdl, y de la ir-CRH en el NLETdl, NLETvl y NCeA, sugiriendo que en estas estructuras del sistema límbico el gen de CRH esta regulado por un mecanismo de retroalimentación positiva ejercido por los glucocorticoides circulantes.
- 2.- Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran la hipótesis dominante que establece que el gen de CRH en el PVN esta controlado por un mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por los glucocorticoides, tal como lo muestran el aumento de la expresión del ARNm y de la ir-CRH en el PVN y el aumento de la ir-CRH en la EM inducido por la ADX
- 3.- EL ECI aumenta la ir-CRH en el NLET, y la NCeA 24 horas después de la última sesión de estrés, efecto que no se observa después del EAI. Esta evidencia, sumado a la evidencia previa que muestra un aumento de la expresión del ARNm de CRH inducido por la administración de glucocorticoides (Makino y cols, 1994, 1995) sugieren que en estas estructuras del sistema límbico el gen de CRH esta regulado por un mecanismo de retroalimentación positiva ejercido por los glucocorticoides circulantes.
- 4.- El ECI aumenta la ir-CRH en el PVN, esta evidencia sumada a la evidencia previa que muestra que el estrés crónico por descarga eléctrica en la pata aumenta la expresión del ARNm CRH en el PVN (Imaki y cols., 1991), sugieren que el aumento de glucocorticoides inducido por el estrés crónico ejerce un control por retroalimentación positiva en el PVN.
- 5.- La administración crónica de DMI durante 15 días de ECI evita el aumento de la expresión de CRH en el NLET y el PVN.

9 Proyecciones

- Estudiar si los cambios inducidos por ECI constituyen cambios persistentes en el tiempo, para evaluar si corresponden a cambios de plasticidad.
- Analizar los efectos terapéuticos de la DMI y de otros antidepresivos sobre la expresión del gen de CRH en el PVN, NCeA y NLET, y abordar el estudio de los posibles mecanismos.
- Comparar los efectos producidos por el ECI y la administración crónica de drogas psicoestimulantes sobre la expresión de CRH en el NLET y NCeA.

10 BIBLIOGRAFIA

Aguilera, G. (1998) Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *TEM*. 9 (8), 329-335.

Akana, S. F., Jacobson, L., Cascio, C. S., Shinsako, J., Dallman, M. F. (1998) Constant corticosterone replacement normalizes basal adrenocorticotropin (ACTH) but permits sustained ACTH hypersecretion alter stress in adrenalectomized rats. *Endocrinology*. 122(4), 1337-1342.

Akil, H. A., Morano, M. I. (1995). Stress. In: Bloom, F. E., Kupfer, D. J.(Eds), *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. Raven press, New York, 773 – 785.

Andrés, M. E., Gysling, K., Araneda, S., Venegas, A., Bustos, G. (1996) NMDA-NR1 receptor subunit mRNA expression in rat alter 6-OH-dopamine induced lesions: A non-isotopic in situ hybridization study. *J. Neurosci. Res*. 46, 375-384.

Arborelius, L. Owens, M. J., Plotsky, P. M., Nemeroff, C. B. (1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol*. 160(1), 1-12.

Bertini LT, Kiss JZ. (1991) Hypophysiotrophic neurons are capable of altering the ratio of copack-aged neurohormones. *Neurosci*. 42; 237-244.

Brownstein, M. J., Palkovits, M. (1984) Catecholamines, serotonin, acetylcholine, and γ -aminobutyric acid in the rat brain: biochemical studies, in: Björklund, A., Hökfelt, T. (eds), *Handbook of chemical neuroanatomy*, vol 2, Elsevier. Amsterdam. 23–54 Part 1.

Burbach, J. P. (2002) Regulation of gene promoters of hypothalamic peptide. *Front in Neuroendocrinoly*. 23, 342-369.

Chalmers, D. T., Lovenberg, T. W., De souza, E. B. (1995) Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain. *J. Neurosci.* 15(10), 6340-6350.

Chalmers, D. T., Lovenberg, T. W., Grigoriadis, D. E., Behan, D. P., De souza, E. B. (1996) Corticotrophin-releasing factor receptors; from molecular biology to drug design. *Trends Pharmacol Sci.* 14, 166-172.

Chang, C. P., Pearsse, R. V., O'Connell, S., Rosenfeld, M. G. (1993) Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron.* 11(6), 1187-1197.

Chrousos, G. P., Gold, P. W. (1992) the concepts of stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis. *JAMA, J Am Med Assoc.* 267, 1244 – 1252.

Chrousos, G. P., Loriaux, D. L., Gold, P. W. (1988) Mechanisms of physical and emotional stress, vol. 245. Plenum, New York.

Conti, C. A., Kuo, Y-C., Valentino, R. J., Blendy, J. A. (2004) Inducible cAMP early repressor regulates corticosterone suppression alter tricyclic antidepressant treatment. *J Neurosci.* 24(8), 1967-1975.

Cooper, J. R., Bloom, F. E., Roth, R. H. T. (1986) The Biochemical Basis of Neuropharmacology, 5TH Edition, .226.

Coste, S.C., Kesterson, R. A., Heldwein, K. A., Steven, S. L., Heard, A. D., Hollis, J.H. (2000) Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotrophin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet.* 24, 403- 409.

Cullinan, W. E., Herman, J. P., Watson, S. J. (1993) Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.* 332, 1 – 20.

Dallman, M. F. Akana, S. F., Scribner, K. A (1992) Stress, feedback and facilitation in the hypothalamus pituitary adrenal axis. *J. Neuroendocrinol.* 4, 517-526.

Dautzenberg, F. M., Hauger, R. L. (2002) The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci.* 23(2), 71-77.

De Olmos, G. F., Alheid, G. F., Beltramino, C. A. (1985) Amygdala. In: G. Paxinos (Ed), *The Rat Nervous System. Forebrain and Midbrain, vol 1, Academic Press, Orlando*, 223-334.

Dong, H. –W., Petrovich, L. W., Swanson, L. W. (2001) Topography of projections from the amygdala to bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res. Rev.* 38, 192 – 246.

Dunn, A. J., Berridge, C. W. (1990) Physiological and behavioral response to corticotropin- releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress response. *Brain Res. Rev.* 15, 71- 100.

Dunn, J. D., Whitener, J. (1986) Plasma corticosterone response to electrical stimulation of the amigdaloid complex: cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology* 42, 211 – 217.

Feldman, S., Weidenfeld, J. (1998) The excitatory effects of the amygdala on hypothalamo– pituitary- adrenocortical response are mediate by hypothalamic norepinephrine, serotonin and CRF- 41. *Brain Res. Bull.* 45, 389 - 393.

Feldman, S., Weidenfeld, J. (2004) Involvement of endogenous glutamate in the stimulatory effect of norepinephrine and serotonin on the hypothalamo –pituitary-adrenocortical axis. *Neuroendocrinol.* 79, 43-53.

Furray, M. I., Gysling, K. (2004) Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res.Rev.* 47(1-3), 145 –160.

Furray, M. I., Gysling, K., Andres, M. E. Bustos, G., Araneda, S. (2000) Medullary noradrenergic neurons projecting to the bed nucleus of the stria terminalis express mRNA for the NMDA – NRI receptor. *Brain Res. Bull.* 52, 163 – 169.

Gray, T. S., Piechowski, R. A., Yracheta, J. M., Rittenhouse, P, A., Bethea, C. I., Van de kar, L. D. (1993) Ibotonic acid lesions of the bed nucleus of the stria terminalis attenuate conditioned stress-induced increases in prolactin, ACTH and corticosterone. *Neuroendocrinol.* 57, 517-524

Grigoriadis, D. E., Lovenberg, T. W., Chalmers, D.T., Liaw, C., De souza, E. B. (1996) Characterization of corticotropin –releasing factor receptor subtypes. *Ann. N. Y.Acad. Sci.* 780, 60-80.

Herman, J. P. (1992) Biological basis of the stress response. *Integr. Physiol. Behav. Sci.* 27, 66 – 83.

Herman, J. P., Cullinan, W. E. (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo- pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20, 78- 84.

Herman, J. P., Cullinan, W. E., Watson, S. J. (1994) Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J. Neuroendocrinol.* 6, 433 – 442.

Hsu, D. T., Chen, F. L., Takahashi, L. K., Kalin, N. H. (1998) Rapid stress-induced elevations in cortocotroin-releasing hormone mRNA in the rat central amygdala nucleus and

hypothalamic paraventricular nucleus: an in situ hybridization analysis. *Brain Res.* 788(1-2), 305-310.

Imaki, T., Nahan, J-L., Rivier, C., Sawchenko, P.E., Vale, W. (1991) Differential regulation of corticotropin- releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress. *J. Neurosci.* 11 (3), 585-599.

Jacobson, L., Sapolsky, R. (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev.* 12(2), 118-134.

Ju, G., Swanson, L. W. (1989) Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: I. Cytoarchitecture. *J. Comp. Neurol.* 280, 587 – 602.

Kadkol, S. S., Gage, W. R., Pasternack, G. R. (1999) In situ Hybridization- theory and practice. *Molecular diagnosis.* 4(3), 169-183.

Kasckow, J. W., Baker, D., Geraciotti, T. D. (2002) Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic stress disorder. *Peptides.* 22, 845-851.

King, B. R., Smith, R., Nicholson, R. C. (2002) Novel glucocorticoid and cAMP interactions on the CRH gene promoter. *MCE.* 194, 19-28.

Koob, G. F. (1999) Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol. Psychiatry.* 46, 1167-1180.

Kostich, W. A., Chen, A., Sperle, K., Largent, B. L. (1998) Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF₂ gamma receptor. *Mol Endocrinology.* 12, 1077-1085.

Loewy, A. D., McKellar, S. (1980) The neuroanatomical basis of central cardiovascular control. *Fed Proc.* 39(8), 2495-503.

Lovenberg, T. W., Chalmers, D. T., Liu, C., De souza, E. B. (1995) CRF2 α and CRF2 β receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology*. 139(9), 4139-4142.

Makino, S., Gold, P.W., Schulkin, J. (1994) Corticosterone effects on CRH mRNA the central nucleus of the amygdala and in the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus, *Brain Res*. 640, 105-112.

Makino, S., Hashimoto, K., Gold, P. W. (2002) Multiple feedback mechanism activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacology, Biochem and Behav*. 73, 147-158.

Makino, S., Smith, M. A., Gold, P. W. (1995) Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology*. 136(8), 3299-3309.

Moga, M. M., Saper, C.B.(1994) Neuropeptide-immunoreactive neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat, *J. Comp. Neurol*. 346, 137-150.

Mulders, W. H. A. M., Meek, J., Hafmans, T. G. M., Cools, A. R. (1997) Plasticity in the stress-regulating circuit: Decreased input from the bed nucleus of the stria terminalis to the hypothalamic paraventricular nucleus in winstar rats following Adrenalectomy, *Eu. J. Neurosci*. 9, 2462-2471.

Owens, M. J., Nemeroff, C. B. (1991) Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol. Rev*. 43(4), 425-473.

Paxinos, G., Watson, C. (1987) The rat brain in stereotaxic coordinates. Compact Third Edition, Academic Press Inc., Sydney.

Phelix, C. F., Liposits, Z., Paull, W. K. (1992) Monoamine innervation of bed nucleus of the stria terminalis an electron microscopic investigation. *Brain Res. Bull.* 28, 949 – 965.

Phelix, C.F., Liposits, Z., Paull, W.K (1994) Catecholamine-CRF synaptic interactions in a septal bed nucleus: afferents of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain. Res. Bull.* 33, 109-119.

Phelix, C.F., Paull, W.K. (1990) Demonstration of distinct corticotropin releasing factor-containing neuron populations in the bed nucleus of the stria terminalis. A light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat. *Histochemistry.* 94, 345-64.

Prewitt, C. M., Herman, J. P. (1997) Hypothalamo- pituitary- adrenocortical regulation following lesions of the central nucleus of the amygdala. *Stress.* 1, 173 – 185.

Prewitt, C. M., Herman, J. P. (1998) Anatomical interaction between the central amygdaloid nucleus and the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat: a dual trac- tracing analysis. *J. Chem. Neuroanat.* 15, 173 – 185.

Rivier, C., Plotsky, P. M. (1986) Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophyseal hormone secretion. *Annu Rev Physiol.* 48, 475-494.

Rivier, J., Rivier, C., Vale, W. (1984) Synthetic competitive antagonist of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. *Science.* 224(4651), 889-891.

Roder, S., Ciriello, J. (1994) Collateral axonal projections to limbic structures from ventrolateral medullary A1 noradrenergic neurons. *Brain Res.* 638, 182 – 184.

Saderssal, S. R., Abraham, M. E., Mascarenhas, J. F. (1993) Effects of stress on organ weigth in rats. *Indian J Physiology Pharmacol.* 37(2), 104-108.

Sakanaka, M., Shibasaki, T., Lederis, K. (1986) Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain Res.* 382, 213-238.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2TH Edition, Cold spring harbor laboratory press.

Slattery, D. A., Hudson, A. I., Nutt, D. J. (2004) Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. *Fundamental and clinical pharmacology.* 18, 1-21.

Smagin, G. N., Heinrichs, S. C., Dunn, A. J. (2001) the role of CRH in behavioral response to stress. *Peptides.* 22, 713-724.

Sofroniew, M. (1983) Direct reciprocal connections between the bed nucleus of the stria terminalis and dorsomedial medulla oblongata: evidence from immunohistochemical detection of tracer proteins. *J. Comp. Neurol.* 213, 399 – 405.

Stout, S. S., Owens, M. J., Nemeroff, C. B. (2001) Regulation of corticotropin-releasing factor neuronal system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity by stress and chronic antidepressant treatment. *J. pharmacol and experiment therapeut.* 300(3)1085-1091.

Suda, T., Tomori, N., Tozawa, F., Mouri, T., Demura, I., Shisume, K. (1984) Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin releasing factor in human tissues. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 459(5), 861-866.

Swanson, L. W., Simmons, D. M. (1989) Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 285(4), 413-435.

Swanson, S. J. Elliot, A. S. (2001) Sistema limbico. En: Wong – Riley, M. T. (ed) Secretos de las neurociencias: 305- 329. Mc Graw Hill interamericana.

Tafet, G. E., Bernardini, R. (2003) Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 7, 893-903.

Tanimura, S. M., Sanchez-Watts, G., Watts, A. G. (1998) Peptide gene activation, secretion, and steroid feedback during stimulation of rat neuroendocrine corticotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 139(9), 3822-3829.

Tanimura, S. M., Watts, A. G. (1998) Corticosterone can facilitate as well as inhibit corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 139(9), 3830-3836.

Tanimura, S. M., Watts, A. G. (2000) Adrenalectomy dramatically modifies the Dynamics of neuropeptide and *c-fos* gene response to stress in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinology*. 12, 715-722.

Trembleau, A., Bloom, F. E., (1995) Enhanced sensitivity for light and electron microscopy in situ hybridization with multiple simultaneous non-radioactive oligodeoxynucleotide probes. *J Histochem Cytochem*. 43(8), 829-841.

Vale, W. (1997) Corticotropin-releasing factor (CRF) family of ligands and their receptors. *The Endocrinologist*. 7, S3- S9.

Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., Rivier, J. (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*. 213(4514), 1394-1397.

Vale, W and Greer, M. (1985) Corticotropin releasing factor. *Fed. PROC. Fed. Am. Soc. Exp. Biol*, 145-263.

Vyas, A., Bernal, S., Cattarji, S. (2003) Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdale. *Brain Res.* 965, 290-294.

Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana, R., Cattarji, S. (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci.* 22(15), 6810-6818.

Walaas, Y., Fonnum, F. (1980) Biochemical evidence for glutamate as a transmitter in hippocampal efferents to the basal forebrain and hypothalamus in the brain. *Neuroscience.* 5, 1691 – 1698.

Watson Jr, R. E., Triano, R., Poukalos, J., Weiner, S., Block, C. H., Siegel, A. (1983) A (14 C) 2- deoxyglucose analysis of the functional neural pathways of the limbic forebrain in the rat. I. *The amygdale. Brain Res. Rev.* 5, 1 – 44.

Watts, A. G. (1996) the impact of physiological stimuli on the expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and other neuropeptide genes. *Frontiers in neuroendocrinology.* 17, 281-326.

Watts, A.G., Sanchez-Watts, G. (1995) Region-specific regulation of neuropeptide mRNAs in rat limbic forebrain neurons by aldosterone and corticosterone. *J. Physiol.* 484,721-36.

Weller, K. L., Smith, D. A. (1982) Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.* 232, 255 – 271.

Whitnall, M. H. (1993) Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol.* 40(5), 573-629.

Wisden, W., Morris, B. J., Hunt, S. P. (1991). In situ hybridization with synthetic DNA probes. In: Chad, J., Wheal, H. *Molecular neurobiology: a practical approach* oxford university press. Stress. 205-225.

Wong, M.I., Kling, M. A., Munson, P. J., Listwak, S., Licinio, J., Prolo, P., Karp, B., McCutcheon, L. E., Geraciotti Jr, T. D., DeBellis, M. D., Rice, K. C., Goldstein, D. S., Veldhuis, J. D., Chrousos, G. P., Oldfield, E. H., McCann, S. M., Gold, P. W (2000) Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotrophin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 325-330.

Young, W. S., Mezey, E., Siegel, R. E. (1986) Quantitative in situ hybridization histochemistry reveals increased levels of corticotropin-releasing factor mRNA after adrenalectomy in rats. *Neuroscience letters.* 70, 198-203.