



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**Impacto del estrés agudo en la proliferación, sobrevivencia y
apoptosis hipocámpica en ratas hembras con diferentes
condiciones endócrinas.**

T E S I S

QUE PRESENTA:

Biol. Exp. Aída Elizabeth Soto Medina

**PARA OBTENER EL GRADO DE
Maestro en Biología Experimental**

Codirector externo: Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena.

Codirector interno: Dr. Emilio Domínguez Salazar

Asesor externo: Dra. Nelly Maritza Vega Rivera

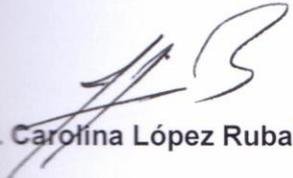
México D.F.

Agosto 2017

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 302005

Miembros del Jurado y las firmas correspondientes



Dra. Carolina López Rubalcava

Depto. De Farmacología, CINVESTAV

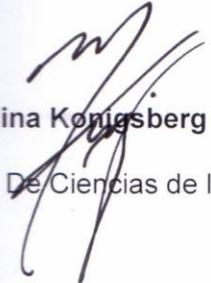


Dr. Gerardo Ramírez Rodríguez

Laboratorio de Neurogénesis, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Depto. De Ciencias de la Salud, UAM-I



Dra. Mina Königsberg Fainstein

Depto. De Ciencias de la Salud, UAM-I

Miembros del Comité Tutoral, tipo de participación y adscripción



Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena.

Codirector externo

Laboratorio de Psiconerofarmacología, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente

Dr. Emilio Domínguez Salazar

Codirector interno

Depto. De Ciencias de la Salud, UAM-I

Dra. Nelly Maritza Vega Rivera

Asesor externo

Laboratorio de Psiconerofarmacología, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente



Tabla de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ACTH: Hormona Adrenocorticotrópica

Akt: Ser/Thr proteína quinasa

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

CA: Cuerno de Amón

Cdk: Cinasas dependientes de ciclinas

CG: Capa granular

CM: Capa molecular

CORT: Corticosterona

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

CREB: Elemento de respuesta de unión al AMPc

DCX: Doblecortina

ECI: Modelo de estrés crónico impredecible

ERK/MAPK: Extracellular Regulated Kinases/Mitogen Associated Protein kinases)

FSH: Hormona folículo estimulante

FST: Prueba de nado forzado (por sus siglas en inglés forced swimming test)

GC: Glucocorticoides

GD: Giro dentado

GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía

GFAP: Proteína ácida de las fibras gliales

HHA: Eje hipotálamo-hipófisis-Adrenal

Hsp: Proteínas de choque térmico

LH: Hormona luteinizante

LTP: Potenciación a largo plazo

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NPV: Núcleo paraventricular

NT: Neurotrofinas

OVX: Ovariectomía

PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa

PIP₂: Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato

PIP₃: Fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato

RE: Receptores a estrógenos

REa: Receptores a estrógenos alfa

REb: Receptores a estrógenos beta

RG: Receptores a glucocorticoides

RM: Receptores a mineralocorticoides

SNC: Sistema Nervioso Central

Trk: Receptores Tirosina Cinasa

ZSG: Zona subgranular

ZSV: Zona subventricular

Resumen

El estrés es la respuesta del organismo ante la pérdida de la homeostasis ya que activa el eje Hipotálamo-Hipófisis-glándula Adrenal (HHA) liberando glucocorticoides (GCs) que le permiten al organismo adaptarse. La exposición intensa o prolongada a los glucocorticoides, se ha relacionado con alteraciones en el hipocampo, una estructura que además de expresar gran número de receptores para esta hormona, está involucrada con las emociones, la memoria, el aprendizaje y en donde ocurre de manera constitutiva la neurogénesis.

Es sabido que los ejes HHA e Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas (HHG) interactúan afectando los niveles de glucocorticoides, así como la expresión de sus receptores en el hipocampo, por tal motivo se propone que los niveles y tipo de hormonas gonadales son un factor que afecta la neurogénesis hipocampal ante el estrés y con ello el desarrollo de conductas depresivas. Siendo el estrés prolongado un factor relacionado con el deterioro de la neurogénesis, es de llamar la atención que los efectos reportados en individuos expuestos a una sola sesión de estrés no son consistentes y que estos varían según el tipo y la intensidad del estresor, así como las características y antecedentes del individuo.

Por tal motivo el presente trabajo evaluó el efecto del estrés agudo que induce la prueba de Porsolt también llamada prueba de nado Forzado (FST) sobre la proliferación, sobrevivencia y apoptosis de células hipocampales, así como el desarrollo de conductas tipo depresivas en ratas hembra que se encontraban en las fases de proestro-estro, donde los niveles de hormonas gonadales son elevados y en metaestro-diestro, fases caracterizadas por bajos niveles de hormonas gonadales. Aunado a esto, se evaluó un tercer grupo de animales que habían sido privados de

su principal fuente natural de hormonas gonadales a través de la ovariectomía, por lo que su condición endocrina es considerada como nula.

En cuanto a la parte conductual esta se determinó cuantificando las conductas de movilidad e inmovilidad que el animal mostró durante la FST, mientras que la proliferación celular, supervivencia temprana y apoptosis de las células hipocámpales se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica utilizando los marcadores Ki67, BrdU y Caspasa 3 respectivamente.

Los resultados obtenidos mostraron en la parte conductual una disminución de la conducta de desesperanza en animales en proestro-estro (hormona gonadal elevada) que fueron sometidos a una segunda sesión de nado forzado ($p \leq 0.05$), no así en los animales que se encontraban en metaestro-diestro (hormona gonadal baja) u ovariectomizados (sin hormonas gonadales), lo que nos lleva a corroborar el efecto neuroprotector que propone la presencia de las hormonas gonadales.

En cuanto a los niveles de corticosterona en sangre se observa un aumento en los animales sometidos a estrés que se encontraban gonadalmente intactos ($p \leq 0.01$), no así en los ovariectomizados que también fueron sometidos a estrés (ns) lo que nos lleva a proponer a las hormonas gonadales como factores que favorecen la activación del eje HHA ante el estrés.

En relación a la Neurogénesis, se observó un incremento en la proliferación celular de animales sometidos a estrés vs aquellos que no lo fueron, también llamados grupo control, dato significativo solo en los animales que se encontraban en las fases de proestro-estro (hormona alta) ($p \leq 0.001$), lo que nos lleva a proponer que la activación del eje HHA en presencia de hormonas gonadales favorece la proliferación de células hipocámpales.

Al comparar los grupos de animales no sometidos a estrés, los niveles de hormonas gonadales parecieran actuar de manera inversamente sobre la proliferación con diferencias significativas solo entre los animales ovx y en proestro-estro ($p < 0.05$), lo que sugiere la presencia de corticosterona a causa del estrés un factor que afecta la Neurogénesis de manera diferencial según la cantidad de hormonas gonadales presentes en el organismo.

En cuanto a la sobrevivencia temprana se observó disminución en los animales estresados respecto a su grupo control, valor significativo solo en los grupos que contaban con su fuente natural de hormonas gonadales ($p < 0.01$), esto y los datos presentados en la proliferación celular de animales en metaestr-diestro y ovx hace sugerir la ausencia de hormonas gonadales un factor que incapacita a los animales a contender con el estrés a nivel de la neurogénesis.

En el grupo de animales en proestro-estro (niveles de hormonas gonadales elevados) se observa que la FST es capaz de inducir la proliferación de células hipocampales no así la supervivencia de estas nuevas células, la cual se ve favorecida por la presencia de hormonas gonadales, no así por el estrés.

Al evaluar la apoptosis se observa que efectivamente es en el grupo en proestro-estro que fue sometido a la prueba de Porsolt donde se observa mayor muerte ($p < 0.001$); sin embargo, el número de cuentas está muy por debajo de la diferencia que resulta de la expresión de Ki67 y BrdU, por lo que se propone que estas células están en arresto en la fase G0 del ciclo celular, muy probablemente a consecuencia del estrés que induce la prueba de Porsolt.

Es así que proponemos a las hormonas gonadales femeninas como factores que disminuyen las conductas tipo depresivas, promueven la reactividad del eje HHA con el aumento de la corticosterona, incrementan la proliferación hipocampal incluso frente al estrés y proporcionan efecto neuroprotector respecto a la sobrevivencia

celular, que a pesar de verse disminuida por el estrés que induce la FTS, no se refleja en una muerte celular importante, haciendo suponer que las células proliferantes han sido arrestadas.

Abstrac

Stress is the body's response to the loss of homeostasis by activating the hypothalamic-pituitary-adrenal gland (HHA) axis by releasing glucocorticoids (GCs) that allow the body to adapt. Intense or prolonged exposure to glucocorticoids has been associated with alterations in the hippocampus, a structure that in addition to expressing a large number of receptors for this hormone, is involved with emotions, memory, learning and where it occurs in a constitutive way Neurogenesis.

It is known that the HHA and Hypothalamus-Pituitary-Gonadal (HHG) axes interact to affect glucocorticoid levels, as well as the expression of their receptors in the hippocampus, so it is proposed that levels and types of gonadal hormones are a factor that Affects hippocampal neurogenesis in the face of stress and with it the development of depressive behaviors. Since prolonged stress is a factor related to the deterioration of neurogenesis, it should be noted that the effects reported in individuals exposed to a single stress session are not consistent and that these vary according to the type and intensity of the stressor, as well as Characteristics and background of the individual.

For this reason, the present study evaluated the effect of acute stress that induces the Porsolt test also called forced swimming test (FST) on the proliferation, survival and apoptosis of hippocampal cells, as well as the development of

depressive type behaviors in female rats were in the stages of proestrus-estrus, where the levels of gonadal hormones are high and in metaestrus-diestro, phases characterized by low levels of gonadal hormones. In addition, we evaluated a third group of animals that had been deprived of their main natural source of gonadal hormones through ovariectomy, so that endocrine condition is considered to be null.

The behavioral part was determined by quantifying the mobility and immobility behaviors that the animal showed during FST, whereas cell proliferation, early survival and apoptosis of hippocampal cells were performed by the immunohistochemistry technique using Ki67, BrdU and Caspase 3 markers respectively.

The results showed a decrease in the behavioral part of hopelessness in animals in proestrus-estrus (high gonadal hormone), which were submitted to a second forced swimming session ($p \leq 0.05$), but not in the animals that were found (Low gonadal hormone) or ovariectomized (without gonadal hormones), which leads us to corroborate the neuroprotective effect of the presence of gonadal hormones.

Regarding blood corticosterone levels, an increase was observed in animals subjected to stress that were gonadally intact ($p < 0.01$), but not in the ovariectomized ones that were also subjected to stress (ns), which leads us to propose Gonadal hormones as factors that favor the activation of the HHA axis in the face of stress.

In relation to Neurogenesis, there was an increase in the cellular proliferation of animals subjected to stress vs those that were not, also called control group, significant data only in the animals that were in the phases of proestrus-estrus (high hormone) ($P < 0.001$), which leads us to propose that the activation of the HHA axis in the presence of gonadal hormones favors the proliferation of hippocampal cell.

When comparing groups of non-stressed animals, gonadal hormone levels appear to act inversely on proliferation with significant differences only between ovx and proestrus-estrus animals ($p < 0.05$), suggesting the presence of corticosterone due to Of stress a factor that affects the Neurogénesis of differential way according to the amount of hormones gonadales present in the organism.

As for early survival, there was a decrease in stressed animals compared to their control group, a significant value only in the groups that had their natural source of gonadal hormones ($p < 0.01$), this and the data presented in the cell proliferation of Animals in metaestrus-dexter and ovx suggest the absence of gonadal hormones a factor that incapacitates animals to cope with stress at the level of neurogenesis.

In the group of animals in proestrus-estrus (levels of elevated gonadal hormones) it is observed that FST is able to induce the proliferation of hippocampal cells and thus the survival of these new cells, which is favored by the presence of gonadal hormones, but not so for stress.

When evaluating apoptosis, it was observed that it was in the pro-estrus group that the Porsolt test showed the highest death ($p < 0.001$); However, the number of beads is well below the difference resulting from the expression of Ki67 and BrdU, so it is proposed that these cells are under arrest in the G0 phase of the cell cycle, most likely as a result of stress induced by Porsolt test.

Thus, we propose female gonadal hormones as factors that decrease depressive type behaviors, promote the reactivity of the HHA axis with the increase of corticosterone, increase hippocampal proliferation even in the face of stress and provide neuroprotective effect with respect to cellular survival in despite diminished by stress induced by FTS, is not reflected in a significant cell death, suggesting that proliferating cells have been arrested.

Índice

Miembros del Jurado y las firmas correspondientes	¡Error! Marcador no definido.
Miembros del Comité Tutoral, tipo de participación y adscripción	¡Error! Marcador no definido.
Tabla de abreviaturas.....	iv
Resumen.....	vi
Abstrac.....	x
Índice.....	xiv
Introducción.....	1
Antecedentes	3
Capítulo 1. Estrés y trastornos depresivos.....	3
1.1 Estrés	3
1.2 Diferencias entre estrés agudo y estrés crónico.....	3
1.3 Modelos animales de estrés para el estudio de trastornos depresivos.....	6
Capítulo 2. Hipocampo.....	10
Capítulo 3. El papel de los corticoides ante el estrés	12
3.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-glándula adrenal (HHA)	13
3.2 Glucocorticoides: receptores y funciones	14
3.3 Efecto de los Glucocorticoides en el Hipocampo.....	21
Capítulo 4. El papel de las hormonas sexuales ante el estrés.....	27
4.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas (HHG).....	27
4.2 Estrógenos: receptores y funciones.....	31

4.3 Influencia del género en la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA).....	32
4.4 Estrógenos y el estrés	35
Capítulo 5. Neurogénesis	36
5.1 El cerebro como un órgano dinámico	36
5.2. El Proceso Neurogénico en el cerebro adulto	38
5.3 Neurogénesis en el hipocampo	39
5.4 Factores que modulan la neurogénesis hipocampal.....	42
5.5 Efectos del estrés sobre la neurogénesis	44
5.6 Marcadores celulares	47
Capítulo 6. Ciclo celular y Apoptosis	50
6.1 Ciclo celular	50
6.2 Apoptosis.....	52
6.2 Factores que modulan la apoptosis	54
6.3 Fase de activación. Vía extrínseca	55
6.4 Fase de activación. Vía intrínseca	57
6.5 Fase de ejecución. Activación de caspasas	60
Capítulo 7. Vías de señalización relacionadas con la proliferación y supervivencia neuronal.	62
7.1 La vía ERK-MAPK	63
7.2 La vía PI3K-Akt.....	66
7.3 Alteraciones epigenéticas.....	69
Capítulo 8. Diseño de la investigación	70

8.1 Planteamiento del problema	71
8.2 Pregunta de investigación	72
8.3 Justificación	72
8.4 Hipótesis.....	73
8.5 Objetivo general.....	73
8.6 Objetivos particulares	73
Capítulo 9. Material y métodos.....	74
9.1 Animales.....	74
9.2 Metodología	74
9.3 Obtención y procesamiento de tejido.....	76
9.4 Medición de corticosterona en sangre.....	77
9.5 Inmunohistoquímica.....	77
9.6 Análisis estadístico	79
Capítulo 10. Resultados	80
10.1 Efecto de la exposición a la prueba de Porsolt sobre la conducta de inmovilidad	80
10.2 Efecto de la exposición a la prueba de Porsolt sobre los niveles de corticosterona.....	82
10.3 Efecto de la exposición a la prueba de Porsolt en la proliferación de células de nueva generación en el giro dentado (GD).	85
10.4 Efecto de la exposición a la prueba de Porsolt en la sobrevivencia temprana de células de nueva generación en el giro dentado (GD).	87

10.5 Efecto de la exposición a la prueba de Porsolt en la apoptosis de células de nueva generación en el giro dentado (GD).	90
Capítulo 11. Discusión	94
11.1 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la conducta de inmovilidad.....	94
11.2 Efecto de la prueba de Porsolt sobre los niveles de corticosterona.....	96
11.3 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la proliferación de células en el hipocampo adulto.	98
11.4 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la sobrevivencia temprana de células en el hipocampo adulto.	101
11.5 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la proliferación, sobrevivencia y muerte programada (apoptosis) de células en el hipocampo adulto.	103
11.6 Efecto de la prueba de Porsolt sobre el fenotipo de las células que sobreviven en CA3.	105
Capítulo 12. Conclusión	106
Capítulo 13. Bibliografía	108

Introducción

El estrés es la respuesta que tiene el organismo ante cualquier estímulo que afecte su homeostasis (Selye 1936; Pasqualini 2013). En niveles moderados es necesario ya que inicia mecanismos de auto-defensa mediante la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-glándula Adrenal (HHA) que ponen en estado de alerta al organismo, permitiendo se adapte y enfrente la situación que se le presenta (De Kloet 2009; Karatsoreos y McEwen 2013). Sin embargo, se ha visto que dependiendo de la intensidad y el tiempo de exposición al agente estresor, puede crearse la percepción de «no existe salida o remedio a la situación que se enfrenta», generando alteraciones hormonales y morfológicas que impactan en la función de ciertas áreas del sistema límbico, como el hipocampo (Gould y cols; 1999, Lee, 2012), la amígdala y la corteza prefrontal (Dedovic, 2009), incrementando la vulnerabilidad del individuo para desarrollar algún trastorno psiquiátrico como la depresión. Tal es el caso de la relación que existe entre la disminución del volumen hipocampal y el estrés crónico, (Duman 2004), no así en el estrés agudo, donde los reportes no son consistentes respecto a sus efectos en el cerebro y las conductas (Galea 1996, Gould 1997, 1998; Thomas y cols., 2006, 2007 Dagyte y cols., 2009; Kirby y cols., 2013, Vega-Rivera y cols., 2014).

Los ejes Hipotálamo Hipófisis Glándula Adrenal (HHA) e Hipotálamo Hipófisis Gonadas (HHG) interactúan afectando la morfología (Brown y Spencer 2013; Galea y

cols., 2014) y función neural (Carey y cols., 1995; Seale y cols. 2004; Toufexis, 2014), así como el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Dux y cols., 2015). En roedores hembras se ha observado que el estradiol y la progesterona son capaces de regular los niveles de hormona adrenocorticotropa (ACTH), corticosterona (Kalil y cols., 2013; Barbaccia y cols., 1996) y la expresión de receptores a glucocorticoides y mineralocorticoides en el hipocampo (Carey y cols., 1995; Torpy y cols., 1997; Hine y cols., 2004) afectando la neurogénesis (Falconer y Galea 2003; Ormerod y cols., 2003; Tanapat y cols., 2005; Galea y cols., 2006; Barker y Galea 2008; Pawluski y cols., 2009; Kirby y cols 2013; Bredemann y cols., 2014; Vega-Rivera y cols., 2014) y con ello el desarrollo de la conducta tipo depresiva.

Debido a que se ha reportado a los individuos del sexo femenino más propensos a desarrollar trastornos psiquiátricos asociados al estrés, tales como cuadros depresivos (Caraveo-Arduaga y cols., 1999; Bello y cols., 2005), se ha considerado que los niveles y el tipo de hormonas gonadales podrían ser un factor que contribuye a estas diferencias de género observadas en algunas etapas de la vida de la mujer; lo que sugiere la necesidad de evaluar el efecto del estrés agudo en hembras con diferentes condiciones endocrinas. Por lo anterior, el presente trabajo evaluó el efecto del estrés que implica la prueba de Porsolt en el desarrollo de conductas tipo depresivas y las alteraciones en la neurogénesis hipocampal que este produce en la rata hembra adulta asociada a diferentes condiciones endocrinas.

Antecedentes

Capítulo 1. Estrés y trastornos depresivos

1.1 Estrés

En 1936 aparece por primera vez la palabra estrés, definida por el Dr. Selye como *“toda reacción a cualquier estímulos que causa disturbio o interfiere con el equilibrio normal fisiológico del organismo”* (Selye 1956). Sin embargo, con la introducción del término alostasis (adaptación a través del cambio) por McEwen en 1993, podemos definir al estrés como una serie de reacciones fisiológicas que se activan como respuesta a un estímulo interno o externo que rompe con la homeóstasis del individuo y cuyo fin es restablecer el equilibrio fisiológico. Sin embargo, cuando este recurso es demasiado intenso o es activado por periodos prolongados, se manifiesta una falla en el proceso adaptativo, que puede derivar en un estado patológico manifestado por alteraciones conductuales (Caspi y cols., 2003) como ansiedad, depresión, falta de atención o memoria (Kelemen y cols., 2014; Bean y cols., 2014) y cambios somáticos como cansancio excesivo, problemas de sueño, malestares digestivos entre otros (Alani y cols., 2013).

1.2 Diferencias entre estrés agudo y estrés crónico

Según el tiempo de exposición al agente responsable de la pérdida de la homeostasis, también llamado agente estresor, el estrés puede clasificarse como

agudo o crónico. Se considera que el estrés es agudo cuando sin importar la intensidad del estresor, este se presenta en una sola exposición en la escala de minutos a horas sin ciclos de recuperación o re-exposición (Kirby, 2013). En tanto es considerado crónico cuando el tiempo de exposición al estresor es por un periodo prolongado y/o se presenta en repetidas ocasiones. Así considerando los criterios de exposición al estresor, un estrés agudo puede volverse crónico si el organismo se expone a él frecuentemente (Fuchs 1995).

En este sentido se ha observado que una sola exposición al estresor es suficiente para elevar considerablemente la concentración de Glucocorticoides (GCs) con respecto a su control (Tanapat y cols., 1998; Bilang-Bleue y cols., 2002; Seale y cols., 2004; Thomas y cols., 2006; Kalil y cols., 2013; Babb y cols., 2013; Vega-Rivera y cols., 2014), mientras que la exposición prolongada al mismo estresor, no parecieran modificar la concentración de GCs en plasma a largo plazo (Jöels y cols., 2007; Vega-Rivera y cols., 2014; Gadek-Michalska y cols. 2013). Lo que ha llevado a proponer que la exposición repetida a un estresor genera habituación en el individuo, tal vez, a consecuencia de la desensibilización del receptor que impide la retroalimentación del eje (Gadek-Michalska y cols. 2013).

A pesar que los niveles de GCs en el estrés crónico se han reportado permanecen cercanos a la basal (Jöels y cols., 2007; Vega-Rivera y cols., 2014), los efectos de éste en el organismo lo muestran más deletéreo que el agudo, afectando la morfología y función hipocampal al disminuir la densidad de axones, espinas

dendríticas y conexiones sinápticas, así como la producción de neurotransmisores y neurotrofinas necesarias para la proliferación, supervivencia y apoptosis celular (Wong y Herbert 2004; Heine y cols., 2004; Mirescu y Gould, 2006; McLaughlin y cols., 2007; Jöels y cols., 2007; Dągtyć y cols., 2009; Krugers y cols., 2010) que pudieran ser factor responsable de originar depresión y enfermedades neurodegenerativas (McEwen 2004) que se han asociado con la pérdida de volumen hipocampal (Duman 2004).

No se observa así en el estrés agudo, donde los efectos reportados no son completamente claros e incluso parecieran contradictorios, ya que estudios iniciales llevados a cabo en musarañas, monos titi y roedores, señalan que una sola exposición al agente estresor es suficiente para disminuir la proliferación de células de nueva generación en el giro dentado adulto (Galea 1996, Gould 1997, 1998) situación que no parece ser consistente con estudios posteriores en roedores donde se reportan cambios conductuales y elevados niveles de glucocorticoides sin modificación en la proliferación (Thomas y cols., 2006, Dągtyć y cols., 2009) pero con disminución en la supervivencia (Thomas y cols 2007), una publicación más reciente muestra un aumento en la proliferación hipocampal dorsal como respuesta al incremento en la concentración de glucocorticoides (Kirby y cols; 2013). En cuanto a la potenciación a largo plazo (LTP) responsable de la consolidación de la memoria, existen dos tendencias que se contraponen, una de ellas la que muestra el aumento de la corticosterona como un factor responsable de bloquear la LTP en el hipocampo

(Dubrovsky y cols., 1987; Filipini y cols., 1991) y otra que señala a este mismo factor, capaz de producirla (Filipini y cols., 1991; Pavlides y cols., 1993).

1.3 Modelos animales de estrés para el estudio de trastornos depresivos.

La necesidad de conocer la etiología de las enfermedades, así como su posible tratamiento, ha llevado a desarrollar modelos animales que permitan a través de manipulaciones experimentales en especies no humanas, reproducir y estudiar signos y/o síntomas de alguna patología, con la finalidad de extrapolar los resultados a humanos (Hua-Cheng y cols., 2010). En este sentido, los trastornos neuropsiquiátricos parecieran ser los modelos más complicados a desarrollar, ya que implican habilidades cognitivas propias de los humanos donde se involucran percepciones personales, ámbitos sociales, así como antecedentes de vida que son responsables de originar cierta vulnerabilidad o resiliencia para el desarrollo de patologías en la edad adulta (Abelaira y cols., 2013).

Es por esto que un modelo animal de depresión está basado en alteraciones conductuales, fisiológicas, moleculares y bioquímicas que permitan inducir en el animal conductas o signos tipo depresivos como la anhedonia y/o desesperanza, ambos síntomas propios de la depresión en humanos, por lo que ha sido necesario desarrollar criterios que permitan validar la homología que el modelo tiene con la realidad (Willner 1984; Belzung y Lemoine 2011).

Criterios de validez

Para que un modelo animal sea considerado como una herramienta útil para la investigación de las bases neurobiológicas de la depresión y su tratamiento farmacológico, es necesario cumpla con ciertos criterios de validación. A la fecha se han propuesto diversos criterios de validez (Belzung y Lemoine 2011), tal vez la clasificación más conocida y, por lo tanto, más usada es la de Willner (1984) quien propone los siguientes tres criterios: Validez de apariencia, validez de constructo y validez predictiva.

Validez de apariencia o "*face validity*". El modelo animal presenta manifestaciones conductuales similares a los síntomas observados en el paciente, como es la anhedonia (imposibilidad de sentir placer por cosas que antes eran agradables) y la desesperanza.

Validez de constructo u homología. El animal presenta cambios fisiopatológicos similares a los que ocurren en los humanos, tales como alteraciones en el ciclo de sueño, el sistema cardiovascular y las oscilaciones normales de hormonas como el cortisol y la vasopresina.

Validez predictiva. Permite pronosticar el efecto de un tratamiento en humanos a partir de lo que se observa en el modelo animal. Ejemplo la acción de los fármacos antidepresivos.

Con base en estos criterios de validez es que se han desarrollado muchos modelos animales de depresión, entre ellos el modelo de nado forzado.

La Prueba de nado forzado como un modelo de estrés agudo.

La Prueba de Nado Forzado (FST, por sus siglas en inglés *Forced swimming test*) fue propuesta por Porsolt en 1977 como una manera de evaluar la acción de fármacos en el tratamiento de la depresión, efecto que se muestra con la disminución de la conducta de desesperanza previamente inducida a roedores que fueron expuestos a un estresor intenso como es, forzarlos a nadar en un espacio restringido y sin escapatoria. Motivo por el que a esta prueba se le atribuyó inicialmente validez de tipo predictiva (Porsolt y cols., 1977).

Actualmente la Prueba de Nado Forzado también se emplea como inductor del estrés agudo (Calil y cols., 2006; Martínez-Mota y cols., 2011; Vega-Rivera y cols., 2014) ya que no solo ha mostrado validez tipo predictiva (Porsolt y cols., 1977; Estrada-Camarena y cols., 2003; Recamier-Carballo y cols., 2012), sino también, que induce conductas tipo depresivas (Drossopoulou y cols., 2004) como la desesperanza (Bielajew., 2003; Martínez-Mota y cols., 2011), daños en memoria espacial y procesos de atención (validez de apariencia) (Borsoi y cols., 2015), así como capaz de ocasionar alteraciones neuroquímicas (Kirby y cols., 1997; Drossopoulou y cols., 2004; Dalla y cols., 2008), endocrinas (Vega-Rivera y cols., 2013, 2014; Dalla y cols., 2005;) y morfológicas en el cerebro (Duman, 2004; Schmidt y Duman, 2007; Zaho y col 2008) (validez de constructo). Por lo que el presente

trabajo sugiere a la prueba de nado forzado como un modelo ideal para este estudio, ya que además de poseer validez predictiva también posee validez de apariencia y de constructo.

Capítulo 2. Hipocampo

El hipocampo es una estructura del cerebro relacionada con las emociones, la memoria y el aprendizaje (Galea y cols., 1997; Christie BR. y Cameron HA. 2006; Dedovic K. y cols., 2009; Zhao y cols., 2008). Se sabe que expresa gran número de receptores para glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos y andrógenos, así como conexiones excitatorias al núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) que le permite ejercer influencia sobre la activación del eje HHA (Handa y Weiser 2014) y probablemente también sobre el eje HHG.

Las áreas que comprenden la formación hipocámpica, son: 1) El Giro dentado (GD) formado por tres regiones denominadas capa molecular, zona sub-granular e hilus. Es la capa molecular una región formada de neuronas granulares que proyecta dendritas a la zona superficial y axones hacia la zona profunda denominada *hilus*. Entre la capa molecular y el hilus se encuentra la *zona sub granular (ZSG)*, una región de células madre con capacidad mitótica que al dividirse dan lugar a células de amplificación rápida capaces de migrar tangencialmente para empezar a diferenciarse en neuronas o células gliales (Ramírez-Rodríguez y cols., 2013). 2) El cuerno de Amón (CA) que se subdivide en cuatro regiones de nombre CA1, CA2, CA3 y CA4, formadas por células piramidales excitatorias. Es hacia la región de CA3 donde las neuronas recién sintetizadas del GD envían sus axones buscando integrarse a redes neuronales funcionales, a su vez, las neuronas de CA3 envían

proyecciones hacia la región de CA1 (Amaral y cols., 1990) y 3) La Corteza entorrinal, ubicada en la parte superior y anterior del lóbulo temporal, es una estructura anatómicamente fuera de lo que se considera el hipocampo, sin embargo fundamental en el funcionamiento de la formación hipocámpica. No contiene cuerpos neuronales, ya que está formada por fibras provenientes del hipocampo, amígdala y corteza prefrontal (vía perforante) por lo que es el principal punto de comunicación entre el hipocampo y el neocórtex, su función es recolectar a través de las 6 capas que la conforman, información de CA1 y el neocórtex, integrarla y enviarla al GD – CA3 y nuevamente CA1 (Ishizuka y cols., 1990). Fig 2.1

Se ha propuesto que a través de este circuito formado por proyecciones de GD – CA3 – CA1 – Corteza Entorrinal, el hipocampo ejerce influencia sobre la activación del eje HHA, determinando la naturaleza del estímulo por comparación con situaciones previas que le permiten discernir sobre su efecto en la actividad del eje HHA (Joseph-Bravo y Gortari, 2007). Es de mencionar que tanto receptores para mineralocorticoides (RMs) y receptores para glucocorticoides (RGs) se localizan únicamente en las células piramidales de CA1 y células granulares del GD, mientras que en el área de CA3 solo se expresan RMs (Joels 2006).

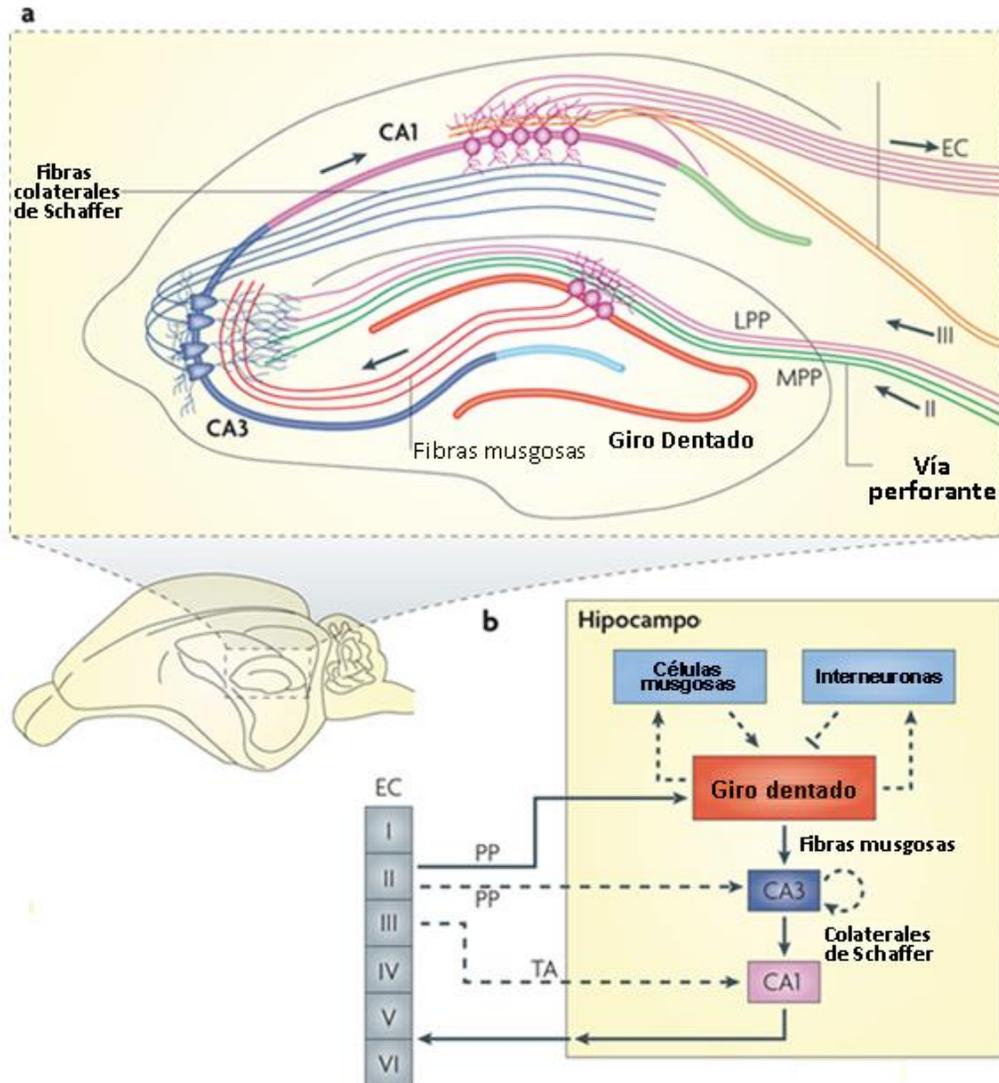


Fig.2.1 a) Circuito del hipocampo b) Diagrama de las conexiones que conforman el circuito del hipocampo. Parte de la información que el hipocampo recibe proviene de las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal (EC) que envía sus axones a través de la vía perforante (PP) hacia el giro dentado (GD), este a su vez, envía proyecciones a las células piramidales de CA3 a través de fibras musgosas. Las neuronas piramidales de CA3 envían sus axones a través de las colaterales de Schaffer hacia las neuronas piramidales de CA1 que a su vez envían información a la capa V y VI de la EC a través de sus axones.

Capítulo 3. El papel de los corticoides ante el estrés

3.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-glándula adrenal (HHA)

Ante un estímulo que el organismo detecte como amenazante, el sistema nervioso activa el eje HHA alertando al hipotálamo (Mc. Ewen 1999; Herman y cols., 2003; Chamadari, 2005; Gunnar y Quevedo 2007; Duval y cols., 2010) capaz de inducir la liberación de dos hormonas: la vasopresina u hormona antidiurética (AVP) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Ambos péptidos son transportados hacia la hipófisis, el primero vía axonal desde los núcleos paraventricular (NPV) y supraóptico (SO) hasta la neurohipófisis; el segundo por el sistema porta desde el NPV hasta la adenohipófisis donde de manera simultánea, pero independiente, estimulan la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) al torrente sanguíneo (Kassi y cols., 2012). Una vez liberada la ACTH viaja hasta las glándulas suprarrenales, donde estimula la síntesis y liberación de dos hormonas: 1) La adrenalina responsable de preparar al individuo para la lucha o huida y 2) Los glucocorticoides (GCs), cortisol en humanos y corticosterona en roedores, responsables de sostener los efectos de la adrenalina entre otros muchos factores.

La inhibición del eje HHA se inicia a partir de los mismos GCs liberados por el estrés, donde el proceso de retroalimentación negativa se lleva a cabo a través de receptores ubicados en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) capaz de inhibir la liberación de la hormona CRH y por consiguiente la secreción de ACTH,

regulando así su propia síntesis y liberación, apagando de esta manera la respuesta del eje HHA (Kassi y cols.,2012, Gunnar y Quevedo 2007, Mason y cols; 2006, Datson y cols; 2013, Anacker y cols; 2011). Sin embargo es la intensidad y/o el tiempo de exposición al estrés lo que determina la eficiencia de dicha inhibición, que en caso de no darse puede originar un estrés patológico (Duval y cols., 2010; Lee 2012).

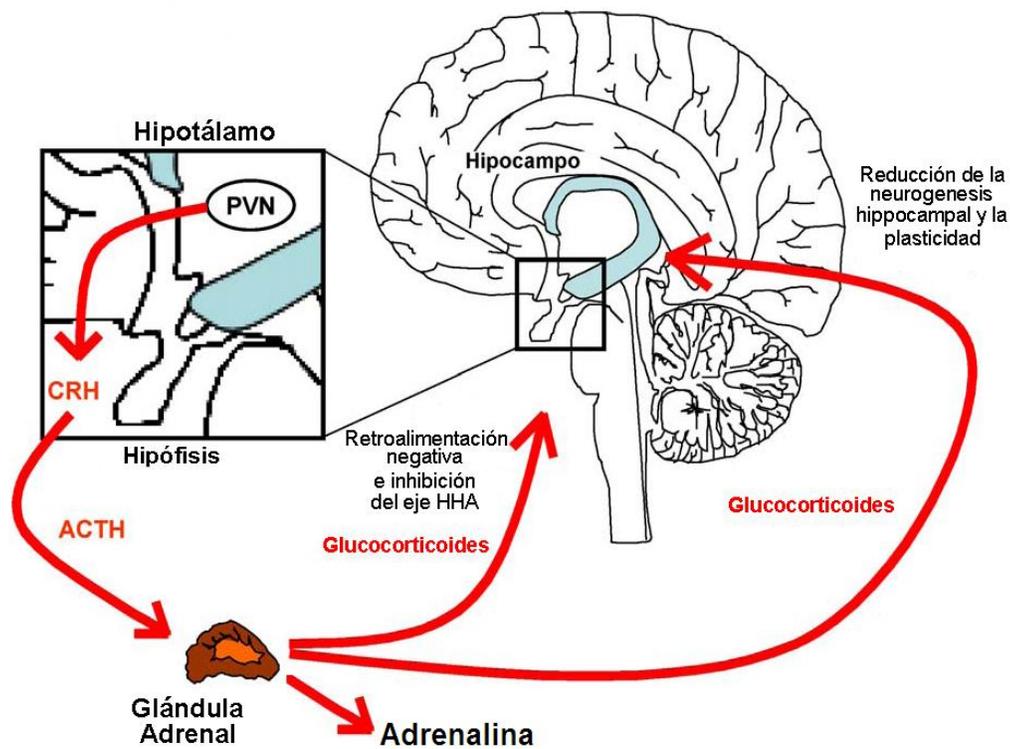


Fig.3.1 A partir de un estímulo que el cerebro detecta como estresante, el sistema nervioso autónomo envía la señal al Núcleo paravenricular del hipotálamo (NPV) que secreta CRH hacia la adenohipófisis, glándula encargada de la síntesis y liberación de la hormona ACTH al torrente sanguíneo lo que trae como consecuencia la estimulación de la glándula adrenal para la liberación de dos hormonas: la adrenalina responsable de la respuesta rápida ante el estrés y los glucocorticoides (GCs) responsables de sostener los efectos de la adrenalina entre otros muchos factores. El aumento en los niveles de GCs plasmáticos es señal para iniciar una retroalimentación negativa al eje HHA. Es importante mencionar que para efectos de este estudio no se hablará de los efectos de la adrenalina. Tomado y adaptado de Anacker y cols., 2011.

3.2 Glucocorticoides: receptores y funciones

Las acciones de los GCs en el organismo son pleiotrópicas, incluso en niveles basales regulan la transcripción de diversos genes al activar segundos mensajeros vía receptores membranales, al actuar como factores de transcripción a través de sus receptores citoplasmáticos (Schmid y cols. 2004) o al originar alteraciones epigenéticas (Papadopoulos y cols., 2009; Bagot y cols., 2014; Saunderson y cols., 2016). Únicamente en el cerebro estas acciones se han identificado como capaces de regular la producción y liberación de monoaminas (Duval y cols., 2006; de Quervain y cols., 2007; Schutsky y cols 2011), la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (Kerr y cols., 1992) responsables del fortalecimiento de la memoria y el aprendizaje mediante la potenciación a largo plazo (LTP) (Kumar 2011; Krugers y cols., 2010), además de la producción de neurotrofinas como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Duval y cols., 2010) y factores de crecimiento de fibroblastos (Kirby y cols., 2013). Lo que afecta al crecimiento celular, la diferenciación, plasticidad y apoptosis (Lupien y McEwen 1997; Schmid y cols., 2004).

Estas acciones de los GCs en el organismo están medidas por dos tipos de receptores, los intracelulares responsables de acciones genómicas y los membranales acoplados a proteínas G

Receptores intracelulares

Debido a su origen esteroideo los glucocorticoides atraviesan la membrana de las células blanco para unirse a receptores ubicados en el citoplasma de la célula (De Kloet 1991; Gunnar y Quevedo 2007). La interacción de la hormona glucocorticoide con su receptor forma un complejo hormona-receptor que se trasloca al interior del núcleo donde se une a elementos de respuesta en el ADN actuando como factor de transcripción capaz de regular eventos como la proliferación, diferenciación, muerte celular (apoptosis) e incluso la retroalimentación negativa del eje (Lupien y McEwen 1997; Gunnar y Quevedo 2007; Jöels 2006) (fig.2). Estos eventos, algunos contradictorios, dependerán de la cantidad de GCs liberados (Lupien y McEwen 1997; Schmid y cols., 2004; Jöels 2006; Kirby y cols., 2013).

Se han descrito dos tipos de receptores citoplasmáticos para los GCs: el receptor para mineralocorticoides (RMs) o tipo I y el receptor para glucocorticoides (RGs) o tipo II (Lupien y Mc Ewen 1997; Joels 2006; Tasker y cols., 2006; Gunnar y Quevedo 2007; Anacker 2011). Ambos expresados en el NPV y otras regiones del cerebro relacionadas con la modulación de la respuesta al estrés como son: el hipocampo, la amígdala, los núcleos del lecho de la estría terminal, el área preóptica medial, el núcleo del tracto solitario, corteza prefrontal, núcleo del rafé y núcleo supraquiasmático (Handa y Weiser 2014).

Empleando agonistas y antagonistas selectivos para ambos receptores se ha demostrado diferente afinidad por su ligando. En niveles basales propios del ciclo

circadiano, los GCs se unen preferentemente a los RMs encargados de mantener la homeostasis en el individuo (Joels 2006; Gunnar y Quevedo 2007; Oitzl y cols., 2010), pero si estos niveles aumentan a consecuencia de la activación del eje HHA, los GCs comenzaran a ocupar a los RGs iniciando efectos reactivos en el organismo propios de la alostasis (Joels 2006; Gunnar y Quevedo 2007, Mason y cols. 2006), que pueden derivar en dos situaciones: 1) Poner a salvo al individuo con la subsecuente retroalimentación negativa del eje HHA, facilitando la recuperación de la homeostasis (Gunnar y Quevedo 2007), o 2) convertirse en estrés patológico afectando diferentes partes del organismo.

Pareciera ser que ambos receptores tuvieran efectos opuestos en el organismo, ya que mientras los RMs se han asociado con el funcionamiento óptimo de los neurotransmisores, el manteniendo del ritmo circadiano y la presión arterial (Sapolsky y cols. 2000), la disponibilidad de glucosa en el cerebro así como una eficiente potenciación a largo plazo (LTP) con poca afluencia de calcio (Kerr y cols. 1992; Karst y cols. 2000), la activación de los RGs a consecuencia del estrés aumentan la capacidad de respuesta de la serotonina (Hesen y Joels 1996) reduciendo la actividad del receptor beta adrenérgico (Joëls y De Kloet 1989) e inhibiendo la formación de neurotrofinas, además de aumentar la presión arterial, inhibir la utilización de glucosa en el cerebro e incrementar los niveles de calcio intracelular (Jöels, 2006).

Es importante destacar que la activación de ambos receptores no son eventos independientes ya que la ocupación de los RGs inicia mucho antes de que se alcance la saturación de los RMs (Daimond y cols. 1992; Kupieny McEwen 1997; Jöels 2006).

Esta propuesta sobre la activación diferencial de ambos receptores citoplasmáticos para GCs fue inicialmente hecha por Daimond en 1992, donde él y su grupo mostraron evidencia de un efecto bifásico en la LTP dependiente de la concentración de corticosterona, lo que llevó a proponer un efecto dual por parte de los RGs, en donde dichos efectos describen una gráfica en forma de U invertida (Lupien y McEwen 1997; Joels 2006; Dirk-Jan y Erno 2014), siendo la primera parte de la gráfica y hasta el techo, la correspondiente a la activación de los RMs, capaces de estimular la proliferación y plasticidad neuronal como parte del proceso de alerta, mientras que la segunda parte después del techo, corresponde a la activación de los RGs responsables de la disminución de la intensidad de los efectos en el organismo con subsecuente inhibición del eje, que de no llevarse a cabo, inicia procesos deletéreos como ocurre en el estrés crónico (Lupien y McEwen 1997; Dirk-Jan y Erno 2014).

Es en el techo de la gráfica donde algunos efectos benéficos para el organismo parecieran llevarse a cabo. Tal es el caso de la proliferación neuronal (Kirby y cols., 2013) y la óptima LTP que origina una consolidación en la memoria y mayor aprendizaje (Ruetti y cols., 2008; De Kloet y cols., 1999).

Es así, que aquellos mecanismos que preparan al organismo para contender con la pérdida de la homeostasis se ven favorecidos con el aumento agudo y hasta cierta cantidad de GCs, mientras que la elevación o administración crónica previa al aprendizaje, deteriora la evocación de la información previamente adquirida (Ruetti y cols., 2008). De esta manera las emociones con las que procesamos los eventos, funcionan como un sistema de filtro, seleccionando los hechos que por su significado emocional serán guardados en nuestra memoria de forma más duradera (Rodríguez y cols., 2004), lo cual resulta ventajoso desde el punto de vista evolutivo y en el ámbito de la enseñanza-aprendizaje.

Receptores membranales

Las acciones genómicas de los glucocorticoides en el organismo no son las únicas, pero si las más estudiadas. En el año 2000 se demostró la existencia de receptores membranales acoplados a proteínas G, sensibles a GCs responsables de mediar los efectos rápidos de estas hormonas en el sistema nervioso central (Evans y cols., 2000). Dichos efectos pueden ser de tipo excitatorio si actúan a nivel del locus coeruleus, la formación reticular caudal, la región ventrolateral de la vía rostral migratoria (RVLM) (Rong y cols., 1999) y el tallo cerebral, o de tipo inhibitorio si afecta a las neuronas de la formación reticular rostral o a las corrientes de Calcio (Ca^{2+}) dependientes de voltaje (Tasker y cols., 2006).

Estos efectos vía receptores membranales se consideran rápidos, pues se activan en fracciones de segundos, mientras que las genómicas en su mayoría, se

producen en un plazo de 5 a 10 min después de la activación del receptor y puede durar desde minutos hasta días, dependiendo de si existe la exposición continua a la hormona o solo un pulso (Oitzl y cols., 2010). Por tal motivo, se propone que tanto la activación del eje HHA así como la retroalimentación inhibitoria y cese de sus efectos en el estrés agudo, es una mezcla entre procesos rápidos atribuibles a receptores acoplados a proteínas G (Tasker y cols., 2006) y la activación de los genes que codifican las enzimas correspondientes (Fritz y cols. 1986; Aluru y Vijayan 2009).

Si la inhibición del eje HHA a partir de la retroalimentación negativa no sucede como es el caso del estrés es crónico, los efectos en el organismo se vuelven deletéreos debido a la prolongada sobredemanda de recursos y a la inhibición de la secreción de moléculas (ejemplo neurotrofinas) que el organismo considera innecesarias en situaciones de alerta, activando así factores que inician mecanismos responsables de la muerte celular y disminución de la LTP ocasionando deterioro en la memoria y el aprendizaje (Park y cols., 2015). Estos efectos reversibles o no, tienden a ser más dañinos que los ocasionados por el estrés agudo, donde el efecto va a depender de la cantidad de glucocorticoides liberados, afectando principalmente la plasticidad neuronal (Mc Ewen 1999, 2001,2013; Duman 2004; McLaughlin y cols 2007; Jöels y cols., 2007; Krugers y cols., 2010; Marsden 2013)

3.3 Efecto de los Glucocorticoides en el Hipocampo

En condiciones basales, los GCs son un factor que afecta la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de neuronas hipocámpicas, además de intervenir en la plasticidad dendrítica, modificando la memoria y las emociones (McEwen 1999; Kloet y cols., 1999; Dedovic y cols., 2009; Duval y cols., 2010; Joseph-Bravo y Gortari 2011; Anacker y cols., 2013). Se ha visto que estas afectaciones, hasta cierto punto normales, pueden ser alteradas a consecuencia del estrés, originando modificaciones que van a depender de la cantidad y tiempo en que los GCs son liberados, el tipo y número de receptores activados, así como la región hipocámpica afectada.

Si a lo anterior sumamos los recursos propios que cada organismo tiene para contender con el estrés, podemos entender porque los efectos del estrés agudo son tan variados y hasta cierto punto contradictorio.

Por tal motivo, se propone que el aumento en la concentración de los GCs en el estrés agudo, que va más allá del techo de la U invertida ya sea por intensidad o tiempo, es capaz de disminuir la proliferación (Tanapat y cols., 1998; Bain y cols., 2004) y/o la sobrevivencia celular basal del GD (Vega-Rivera y cols., 2013), así como la densidad de espinas dendríticas en CA1 y CA3 (Krugers y cols., 2010; 2008; Llorens-Martín y cols., 2007 Duman 2004), afectando la síntesis y liberación de neurotransmisores y hormonas responsables de desarrollar conductas de

afrontamiento (Morilak y cols., 2005) presentándose trastornos como falta de atención, daños en la memoria y aprendizaje, problemas de sueño, ansiedad, depresión e incluso estrés post-traumático.

Por el contrario, si la concentración de los GCs liberados como respuesta al estrés agudo es alta, pero no lo suficiente para generar daño, existe la posibilidad de un aumento en la proliferación de células de nueva generación en la región dorsal del hipocampo (Kirby y cols., 2013) con aumento en la potenciación a largo plazo lo que favorece el aprendizaje y consolidación de la memoria (De Kloet y cols., 1999), así como el desarrollo de conductas relacionadas con el estado de alerta y lucha o huida (Heale y cols., 1994; Sapolsky y cols., 2009; Wang y cols., 2007).

Efectos muy diversos a los anteriormente señalados se presentan en el estrés crónico, donde el aumento sostenido en la liberación de GCs, sin una retroalimentación que apague la actividad del eje HHA, es un factor crucial en el daño al hipocampo, afectando el proceso neurogénico a través de la activación prolongada de los RGs responsables de inhibir la síntesis de neurotrofinas, aumentar la concentración de Glutamato, Ca^{2+} intracelular e interleucinas, lo que conduce a la muerte celular programada llamada apoptosis (Leonard 2005) con subsecuente disminución del volumen hipocampal (Duman, 2004; Schmidt y Duman, 2007; Zaho y col 2008).

Se ha visto que las alteraciones en el hipocampo durante el estrés crónico se han relacionado con el deterioro en la memoria verbal declarativa, el aprendizaje y el desarrollo de cansancio emocional y laboral, además de síntomas de despersonalización o bajo rendimiento cognitivo junto con angustia, palpitaciones, taquicardia, pinchazos en el pecho, hipertensión arterial, aumento de glucosa y lípidos en sangre, contracturas musculares, así como problemas de sueño y en el manejo de emociones que pueden desembocar en infarto o alguna enfermedad psiquiátrica como la depresión (Anacker, 2011), incluso se ha observado que la pérdida de la respuesta rápida de glucocorticoides sobre el eje HHA (receptores membranales), mediada en parte por el hipocampo, se presenta en seres humanos con depresión y en animales sometidos a estrés crónico (Sapolsky y cols., 1986; Young y cols., 1991; Liberzon y cols., 1997), lo que lleva a proponer al estrés crónico como más dañino que el estrés agudo.

En caso de no existir un efecto inhibitorio del eje HHA como sucede en el estrés crónico, los efectos de alerta disminuyen así como los niveles de GCs plasmáticos, muy probablemente por el daño y probable internalización de los receptores, estableciéndose alteraciones en las células del hipocampo que pueden originar enfermedades psiquiátricas como ansiedad o depresión (Schmidt y cols., 2004; Oitzl MS y cols., 2009). Esta regulación de los receptores por los propios GCs es importante en la modulación de la respuesta de estrés prolongada.

En este sentido se han propuesto dos teorías para explicar el daño generado en el cerebro a consecuencia del estrés crónico. La primera, llamada “hipótesis de la cascada de glucocorticoides” propone que los niveles elevados de GCs responsables del daño al hipocampo pueden producir una discapacidad en los mecanismos de retroalimentación para suprimir la liberación de dicha hormona, llevándose a cabo un proceso de retroalimentación positiva (Sapolsky y cols. 1986). La segunda teoría, complementaria de la primera, propone que estos daños pueden deberse a anomalías en la función de los RGs y no solo a los niveles elevados de GCs (Schmidt y cols., 2004; Oitzl MS y cols., 2009).

Estudios realizados en animales muestran que la lesión del hipocampo se asocia a la hipersecreción de glucocorticoides durante la activación del eje HHA en respuesta al estrés (Feng y cols., 2014; Dirk-Jan y Erno 2014; Krugers y cols., 2010; Zaho y cols., 2008; Duman 2004; Lupien y Mc Ewen 1997) y por ende, a la activación de mayor número de RGs que pueden detenerse tras la estimulación del hipocampo (Bouille y Bayle 1973; Rubin et al. 1966; Mandell et al. 1962; Slusher y Hyde 1961), lo que es de llamar la atención pues tradicionalmente se ha atribuido al hipocampo como responsable de llevar un efecto inhibitor sobre el eje HHA (Joseph-Bravo y Gortari, 2007).

Sin embargo, un estudio realizado por Dunn y Orr en 1984 muestra un efecto diferencial entre las regiones hipocampales de ratas anestesiadas, donde usando estimulación eléctrica se observa que las regiones de CA3 y GD son capaces de

disminuir los niveles de corticosterona en plasma, no así la estimulación de CA1, responsable de incrementar la concentración de corticosterona (Dunn y Orr 1984), lo que sugiere efectos tanto excitatorios como inhibitorios del hipocampo sobre el eje HHA.

Biodisponibilidad de los GC en el cerebro.

La biodisponibilidad de los GCs y por lo consiguiente la activación de los RMs y RGs no solo depende de la activación del eje HHA o de la administración farmacológica de esteroides como lo puede ser la dexametasona o prednisolona por mencionar algunos. Diversos factores intervienen para determinar la cantidad de GCs que se internalizará en la célula y el número de receptores a los que se unirán (Joels 2006). Estos factores son:

1) La presencia de la enzima citoplasmática 11beta-hidroxi-esteroide dehidrogenasa (11b-HSD, por sus siglas en ingles), responsable de la conversión de esteroides intracelulares a sus formas activa e inactiva. Se ha observado que la isoforma predominante en el cerebro corresponde a la 11b-HSD1, encargada de catalizar los GCs a su forma activa, aumentando la biodisponibilidad de la hormona (Schmidt y cols., 2004; Joels 2006).

2) La presencia de la proteína membranal Glicoproteína-P, con capacidad para bombear hacia el exterior de la célula algunas toxinas, fármacos o incluso moléculas esteroideas (Schmidt y cols., 2004; Mason y cols.; 2006; Joels 2006).

3) La capacidad de los GCs para ejercer efectos no genómicos como la activación de la adenilato ciclasa, de la tirosina cinasa de Src, de las MAPKs, y la PI3K; la producción de segundos mensajeros y el incremento de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular (Evans y cols., 2000; Schmid y cols., 2004; Gunnar y Quevedo 2007; Boonyaratanakornkit 2007; Karatsoreos y McEwen 2013).

De esta manera los GCs ejercen su acción sobre las células del cerebro, sin embargo esto no sucede de manera aislada en el organismo, ya que otros sistemas como el eje Hipótalamo-hipófisis-gónadas está involucrado (HHG).

Capítulo 4. El papel de las hormonas sexuales ante el estrés.

4.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas (HHG)

La señalización del eje HHG, inicia con la síntesis y liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) desde los núcleos arcuato, periventricular, paraventricular y área preóptica del hipotálamo. (Jennes and Conn, 1994; Guyton, 2011). La GnRH es transportada a la eminencia media y liberada al sistema porta hasta la adenohipófisis donde actúa sobre los gonadotropos estimulando la producción y liberación al torrente sanguíneo de las gonadotropinas, Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Folículo Estimulante (FSH) que tendrán un efecto sobre las gónadas favoreciendo la síntesis de hormonas sexuales, la producción y maduración de células sexuales, así como el despliegue de conductas de tipo sexual (Prieto-Gómez, 2002).

Después de la pubertad y antes de la menopausia, durante cada mes ocurren cambios cíclicos en la concentración de las hormonas gonadotropica en la mujer. Estas variaciones producen cambios en los ovarios a partir de receptores membranales que activan señales de segundos mensajeros aproximadamente cada 28 días.

Ciclo menstrual

El ciclo menstrual inicia con la pérdida del endometrio o menstruación (día 1), donde las concentraciones de las hormonas gonadotrópicas así como gonadales (estradiol y progesterona) se encuentran en sus niveles más bajos. Alrededor del día 7, la FSH incrementa, lo que induce al crecimiento y maduración de los folículos ováricos con subsecuente producción de estrógenos. Juntas, las hormonas FSH y estrógenos estimulan la liberación de la LH que alcanza su pico más alto alrededor del día 14, lo que produce la ruptura del folículo y con ello la ovulación.

Durante las siguientes horas a la ovulación se forma el cuerpo lúteo a partir de las células de la teca interna y de la granulosa responsables de la producción de progesterona, una hormona indispensable en el embarazo. Si el óvulo no es fecundado, el cuerpo lúteo se encoge gradualmente y deja de secretar progesterona, iniciándose otro ciclo menstrual (Guyton, 2011; Handa RJ. y Weiser MJ., 2014) Fig 4.1.

Ciclo estral

En roedores así como en los demás mamíferos distintos al humano, la presencia de un ciclo hormonal reproductivo en hembras recibe el nombre de ciclo estral. En la rata este ciclo tiene una duración aproximada de 4 días, donde factores ambientales como horas, luz, temperatura y humedad producen variaciones en las concentraciones de estradiol circulante y por lo tanto en el desarrollo normal. El ciclo estral comprende las siguientes fases:

1) Proestro. Con duración de 14 a 15hrs, marca el inicio de la fase folicular, con la liberación de FSH dando lugar a la maduración de los folículos y por lo tanto, a la producción de estrógenos. La vagina se torna seca con un pH de 5.4, las células vaginales son redondas y nucleadas con presencia de pocos leucocitos.

2) Estro. Su duración es entre 8 y 9 hrs, siendo la fase del ciclo donde los estrógenos alcanzan su nivel máximo provocando el deseo de apareamiento, los niveles elevados de FSH se mantienen produciéndose un pico de LH responsable de la ovulación. Aparece flujo vaginal abundante sin embargo, la vagina continua seca, presentando un pH de 4.2 y gran cantidad de células queratinizadas (cornificadas, sin un núcleo visible) y muy pocas células nucleadas.

3) Metaestro. Marca el inicio de la fase luteínica, tiene duración aproximada de 24 hrs y se caracteriza por un descenso en la producción de estrógenos, la formación de cuerpos lúteos a partir de los folículos liberados y la síntesis de progesterona. La vagina se presenta con gran cantidad de leucocitos y pocas células queratinizadas

4) Diestro. Con duración de 48 hrs, en esta fase los cuerpos lúteos formados continúan la producción de progesterona que va a llevar a la producción de FSH y LH e inicio de un nuevo ciclo. La vagina se presenta húmeda y con gran cantidad de leucocitos (Melendez 2005) Fig 4.1.

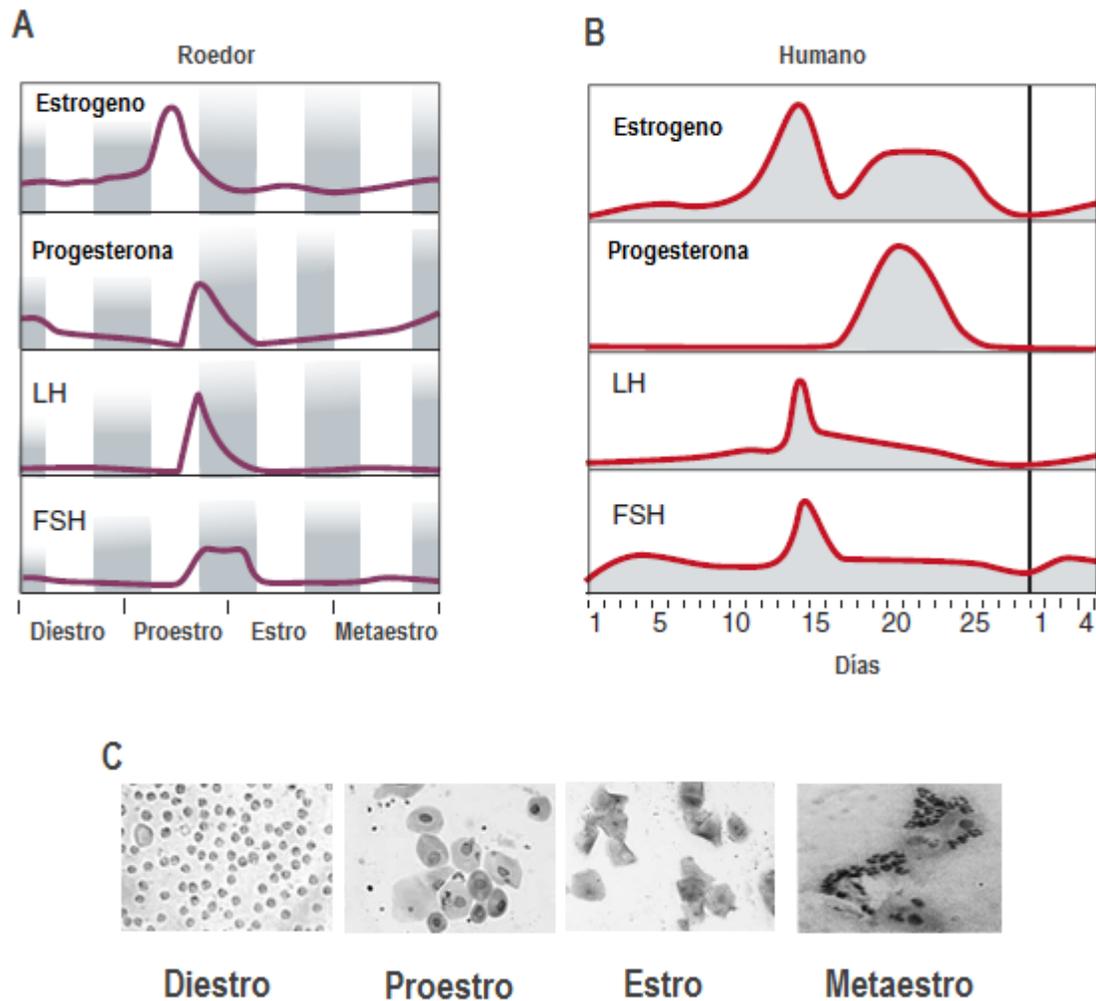


Fig.4.1 Comparación del ciclo estral en la rata y el ciclo menstrual en humano. Citología del ciclo estral de la rata. (A) El ciclo estral de la rata tiene duración de 4 días, las barras grises indican la noche de 6 p.m. a 6 a.m. (B) En el humano, el ciclo menstrual es de 28 días. En ambos se muestran las fluctuaciones de estrógeno, progesterona, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo-estimulante (FSH). (C) Muestra la citología vaginal de la rata en las diversas etapas del ciclo, lo que permite determinar las concentraciones de hormonas hipofisarias y gonadales a través de frotis vaginal. Tomado y adaptado de Stanley y Scharfman 2005

4.2 Estrógenos: receptores y funciones

Las acciones de los estrógenos en el Sistema Nervioso Central (SNC) están reguladas por dos tipos de receptores: 1) Los Receptores membranales (GPR30) o de acción rápida, ubicados en la membrana celular y mitocondrial, son capaces de regular la función de los canales de Ca^{2+} y activar vías de segundos mensajeros como adenosin monofosfato cíclico (c-AMP) (Foradori y cols., 2008; Vasudevan y Pfaff, 2008), la vía de proteína quinasa MAPK, fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) o Akt (también denominado PKB) (Chaban et al, 2011; Kelly y Ronnekleiv, 2012) y 2) Los dos subtipos de Receptores citoplasmáticos o de acción genómica llamados receptor estrógenos alfa (REa) y receptor estrógenos beta (REb), ambos asociados a proteína chaperonas de choque térmico que los mantiene inactivos hasta que se unen con la hormona o ligando para ser traslocados al núcleo.

Ya sea a través de segundos mensajeros o por el complejo receptor-hormona formado por los REa y REb, los estrógenos actúan como factores de transcripción (Vasudevan et al., 2001) regulando la síntesis de neurotrofinas y factores de crecimiento (Pakulski 2011; Karatsoreos y McEwen, 2013; Handa y Weiser, 2014) o inhibiendo algunos otros factores de transcripción como c-Fos (Handa y Weiser, 2014) implicado en la proliferación, diferenciación y apoptosis.

4.3 Influencia del género en la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA).

Estudios epidemiológicos realizados en México indican que la ansiedad y depresión son trastornos psiquiátricos más frecuentes en individuos del sexo femenino que en el masculino, ya que por cada hombre existen tres mujeres que lo padecen (Benjet y cols. 2004). Se ha visto que entre las mismas mujeres éstas afectaciones son más frecuentes en periodos de la vida donde las hormonas sexuales se ven disminuidas, tal es el caso del periodo pre-menstrual, post-parto y perimenopausia (Mehra y cols., 2005; Hendrick y cols., 1998; Woods y cols., 2008; Teixeira y cols., 2000), mientras que en ambos sexos la incidencia a padecer depresión es mayor en edades avanzadas donde los niveles de hormonas sexuales ha disminuido (Martínez-Mota y cols. 2011), lo que sugiere a las hormonas gonadales como posibles responsables en la incidencia de trastornos afectivos derivados del estrés.

Sin embargo, la respuesta al estrés no solo está en función a las hormonas gonadales, si no también, al tipo de estas. En este sentido un estudio de estrés psicosocial mostró que los hombres tienen mayor activación del eje HHA en tareas aritméticas y de habla en público, (Kudielka y Kirschbaum 2005; Kajantie y Phillips 2006), mientras que en mujeres la elevación del cortisol se dio con una tarea de rechazo social (Stroud y cols., 2002; Dickerson y Kemeny 2004). Esas diferencias experimentales parecen indicar que las tareas de logro afectan más a los hombres mientras que los acontecimientos interpersonales a las mujeres (Cyranski y

cols., 2000), lo que pone en evidencia que la respuesta al estrés está en función del género así como del tipo de estresor aplicado (Dickerson y Kemeny, 2004).

En cuanto a las diferencias de género y la activación de las distintas regiones del cerebro en respuesta al estrés, estudios realizados con imágenes de resonancia magnética (IRM) muestran que ante el mismo estresor agudo el hombre activa principalmente la corteza frontal favoreciendo el comportamiento de “lucha o huida” mientras que en la mujer se activa de manera predominante el sistema límbico mostrando un comportamiento “de ayuda y protección”. Esta puesta en marcha del sistema límbico y principalmente del hipocampo, reduce la actividad del eje HHA así como del sistema nervioso simpático (Wang J. y cols., 2007)

Estudios hechos tanto en humanos como en roedores han mostrado que ante un mismo estresor los efectos de la CRH y la ACTH difieren entre hembras y machos (Kirschbaum C y cols., 1999, Uhart M y cols., 2006). Mientras que en estado basal el hombre secreta más ACTH que la mujer, efecto que no se observa en los niveles de cortisol plasmáticos que se mantienen idénticos, lo que sugiere una mayor sensibilidad de la mujer a la hormona ACTH (Uhart M y cols., 2006, Stephens MA y cols., 2016).

Es en roedores donde se ha observado que los estrógenos disminuyen la actividad de los RMs y RGCs aminorando la retroalimentación negativa (Uhart M y cols., 2006, Stephens MA y cols., 2016), lo que sugiere que el aumento en la

respuesta del eje HHA a ciertos medicamentos como la naloxona en la mujer, más no en el hombre, refleja una disminución de la retroalimentación negativa del eje a consecuencia de los estrógenos.

Si bien el efecto general del estradiol (E2) es estimular directamente la producción de CRH, aumentar la sensibilidad de las glándulas adrenales a la ACTH e inhibir la actividad de los GC disminuyendo la retroalimentación negativa (Becker J. y cols. 2007). El E2 también puede inhibir a la CRH a través de los receptores a mineralocorticoides y glucocorticoides expresados en el hipocampo (Handa y cols., 2014) acallando así la respuesta del eje HHA al estrés.

Un estudio en animales que fueron sometidos a la prueba de Porsolt no mostró diferencias entre sexos de animales prepúberes, mientras que en animales adultos los machos exhibieron más escalada y menos natación con respecto a las hembras (Martínez-Mota y cols., 2011). Esta diferencia, apoyada en la evidencia de que los machos responden mejor al tratamiento antidepresivo que actúa sobre el sistema catecolaminérgico y las hembras al serotoninérgico (Martínez-Mota L y Fernández-Guasti A 2004; Estrada-Camarena y cols., 2004; Berlanga C. y Flores-Ramos M. 2006) confirma el efecto diferencial de las hormonas gonadales ante el estrés donde la testosterona estimula la transmisión noradrenérgica, mientras que los estrógenos la serotoninérgica (Putnam S. y cols., 2001; Martínez-Mota y cols., 2011). Estudios posteriores mostraron que el efecto antidepresivo de fármacos como la desipramina y fluoxetina ejerce su efecto antidepresivos en machos a través del

metabolito estrogénico de la testosterona (el estradiol) sintetizado a partir de la aromatasa al igual que sucede en las hembras (Martínez-Mota y cols., 2012).

4.4 Estrógenos y el estrés

Además de la ovulación y el comportamiento reproductivo en las hembras de todos los mamíferos, los estrógenos desempeñan un papel importante regulando la síntesis de las neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico de células derivado de la glía (GDNF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Bruce-Keller y cols., 2000) todos ellos responsables de la formación y sobrevivencia de células de nueva generación en el hipocampo del cerebro adulto, una región relacionada con la memoria, aprendizaje y estado de ánimo, lo que ha atribuido a los estrógenos un efecto neurotrófico y neuroprotector ante diversos factores como el estrés. (Fink y cols., 1996; McEwen y Alves, 1999; Gillies y cols., 2004; Craig y cols., 2005, Cahill, 2006; Chao y cols., 2006; Galea y cols. 2006, 2008, 2013; Brann y cols., 2007; Craig y Murphy, 2007; Kataria y cols., 2010, Estrada-Camarena y cols., 2010; Horst 2011; Scott y cols., 2012; Karki y cols., 2014).

Se ha observado que los cambios en las células del hipocampo a consecuencia de la exposición al estrés varían entre hembras y machos de la misma especie (Galea y cols., 2013) y en el caso de las hembras, estos cambios parecen depender de las fluctuaciones hormonales propias del ciclo reproductivo. Esto último

se apoya en la evidencia de que la sola ausencia de E2 ocasiona disminución en el número de células hipocampales, así como disminución en la densidad de espinas dendríticas, efecto que se revierte con restitución de E2 (Smith y cols.2010, Bredemann y cols. 2014), mientras que la sola ovariectomía provoca un incremento de corticosterona así como un aumento en la expresión de conductas tipo depresivas (Vega-Rivera y cols., 2013), apoyando la propuesta de que las hormonas gonadales intervienen en la regulación del eje HHA. En este sentido, un estudio realizado con hembras ovariectomizadas sometidas a estrés mediante 15 minutos de nado forzado mostrará disminución en la sobrevivencia de células hipocampales de nueva generación en relación con hembras en la fase de proestro que también fueron estresadas (Vega-Rivera y cols. 2013).

En cuanto a la exposición a estrés crónico, se ha reportado que en ratas hembras intactas se disminuye el número de neuronas maduras y la proliferación celular (Galea y cols., 2013, Hillerer y cols., 2013). Mientras que en machos se ha observado una disminución en la complejidad dendrítica de células piramidales de CA3 y pérdida de células granulares del GD (MacLaughlin 2007 y Kleen 2006).

Capítulo 5. Neurogénesis

5.1 El cerebro como un órgano dinámico

Una de las aportaciones que trajo consigo los avances científicos del siglo XX, fue el conocimiento del cerebro humano adulto como un órgano dinámico capaz de

responder tanto positiva como negativamente a diversos factores responsables de la generación de nuevas neuronas (Altman 1962), un evento hasta entonces considerado como imposible en el cerebro maduro.

Con el paso del tiempo y las nuevas aportaciones, se mostró que además de la presencia de células madre indiferenciadas en el cerebro y la formación de células de nueva generación también llamadas neuroblastos, estas últimas eran capaces de migrar a otras regiones cerebrales (Lois y Álvarez-Buylla 1994), diferenciarse e integrarse a circuitos neuronales existentes (Nottebohm 1985; Luskin 1993; Reynolds y Weiss 1992), así como reordenarse ya en estado maduro a través de la elongación o retracción de espinas dendríticas (Duman 2004, Mclaughlin y cols.,2007) y la modificación de conexiones sinápticas (Lledo y cols., 2006; Christie y Cameron 2006; Pirrtimaki y Parri 2013; Nikola y cols., 2015)

Otro factor también modificable en el cerebro adulto, es la composición química de microambientes en ciertas regiones del cerebro a partir de la modificación en la expresión de receptores, producción de neurotransmisores, factores de crecimiento y/o neurotrofinas (Seki, 2003), en muchos casos responsables de mantener las condiciones adecuadas para que se origine la neurogénesis.

5. 2. El Proceso Neurogénico en el cerebro adulto

Esta capacidad del cerebro adulto de producir nuevas células, tiene su origen en las células troncales o *stem cells* (Gage, 2000) con actividad mitótica asimétrica (Alvarez-Buylla A 2001) que les permite auto-renovarse (Morrison y cols.,1999) y al mismo tiempo, originar células progenitoras neuronales (CPN), un tipo de neuroblasto con capacidad mitótica que da origen a neuronas (neurogénesis) y oligodendrocitos (gliogénesis) (Kempermann y cols., 2004).

La neurogenesis se define como un proceso mediante el cual se generan nuevas células a partir de células madre troncales. Este proceso está conformado por varios eventos como son: la división de las células madre, proliferación y migración de estos nuevos neuroblastos, su diferenciación en neuronas, sobrevivencia, maduración dendrítica, establecimiento de conexiones sinápticas funcionales y la integración de estas a circuitos neuronales existentes (Kempermann y cols; 2004).

Zonas neurogénicas del cerebro adulto

Al momento, dos áreas del cerebro han sido descritas por conservar su capacidad neurogénica en la edad adulta, estas son: La zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales (Lois y Alvarez-Buylla, 1994) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado en el hipocampo (Kempermann y cols; 2004; Christie y cols; 2006).

A pesar de que la presencia de actividad neurogénica se ha restringido al hipocampo y zona subventricular (ZSV). Diversos estudios han reportado otras

regiones del cerebro como posibles zonas con actividad neurogénica, tal es el caso del bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el estriado, cuerpo calloso y cerebelo, sin embargo se ha observado que estas regiones por sí mismas son incapaces de llevar a cabo la neurogénesis (Ponti, 2006, 2008; Leung y cols., 2007; Decimo y cols., 2012) y que las células progenitoras que en ellas se encuentran provienen de la zona germinal subventricular (Magavi y Macklis 2002).

Entre las regiones en las que se ha reportado la generación de neuronas, el hipocampo ha sido considerado de gran relevancia debido a que además de ser una región cerebral perteneciente al sistema límbico, está implicado en la regulación de conductas afectivas (Aimone y cols., 2010; Deng y cols., 2010), la memoria y el aprendizaje, su daño se relaciona con el desarrollo de enfermedades psiquiátricas, entre ellas la depresión.

5.3 Neurogénesis en el hipocampo

Este proceso inicia con la división de una célula madre multipotencial o célula tipo-1 (Kemperman y cols., 2004), la cuál ha sido considerada como un tipo de astrocito radial (Seri y cols., 2003; Alvarez-Buylla y Lim 2004; Ihrie 2008) que se localiza en la zona subgranular del giro dentado (ZSG), ubicadas en el límite de la capa de células granulares y el hilus de la ZSG (Rolando C, 2014). Estas células de carácter pluripotencial, al igual que en la ZVS presentan capacidad mitótica asimétrica (Alvarez-Buylla 2001) auto-renovando el nicho y originando CPN también llamadas

células de amplificación rápida, o célula tipo 2 y 3 (Kemperman y cols., 2004) que se desplaza a través de la capa granular en dirección hacia la capa molecular.

La célula progenitora de amplificación rápida que se originó de la división de la célula madre, atravesara dos etapas o estadios transitorios a lo largo de su desplazamiento por la capa granular que se diferencian entre sí por el potencial proliferativo que tiene la nueva célula y los marcadores que ella expresa. En el primer estadio la célula recibe el nombre de tipo-2a si expresa el marcador de nestina, esto es, que sea positiva para nestina (nestina+) y el nombre de tipo-2b además de nestina expresan doble cortina (DCX+) (Kemperman y cols., 2004, Nicola y cols., 2015).

En el segundo estadio caracterizado por la pérdida de la expresión de nestina (nestina-) y la expresión únicamente de DCX (DCX+), la célula recibe el nombre de tipo-3, es al término de esta etapa donde la célula pierde su capacidad mitótica para diferenciarse en una neurona o célula glial (oligodendrocito o astrocito), dependiendo de las condiciones del microambiente que la rodea (Kemperman y cols., 2004, Nicola y cols., 2015).

A partir que las células salen del ciclo celular se inician los eventos de migración tangencial a la capa molecular (Ramirez-Rodriguez y cols., 2011). Si es que la célula se ha diferenciado en neurona, esta etapa se caracterizará por la proyección de dendritas que cruzan la capa granular del giro dentado (GD) y la

expresión de los marcadores DCX, el factor de transcripción “Prox1” y la proteína nuclear NeuN, específica de neuronas (Kempermman y cols., 2004; Nicola y cols.,2015).

Entre la segunda y tercer semana, las nuevas neuronas envían sus proyecciones dendríticas hacia la capa granular estableciendo proyecciones axonales hacia el área de CA3, (Kemmperman;2004) por lo que se integran a los circuitos neuronales existentes, expresando marcadores específicos de células maduras (Encinas y cols., 2013) como la proteína de unión a calcio llamada calbindina, así como propiedades electrofisiológicas similares a las neuronas maduras ya presentes en el hipocampo (Kempermman y cols., 2004) fig 5.1.

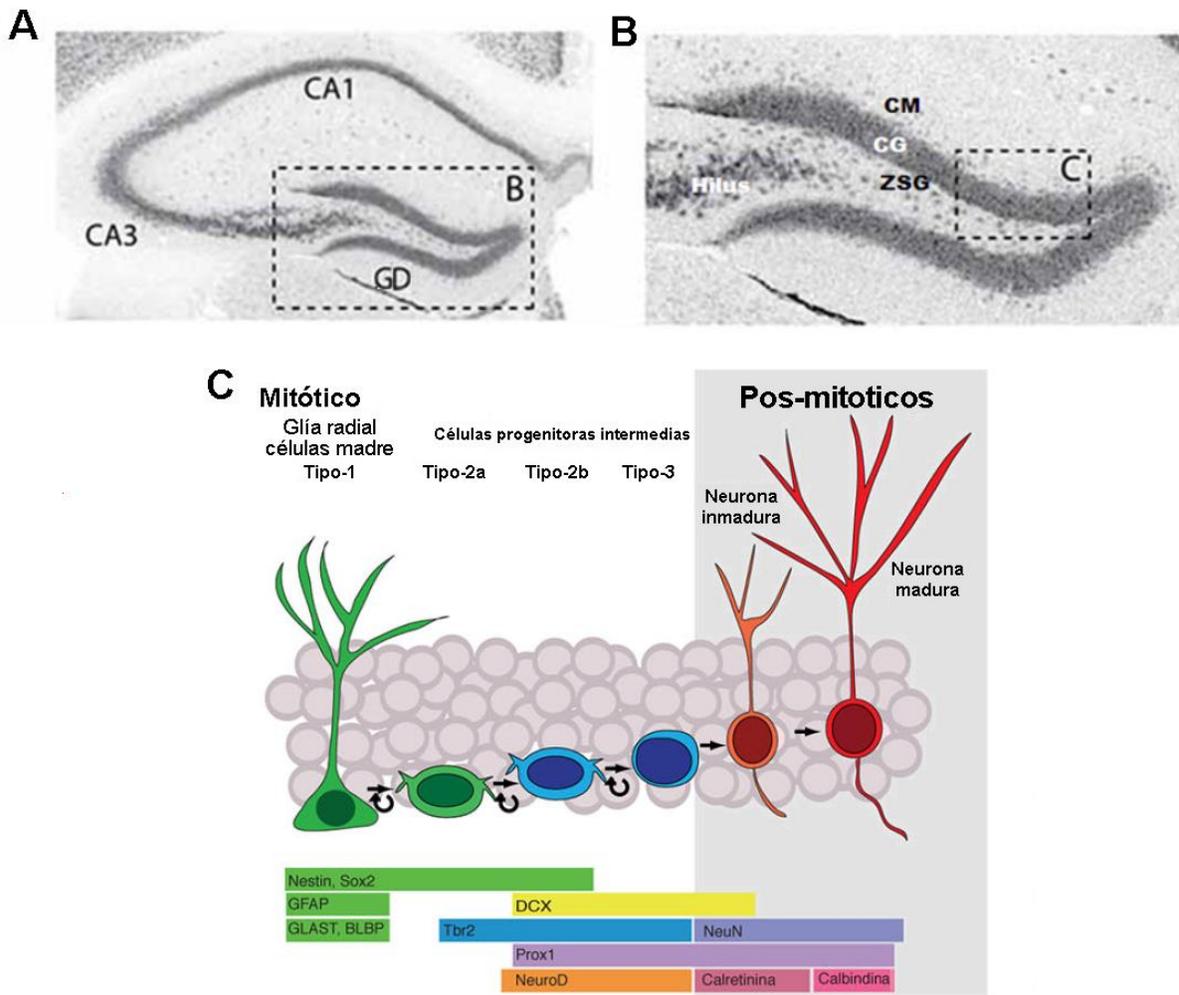


Fig.5.1

A. Corte coronal de la región hipocámpal, Se muestran las regiones que comprenden el hipocampo, dentro del recuadro B el giro dentado (DG), la región CA1 y CA3 hacia donde se proyectan los axones de las neuronas maduras.

B. Región del giro dentado y las partes que la componen. Del centro hacia afuera el hilus, la zona sub granular (ZSG), la capa granular (CG) y la capa molecular (CM). Es en la ZSG donde se encuentran las células progenitoras con capacidad neurogénica, esta región comprende el espacio de tres núcleos por debajo de la capa granular (CG), zona por la que se desplazan las células de nueva generación en su camino a la capa molecular (CM).

C. Arquitectura de la ZSG y CG. Se observan los estadios por los que pasa una célula de nueva generación así como los marcadores que expresa en cada uno, las flechas circulares representan la capacidad mitótica de las células, misma que se pierde una vez que la célula se ha diferenciado. Tomado y adaptado de Nicola y cols., 2015

ra
uo
an
ea

a los astrocitos de la ZSG, permitiéndoles soportar la neurogénesis. Algunos de estos factores son las moléculas de adhesión celular neural polisialico (PSA-NCAM) (Svendsen y Caldwell 2000; Ambrousy cols., 2005; Brandt y cols 2013); neurotransmisores como el ácido aminobutirico (GABA), glutamato (Cameron y cols., 1995), serotonina (Homberg y cols., 2014) y dopamina; factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) (Gage., 2000; Svendsen y Caldwell 2000; Kirby y cols 2013), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Reynolds y Welss., 1992) y las neurotrofinas factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Ambrous y cols., 2005; Homberg y cols., 2014), neurotrofina 3 (NT3). (Svendsen y Caldwell 2000), además las hormonas melatonina (Ramírez-Rodríguez y cols., 2011) prolactina, somatotropina, suprarrenales (Cameron y Gould, 1994) y sexuales (Galea y cols., 2006, 2013; Paulinski y cols .2009) entre otras.

Con respecto a las hormonas sexuales, se sabe que la disminución o pérdida en los niveles normales de estas moléculas ya sea a consecuencia de la edad, alteraciones endócrinas o enfermedades psiquiátricas (Jayatissa 2009) son factores que afectan la neurogénesis directamente o a través de la producción de citocinas inflamatorias que pueden elevar los niveles de glucocorticoides dañinos para las neuronas de nueva generación (Kronfol y Remick 2000; Zunszain y cols., 2011).

Como factores externos positivos se encuentra el ejercicio (Kirby y cols., 2013), el ambiente enriquecido (Llorens-Martín y cols., 2007; Paez-Martínez y cols., 2013; Ramírez-Rodríguez y cols., 2014), el estudio, la atención materna especialmente en

etapas tempranas de la vida (Korosi y cols., 2014) y la aceptación social (Dickerson y Kemeny 2004). Como factores externos negativos se encuentran el consumo de drogas o exposición a inhalantes (Paez-Martínez y cols., 2013) infecciones en sistema nervioso, hipoxia, enfermedades psiquiátricas (Ramírez-Rodríguez y cols., 2013) estrés crónico o muy intenso (Duman 2000; Snyder y cols., 2012; Vega-Rivera y cols., 2013), falta de sueño y deficiencias alimentarias (Joseph-Bravo J y De Gortari P).

5.5 Efectos del estrés sobre la neurogénesis

Los efectos del estrés sobre la neurogénesis, procesos conductuales y fisiológicos pueden variar según la naturaleza y duración del agente estresor (Bowers. y cols; 2008), prueba de esto es la diferencia en los niveles de corticosterona liberada en roedores que han sido sometidos a estresores de intensidad variable y en donde se muestra una relación directa entre la intensidad del estrés, los efectos que este produce según la manera en que fue aplicado y la cantidad de glucocorticoides liberados por el animal (Kirby 1977; Bowers. y cols; 2008)

Muchos estudios refieren a los glucocorticoides liberados por el estrés como responsables de suprimir una o más fases del proceso neurogénico en el hipocampo adulto (Gould y Tanapat 1999; Cameron y Gould 1994; Moghaddam 1994; Cameron y McKay 1999), además de ocasionar retracción dendrítica (Mclaughlin 2007),

disminución en la proliferación celular del GD en el desarrollo post-natal y adulto de roedores macho (Tanapat y cols., 1998), así como disminución de la sobrevivencia de células de nueva generación (Thomas y cols 2007) afectando también el aprendizaje y la memoria.

Siendo el hipocampo una de las regiones del cerebro que presenta gran cantidad de receptores para hormonas suprarrenales, es comprensible que se vean afectados algunos procesos cognitivos como memoria y aprendizaje, así como emocionales (depresión y ansiedad) lo que puede estar relacionado con la pérdida del volumen hipocampal en personas que experimentan trastornos afectivos (Duman 2000).

Al evaluar el efecto del estrés sobre la neurogénesis, se señala de forma consistente al estrés crónico como responsable de disminuir la proliferación (Dagyte y cols., 2009) y sobrevivencia de células hipocámpicas (Malberg y cols; 2003, Mirescuycols; 2006) en tanto que los modelos de estrés agudo indican una disminución en el número de neuronas maduras en GD (Cameron y Gould 1994; Galea 1996; Gould y cols; 1997, 1998; Tanapat y cols., 1998), sin afectaciones en la sobrevivencia de machos (Thomas y cols 2007) y hembras en proestro (Vega-Rivera y cols., 2014) efecto que no se observa así en hembras que han sido privadas de hormonas gonadales, donde una exposición al agente estresor es suficiente para disminuir la sobrevivencia de células de nueva generación en el GD del hipocampo (Vega-Rivera y cols; 2013, 2014).

En cuanto a los efectos del estrés agudo sobre la proliferación hipocampal, los resultados no son concluyentes ya que reportes iniciales indican una disminución en las células de nueva generación (Galea 1996, Gould 1997, 1998), existen otros más recientes que señalan no encontrar alteraciones en la proliferación (Thomas y cols., 2006; Dąbyszewska y cols., 2009) incluso en hembras ovariectomizadas (Vega-Rivera y cols; 2014). No obstante existen reportes señalando un aumento en la proliferación hipocampal dorsal como respuesta a los glucocorticoides liberados por estresores de mediana intensidad, 40mg/kg de corticosterona en plasma sanguíneo (Kirby y cols; 2013).

Es importante mencionar que estas inconsistencias respecto a la proliferación hipocampal no solo se presentan entre estresores de diversas intensidades. Un estudio hecho en ratas y ratones donde ambos grupos fueron sometidos al mismo estresor con misma concentración de glucocorticoides secretados muestra disminución significativa en células marcadas para proliferación en el GD de ratas, pero un aumento significativo en el GD de ratones (Bain y cols. 2004). Lo anterior sugiere que la proliferación de células del hipocampo parece responder de manera diferente al nivel de corticosterona liberada, así como al tipo de especie evaluada.

5.6 Marcadores celulares

Durante todo el proceso neurogénico, las células presentan cambios morfológicos que van acompañados de la expresión de diversas proteínas que permiten identificar la etapa del proceso neurogénico en que se encuentran (Kempermann y cols; 2004, 2015). Estas proteínas, ya sea estructurales o factores de transcripción, presentan antigenicidad para ciertos anticuerpos, lo que se utiliza para marcarlos a fin de visualizar la célula que los presenta y poder determinar en qué etapa del proceso neurogénico se encuentra, motivo por el que estas proteínas reciben el nombre de macadores celulares.

Se dice que el marcador es endógeno cuando la célula lo expresa y exógeno cuando se le administra para que lo integre a su estructura.

Tabla 5.1 Algunos de los marcadores celulares del sistema nervioso que se emplean en inmunohistoquímica

Marcador	Expresado en:
Proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP) o Proteína unión a ácidos grasos del cerebro 7 (FABP7)	<i>Stem cell</i> o células progenitoras ¹
Nestina	Células indiferenciadas ²
Ki67	Células en las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular ³
Bromodesoxiuridina (BrdU)	Células que han pasado por la fase S del ciclo celular ⁴
Sox1	Glía radial ⁵
Proteína gliofibrilar ácida (GFAP)	Filamentos intermedios de astrocitos y células de Schwann ⁶
(S100-beta)	Células de la glía, no expresada en progenitoras o <i>stem cell</i> ²
Doble cortina (DCX)	Microtúbulos de neuronas ²
Prox1	Factor de transcripción expresado en células granulares ⁷
Núcleo Neuronal (NeuN)	Factor de transcripción expresado en neuronas maduras ⁸
Calbindina	Neuronas maduras funcionales ²
Caspasa 8 y caspasa 9	Células que han iniciado el proceso apoptótico ⁹
Caspasa 3	Células en apoptosis ⁹

Referencias: 1, 2. Kemperman y cols., 2004; 3. Scholzen y Johannes 2000; 4. Altman 1962 ; 5. Venere y cols., 2012; 6. Han y cols., 2015; 7. Nicola y cols., 2015; 8. Mullen y cols., 1992; 9. Keane y cols., 2001; Lanshakov y cols., 2009.

Para proliferación celular el marcador más empleado es la proteína Ki67, la cual se expresa en el núcleo de las células que se encuentran en las fases de G1, S, G2 y M del ciclo celular, incluso cuando la célula está en arresto (Scholzen y Johannes, 2000), no así en la fase G0 o de quiescencia, lo que se ha asociado con la capacidad proliferativa de la célula.

La Bromodesoxiuridina o BrdU es un marcador exógeno análogo de la timidina, capaz de incorporarse al DNA de las células que se encuentran en la fase de síntesis y es transferido a la célula hija al momento de la replicación. Puede usarse para determinar la proliferación de células que se encuentran en fase de síntesis al momento de su administración con el inconveniente de que no detecta células proliferantes en S1, S2 o M. También puede emplearse para determinar la sobrevivencia de las células que se estaban sintetizando al momento de su administración (Rakic, 2002; Vega-Rivera 2013) así como sus descendientes ya que es transferido mediante la replicación, motivo por el que es importante determinar la región que se va a cuantificar.

En cuanto a la identificación de la muerte celular programada o apoptosis, se utilizan marcadores que se unen caspasa, un tipo de zimógeno que se escinde a proteasa, como respuesta a factores iniciadores del proceso apoptótico. Es el marcador de la proteína caspasa 3, el mayormente empleado para determinar si el proceso apoptótico se está llevando a cabo y es irreversible (Keane, y cols., 2001; Lanshakov y cols., 2009).

Capítulo 6. Ciclo celular y Apoptosis

6.1 Ciclo celular

Se le llama ciclo celular a la secuencia de actividades que ocurren entre una división celular y la siguiente (Audesirk y cols., 2008). Cuando una célula se divide debe heredar su DNA y organelos a las células hijas. Si el DNA está alterado la célula activa un sistema de control que detendrá la progresión del ciclo celular, para revisar, reparar y decidir si se continúa o se desecha la célula mediante la muerte celular programada llamada apoptosis. (Walworth 2000; Hein y cols., 2014)

Durante un ciclo celular típico, el sistema de control está regulado por proteínas ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CdK) que pueden frenar el ciclo en puntos determinados llamados puntos de control o checkpoints, evitando el inicio del siguiente proceso celular, manteniendo a la célula en arresto o estado de quiescencia si es que esta ha salido de la fase G1 y ha ingresado a G0 (Walworth 2000; Pietenpol y Stewart 2002).

Puntos de control en el ciclo celular y la expresión de los marcadores Ki67 y BrdU:

Punto de control G1, Ubicado inmediatamente después de que la célula ha proliferado, en este punto de control la célula censa los estímulos internos y externos

a fin de decidir si se divide o nó. En este punto de control la célula es positiva para Ki67 (Kempermann y cols., 2004) y aún no ha iniciado la fase de síntesis (S) donde incorporará el BrdU a su DNA.

La deficiencia de factores de crecimiento y neurotrofinas puede ser un motivo para que la célula sea arrestada en G1, en este punto la célula puede entrar en estado de quiescencia o G0, donde continua expresando Ki67 (Scholzen y Johanes 2000) y llevando a cabo sus funciones metabólicas pero fuera del ciclo celular (Pietenpol y Stewart 2002).

Punto de control G2, La célula ya ha duplicado su DNA e integrado el BrdU a su genoma. Un defecto en la replicación del DNA es motivo para que la célula se detenga en esta etapa donde espera poder reparar el daño antes de entrar a mitosis, de lo contrario inicia el proceso apoptótico (Pietenpol y Stewart 2002).

Punto de control Metafase, Sucede cuando los cromosomas están alineados y dispuestos a separarse. Este punto de control protege contra pérdidas o ganancias cromosómicas, al igual que el punto de control anterior, la célula continua con sus reacciones metabólicas, pero se detiene en su paso por el ciclo celular en espera de que el daño sea reparado o iniciar el proceso apoptótico (Pietenpol y Stewart 2002).

Es de mencionar que la muerte celular programada o apoptosis, solo se inicia ante un daño celular irreparable, por lo que la detención en G1 difícilmente iniciará el

proceso de muerte programada, originando en el mayor de los casos la quiescencia o la salida de la célula del ciclo. En este sentido, estudios hechos con dexametasona en ratas han mostrado que los elevados niveles de glucocorticoides son capaces de detener la célula en G1-G0 (Johnson y cols., 2006; Goya y cols., 1993).

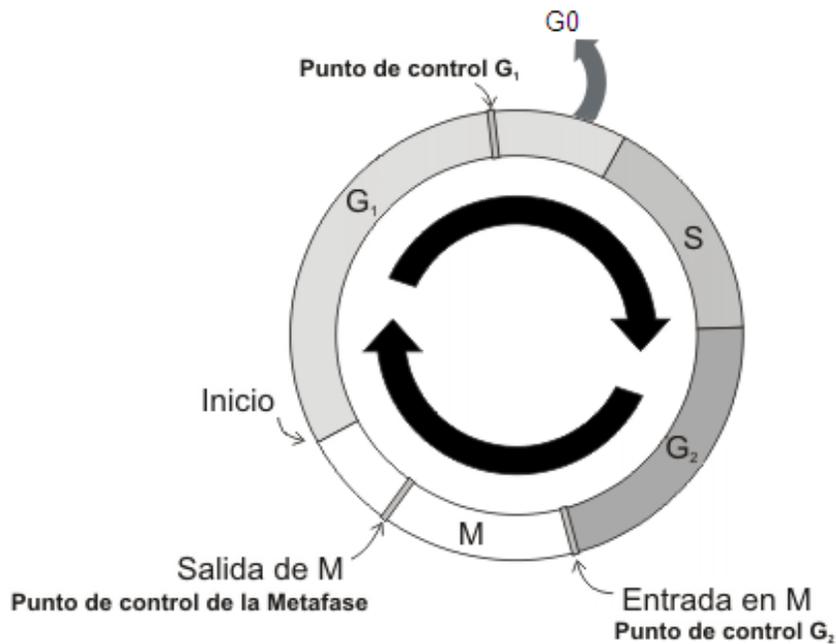


Fig. 6.1 Ciclo celular típico y los puntos de control o checkpoints donde la célula revisa las condiciones internas y externas que le permitan continuar con el ciclo. Tomado y adaptado de Audesirk 2016

6.2 Apoptosis

Mantener un equilibrio entre la proliferación y muerte de las células que componen a un ser vivo es importante ya que de esto depende el tamaño de los tejidos así como su homeostasis. En este sentido el sistema nervioso central no es la excepción, células de nueva generación se originan constantemente en la zona

subventricular y subgranular del GD de las cuales no todas llegan a madurar y establecer conexiones con otras células ya que sufren de manera natural la muerte celular programada llamada apoptosis. Es sabido que paralelamente a este proceso natural de muerte diversos factores tanto internos (aumento de radicales libres, disminución de factores de crecimiento) como externos (estrés crónico, radiaciones) pueden originar un aumento en la tasa de apoptosis con respecto a la de proliferación trayendo consigo enfermedades de tipo cognitivo como trastornos del estado del ánimo y demencias.

La apoptosis sucede través de una secuencia muy bien determinada de cascadas de señalización, siendo un mecanismo altamente conservado en todas las células. En primer lugar existe una fase de iniciación que puede ser mediada por una vía mitocondrial (vía intrínseca) o bien, por una vía activada a través de receptores membranales de muerte (vía extrínseca), posteriormente ambas vías convergen en una segunda fase de ejecución caracterizada por la activación de caspasas, y que es responsable última de las características morfológicas de la muerte apoptótica (Krantic y cols., 2005).

El proceso apoptótico culmina en un estrechamiento rápido del citosol y pérdida de contacto con las células vecinas a consecuencia de alteraciones en las moléculas de adhesión de la membrana plasmática, compactación del material genético finalizando con la formación de vesículas denominadas cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo, citoplasma y organelos celulares protegidos por la

membrana celular (Majno y Joris 1995), estos serán digeridos por macrófagos y células adyacentes sin que se produzca una respuesta inflamatoria (Kerr y cols., 1972; Wyllie y cols., 1980).

Es importante mencionar que la apoptosis presenta características que difieren marcadamente de la necrosis, donde la muerte celular sobreviene como consecuencia de algún traumatismo, sustancia tóxica o falta de oxígeno a la célula, lo que ocasiona la salida del citoplasma al espacio extracelular con la subsecuente activación de los mecanismos propios de la inflamación, eventos que no ocurren en las células que entran en el proceso apoptótico.

6.2 Factores que modulan la apoptosis

Se ha reportado que durante el desarrollo del sistema nervioso y modelamiento del cerebro, muchas neuronas pueden iniciar el proceso de apoptosis si son expuestas a una disminución en los niveles de factores tróficos como son el factor de crecimiento neuronal (NGF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDGF) y las neurotrofinas 3 y 4 (Raff M y cols; 1993), siendo resistentes a esta privación antes o después de pasar por un periodo específico o fecha crítica. La presencia de esta "ventana de tiempo" durante el desarrollo sugiere que diversos genes apoptóticos se expresen en las neuronas en circunstancias determinadas.

En la actualidad se conoce más de cuarenta genes pro y anti-apoptóticos relacionados con el sistema nervioso (Bredesen, 1995). Entre los pro-apoptóticos encontramos: Bax, Bak, Bid, Bad, Bim de la familia Bcl-2, Noxa, PUMA, c-myc, c-jun, FAS/Apo 1 entre otros, mientras que a la familia de los anti-apoptóticos pertenecen Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1 Bcl-w, BRAG-1, responsables de inhibir la apoptosis de neuronas sometidas a privación de factores de crecimiento, radicales libres o que por algún motivo se encuentran en arresto en alguno de los puntos de control del ciclo celular.

Tabla 6.1 Principales factores que inducen la apoptosis en el sistema nervioso

Factores inductores de la apoptosis			
Fisiológicos	Asociados al daño celular	Terapia	Toxinas
TNF	Golpe térmico	Quimioterapia	Etanol
Ligando Fas	Infección viral	Radiación	Beta-amiloide
TGF-beta	Toxinas bacterianas		Veratridina
Glutamato, dopamina	Oncogenes		6-OHDA
Ausencia de factores de crecimiento	Factores de transcripción: p53		3-NP
Perdida de fijación de la matriz	Linfocitos T citotóxicos		Metanfetamina
Ca ²⁺	Agentes oxidantes		
Glucocorticoides	Especies reactivas de oxígeno		
	Falta de nutrientes		

Adaptado de Jordán J. Apoptosis: muerte celular programada OFFARM 2003; 22(6):100-106

6.3 Fase de activación. Vía extrínseca

La vía extrínseca se inicia mediante la activación de los receptores de muerte presentes en la superficie celular. Estos receptores pertenecientes a la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) incluyen el TNF-receptor 1 (TNF-1), el receptor

Fas (FasR) también llamado Apo1 o CD-95 (Apo1/Fas/CD95), el receptor TRAIL, DR-3, DR-4 y DR-5 (Ashkenazi y Dixit 1998), todos con la característica común de presentar un dominio intracelular denominado dominio de muerte (DD), capaz de reclutar proteínas que formarán el complejo proteico denominado DISC (del inglés death inducing signaling complex) (Wallach y cols., 1999; Abe y cols., 2000) que conducirán a la escisión de pro-caspasas 8 en caspasa 8 y por lo tanto a su activación.

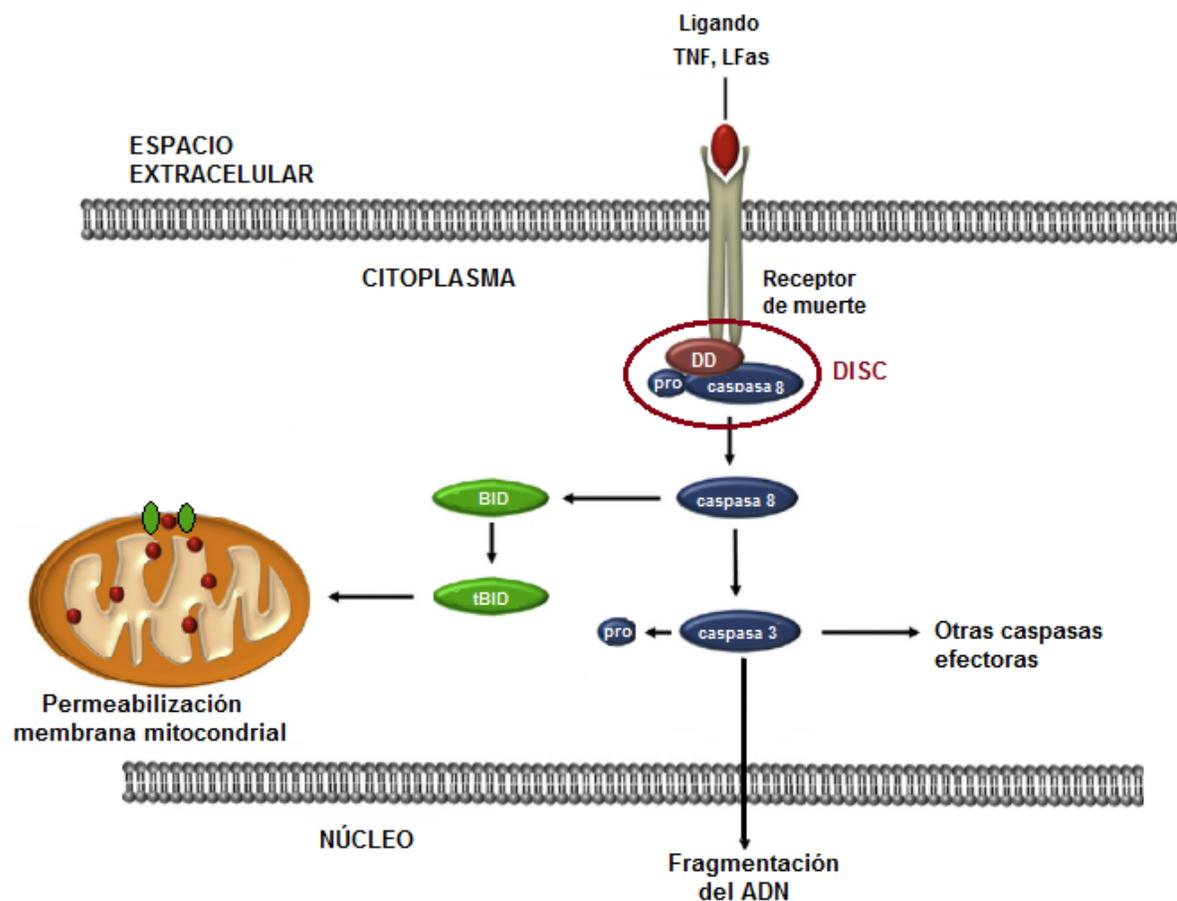


Fig.6.2 La activación de la apoptosis a partir de la vía extrínseca inicia con la unión del ligando a su receptor de muerte, activando una serie de reacciones corriente arriba que involucran la escisión de pro-caspasas 8 en caspasa 8 responsable de activar la pro-caspasa 3 en caspasa 3, una proteína que puede llevar a cabo dos funciones. Traslocar al núcleo donde actúa como enzima de restricción fragmentando el ADN, o trincar la proteína Bid (tBid) que traslocará a la mitocondria permeabilizando su membrana.

La activación de estos receptores de muerte también pueden inducir la activación de la vía SAPK/JNK (del inglés stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) (Weston y Davis 2002; Lin 2003), donde la proteína JNK es capaz de inactivar proteínas anti-apoptóticas como bcl-XL, Mcl-1 bcl-w o inducir la activación de proteínas pro-apoptóticas como Bid, Bim, p53 y Fas (IP y Davis 1998; Dng y cols., 2003)

6.4 Fase de activación. Vía intrínseca

La vía intrínseca inicia con la permeabilización de la membrana mitocondrial, evento mediado por las proteínas de la familia Bcl-2 y que puede ser activado por diversos agentes como el daño al DNA, la pérdida o disminución de factores de crecimiento, el aumento excesivo de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Decaudin y cols., 1998; Green y Rubin 1998; Susin y cols., 1999), incluso la activación de caspasa 8 a través de la vía extrínseca, capaz de proteolizar a la proteína Bid, permitiéndole permeabilizar la membrana mitocondrial (Desagher y cols., 1999; Wei y cols., 2000).

Es la pérdida en la integridad de la membrana mitocondrial, lo que permite la liberación de diversas moléculas pro-apoptóticas, tal es el caso del citocromo c (Susin y cols., 1999; Green y Rubin 1998), el cual una vez en el citoplasma, se une a la proteína Apaf-1 formando el complejo proteico llamado apoptosoma (Li y cols.,

1997b) responsable de la activación de procaspasa 9 en caspasa 9 (Adrain y cols., 1999).

Otras proteínas mitocondriales pro-apoptóticas liberadas al citoplasma tras la permeabilización de la membrana son: la proteína Smac/DIABLO (Esposti 2002) y Omi/HtrA2, ambas responsables de neutralizar a las IAPs, un tipo de proteínas inhibitoras de la apoptosis (Vaux y Silke 2003; Almagro y Vucic 2012). Además de que la proteína Omi/HtrA2 puede actuar de manera independiente como proteasa de pro-caspasas (Saelens y cols., 2004)

Un estudio realizado en neuronas simpáticas en cultivo, mostró que la privación del NGF induce la salida del citocromo c, mediante un mecanismo que implica la translocación de Bax a la mitocondria (Putchá y cols.,1999), con la subsecuente activación de caspasas y muerte apoptótica (Edwards y cols.,1991; Deckwerth y Johnson 1993; Troy y cols.,1996; McCarthy y cols.,1997), no así con la simple inyección de citocromo c en presencia del NGF (Deshmukh y Johnson 1998)

Es de esta manera y a través de diversos estudios, que se sabe el papel de las proteínas de la familia Bcl-2 en la vía intrínseca se produce a nivel de la permeabilización de la membrana y liberación del citocromo c. Es así que mientras proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-X_L inhiben la liberación de citocromo c en respuesta a varios estímulos apoptóticos (Yang y cols., 1997; Kluck y cols., 1997; Scaffidi y cols., 1998), las proteínas pro-apoptóticas como las ya mencionadas Bid y

Bax son capaces de inducirla (Rosse y cols., 1998; Li y cols., 1998; Putcha y cols., 1999; Desagher y cols., 1999; Wei y cols., 2000).

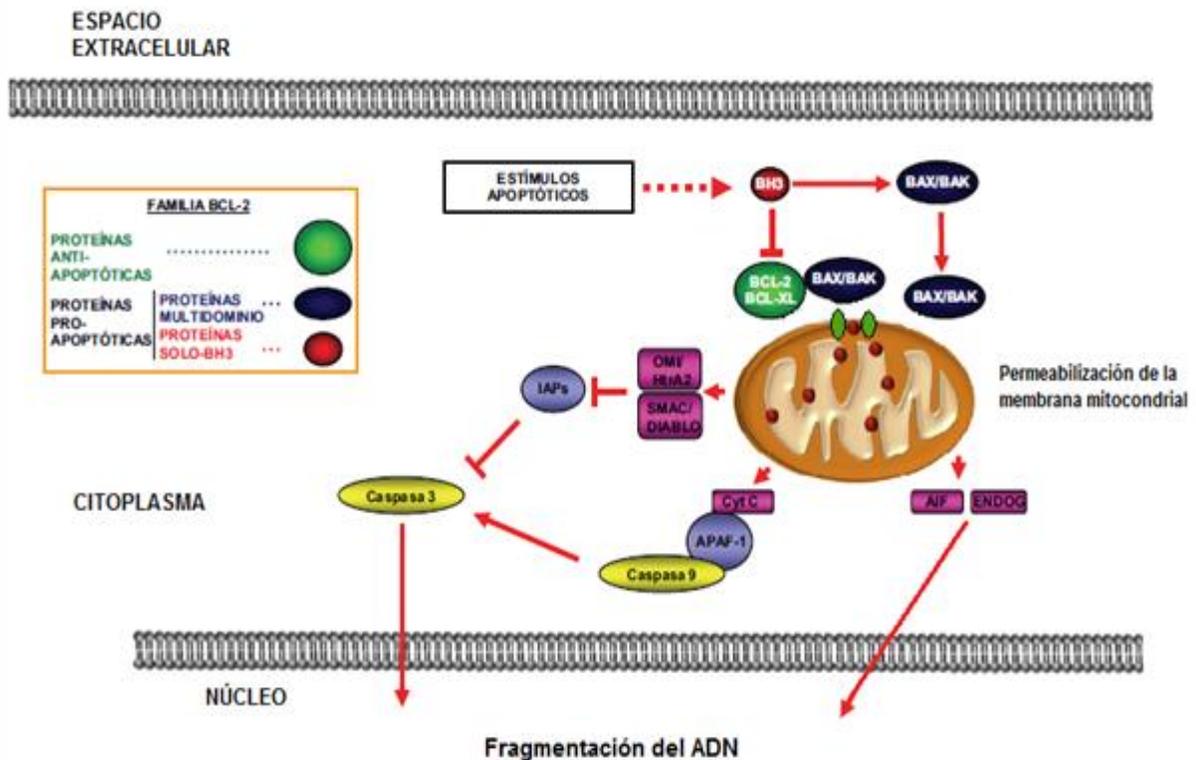


Fig.6.3 La detección de estímulos apoptóticos como incremento de GCs, aumento de ROS y deficiencia de factores de crecimiento entre otros, activa una serie de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 responsables de la permeabilización de la membrana mitocondrial, originando la salida de diversas moléculas como son: Citocromo C, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 y endonucleasas, que ya sea por sí mismas o activando pro-caspasas, son responsables de la proteólisis y fragmentación de ADN en la célula.

Es hasta la permeabilización de la membrana mitocondrial y salida del citocromo C que la vía intrínseca de la apoptosis se torna irreversible, motivo por el que muchos autores nombran a este evento como el inicio de la apoptosis a partir de la vía intrínseca.

Se ha visto que las proteínas pro-apoptóticas y las anti-apoptóticas pueden interactuar oponiéndose unas a otras (Oltvai y cols., 1993) e inhibiendo la acción de su contraparte. En este sentido, pareciera ser que las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L son capaces de inhibir la función de las pro-apoptóticas Bax y Bak, (Mikhailov y cols., 2001), al inhibir su oligomerización y posterior conexión a la membrana mitocondrial (Reed 2006).

6.5 Fase de ejecución. Activación de caspasas

Una vez que los genes pro-apoptóticos se han activado, se inicia con ellos una serie de reacciones que dan como resultado el corte y por lo tanto activación de un grupo de zimógenos llamados pro-caspasas. Una familia de cisteín-proteasas inactivas que al recibir la señal apoptótica sufren un rompimiento proteolítico dando lugar a dos subunidades activas, que dependiendo su función pueden clasificarse en caspasas iniciadoras, ejecutoras o mediadores inflamatorios.

Las caspasas iniciadoras (8, 9, y 10) son aquellas que al recibir la señal apoptótica proveniente de la vía extrínseca o intrínseca se auto escinden activándose y activando a otro tipo de caspasas, llamadas ejecutoras (3, 6 y 7) responsables directos de los cambios morfológicos en la célula que la llevaran a la apoptosis. Estos cambios en la célula incluyen condensación citoplasmática y de cromatina, fragmentación de DNA, vacuolización de la membrana plasmática, encogimiento celular y formación de cuerpos apoptóticos (Becerra, 2009).

El tercer grupo de caspasas son mediadores inflamatorios (1,2,4 y 5) que no participan en el proceso apoptótico, su función encargarse de la maduración de la prointerleucina a su forma pro-inflamatoria y biológicamente activa, un ejemplo es procaspasa 1 que actúa como la enzima convertidora de interleucina-1-b (ICE) (Ghayury cols., 1997).

Caspasa 3

Durante la muerte celular programada, la escisión de la procaspasa 3 ejecutora en caspasa 3 conduce a la proteólisis de las proteínas de reparación del DNA como p53, las proteínas del citoesqueleto actina, espectrina, para el desensamblado del citoesqueleto así como de la lámina nuclear (Kothakotay cols., 1997; Pike y cols., 1998) y del inhibidor de la desoxirribonucleasa-caspasa-activado (CAD), responsable de la fragmentación del DNA.

La técnica de inmunohistoquímica se emplea aprovechando la antigenicidad de caspasa 3 como un método de detección de la proteína activada, el patrón de expresión varía dependiendo el tiempo transcurrido entre el inicio de la apoptosis y la perfusión del cerebro. Un estudio hecho tras la lesión cerebral de roedores mostró que la marca de caspasa 3 se expresa a las seis horas después del daño, intensificándose transcurridas 24 horas y alcanzando su mayor expresión en hipocampo al tercer día (Keane y cols., 2001)

Capítulo 7. Vías de señalización relacionadas con la proliferación y supervivencia neuronal.

Además de la activación de receptores clásicos, pareciera ser que todas las hormonas de tipo esteroideo como progesterona, estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides, pueden inducir en la activación de receptores con actividad de tirosinas (Trk), responsables de activar cascadas de señalización que involucran moléculas como la adenilato ciclasa, proteínas G y la producción de segundos mensajeros como AMPc y Ca^{+2} intracelular (Boonyaratanakornkit y Edwards 2007), cuyo objetivo es activar otros factores de transcripción que en su mayoría, están relacionados con la proliferación, supervivencia, plasticidad y apoptosis.

Estas vías de señalización pueden involucrar más de un proceso celular, incluso algunos contradictorios, situación que va a depender de la presencia de ciertos factores, hormonas y neurotrofinas, tal es el caso de la activación mediada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), el cual está relacionado con la apoptosis, pero en presencia de hormonas gonadales, neurotrofinas y otros factores, puede activar al factor nuclear kappa beta (NF κ B) promoviendo la supervivencia neuronal (Wajant y Scheurich 2001; McEwen 2002; Marques-Fernandez y cols., 2013) al inducir la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x (Tamatani

y cols., 1999), el inhibidor de caspasa 8, cFLIP (Irmeler y cols., 1997) y las proteínas IAPs (Stehlik y cols., 1998).

Es este sentido, se proponen dos vías de señalización que pueden estar involucradas en la proliferación y supervivencia de células hipocámpales en animales expuestos a elevados niveles de GCs (McCubrey y cols., 2012). La vía ERK-MAPK responsable de la transcripción de genes como c-Fos, el cual junto a la proteína c-Jun forman el factor de transcripción AP-1, capaz de activar la síntesis de numerosos y diversos genes implicados en la proliferación celular (Murphy y Blenis 2006) y la vía PI3K-Akt involucrada en la regulación de genes anti-apoptóticos como Bcl-2, Bax y Bim, la vía mTOR y la inhibición de las señales pro-apoptóticas generadas por factores de transcripción como FoxO (Vadlakonda y cols., 2013), entre otras.

7.1 La vía ERK-MAPK

La vía de ERK/MAPK (por sus siglas en inglés Extracellular Regulated Kinases/Mitogen Associated Protein kinases) está mediada por la unión de neurotrofinas y factores de crecimiento a receptores con actividad de tirosinasa (Trk). Los cuales una vez activados desencadenan una cascada de fosforilaciones que permiten cambios en la expresión de determinados genes responsables de la proliferación, supervivencia, migración y apoptosis celular.

Es la unión del ligando al receptor Trk lo que induce la activación de Ras, una proteína con actividad de GTPasa que recluta a las cinasas de la familia Raf (A-Raf, B-Raf y Raf-1) (Daum y cols., 1994; O'Neill y Kolch 2004) para su posterior fosforilación y activación. Una vez activada, Raf reclutará y activará a las cinasas MEK1 y MEK2 (Kolch 2005) encargadas a su vez, de fosforilar a ERK1 y ERK2, también llamadas p42 y p44 las cuales ya activas tendrán dos posibles funciones, traslocar al núcleo para actuar como factores de transcripción regulando la expresión de diversos genes implicados en la proliferación, como c-fos, c-Jun, c-Myc, c-Myb y CREB (del inglés cyclin AMP-response element binding protein) (Davis 1995; Gille y cols., 1995; Grewal y cols., 1999; Vanhoutte y cols., 1999) o fosforilar cinasas ribosomales 6 (RSK) que también traslocan al núcleo para actuar como factores de transcripción (Bonni y cols., 1999; Bruning y cols., 2000), afectando la proliferación y diferenciación celular (Gene: RPS6KA1 ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1)

Otras implicaciones que ha mostrado la vía ERK-MAPK es en la sobrevivencia celular (Parrizas y cols., 1997; Feng y cols., 1999; Hetman y cols., 1999; Chaiboukadour y cols., 2004) al fosforilar proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bad (Scheid y cols., 1999) y Bim_{EL} (Biswas y Greene 2002) inhibiendo su actividad; En fenómenos de neuroprotección a través del BDNF (Hetman y cols., 1999; Han y Holtzman 2000; Rössler y Thiel 2004) y el factor de crecimiento epidermal (Rössler y Thiel 2004); Así como en la diferenciación neuronal (Perron y Bixby 1999; Atwal y cols., 2000; Gavalda y cols., 2004; Solr y cols., 2004).

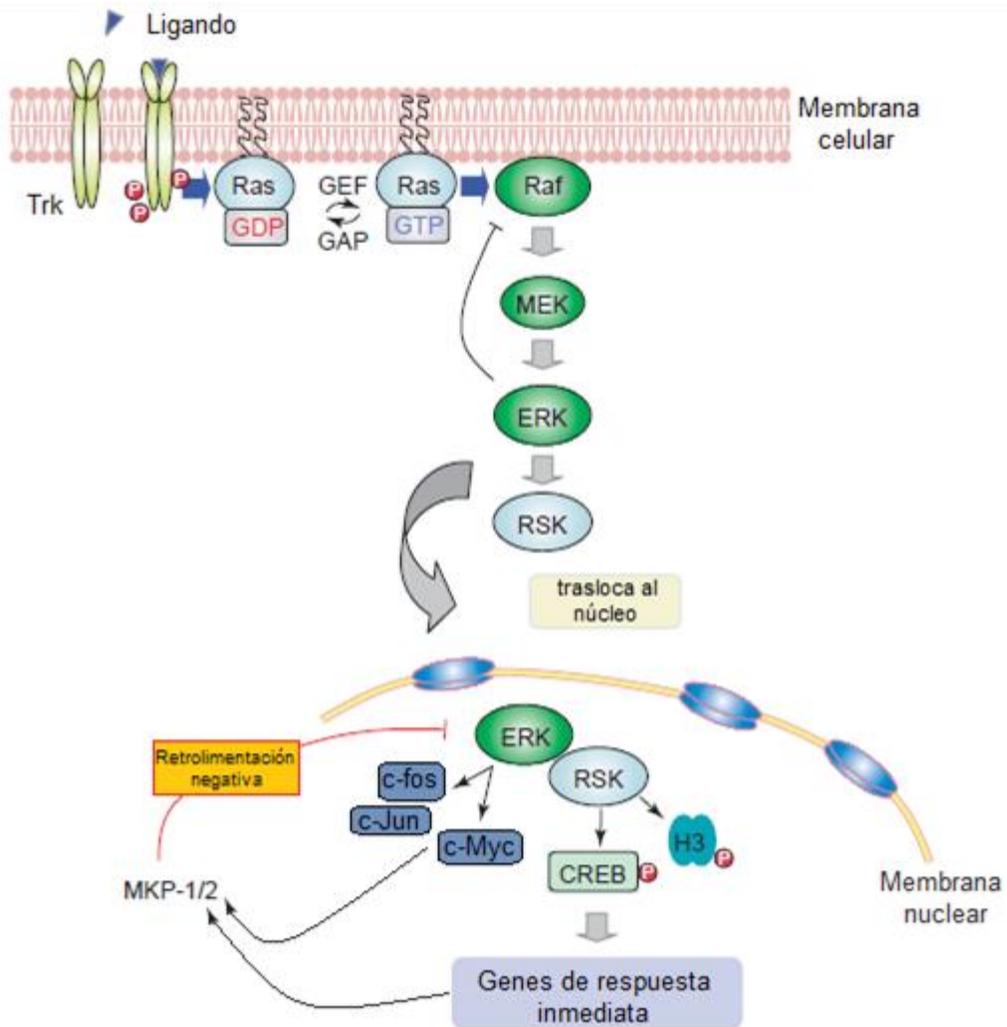


Fig. 7.1 Vía de señalización ERK-MAPK. Estímulos extracelulares como factores de crecimiento, citoquinas, mitógenos, hormonas y estrés oxidativo o térmico (Mebratu y Tesfaigzi 2010) activan a los receptores Trk iniciando una serie de reacciones que involucran la cascada de señalización Ras-Raf-MEK-ERK1 y ERK2.

Los objetivos de ERK1/ ERK2 son traslocar al núcleo donde por si mismos o a través de RSKs fosforilado activan. 1) Reguladores transcripcionales como CREB, 2) La transcripción de genes como c-fos, c-jun y c-Myc y 3) Modificaciones epigeneticas en histona H3 (Murphy y Blenis 2006).

Tomado y adaptado de Murphy y Blenis 2006.

Por otra parte, se ha visto que además de las hormonas esteroideas, neurotrofinas y factores de crecimiento, otras moléculas pueden regular la vía ERK-MAPK, tal es el caso del neurotransmisor glutamato (Wang y cols., 2004) y el receptor 5-HT1A (Lee y cols., 2005; Madhavan y cols., 2003, Mauler y cols., 2001), donde un estudio hecho con agonistas del receptor NMDA mostraron fosforilación de las cinasas ERK (Sgambato y cols., 1998; Mao y cols., 2004) probablemente a través de un mecanismo que implica una serie de cinasas sensibles a calcio (Perkinton y cols., 1999, 2000).

7.2 La vía PI3K-Akt

La activación de la vía PI3K-Akt inicia con el reclutamiento y activación del fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) a través de Ras-activado o vía receptores tirosincinasa (Trk), los cuales responden a diversos factores de crecimiento y citoquinas. Una vez activada, PI3K transfiere un grupo fosfato del ATP al fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP₂), un tipo de lípido contenido en la membrana celular que genera el fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) (Chong y cols., 2005) capaz de actuar como segundo mensajero al unirse a múltiples efectores, entre ellos, la Ser/Thr proteína quinasa Akt, también llamada PKB (Vanhaesebroeck y Alessi 2000; Pinzón y cols., 2009; McCubrey y cols., 2012) Fig.7.2.

En este sentido, Akt pueden unirse a diversas proteínas regulando su actividad (Song y cols., 2005). Tal es el caso de las proteínas de choque térmico o

Hsp (del inglés heat shock proteins), inducidas en la célula como respuesta al estrés, actúan como chaperonas promoviendo la estabilización y el plegamiento de otras proteínas (Konishi y cols., 1997; Rane y cols., 2003). De igual manera el complejo proteico rictor-mTOR, activado por nutrientes y factores de crecimiento, es capaz de interactuar con Akt a través del complejo TSC1 / TSC2 y rheb, controlando procesos de proliferación, supervivencia y metabolismo celular (Maiese y cols., 2012).

Es la fosforilación y por lo tanto activación final de la vía Akt, lo que proporciona a la célula una señal de proliferación y/o supervivencia que le permite hacer frente a estímulos apoptóticos. Estos efectos pueden deberse a.

I. La regulación directa de la apoptosis a través de:

1) La fosforilación e inactivación de diversas proteínas pro-apopticas como Bad (Datta y cols., 1977), Bim (Qi y cols., 2006) y caspasa-9 (Cardone y cols., 1998).

2) La regulación negativa de la vía SAPK/JNK (Paradis y Ruvkun 1998; Kim y cols., 2001; Barthwal y cols., 2003) Fig.7.2

II. El control transcripcional de la supervivencia celular por medio de la fosforilación de:

1) La proteína IKK, responsable indirecto de aumentar la actividad de NF-kB estimulando la transcripción de genes pro-supervivencia (Bernstein y Dennis 2008).

2) La proteína MDM2 provocando la ubiquitinilación de p53 para su destrucción por el proteasoma (Gottlieb y cols., 2002; Bernstein y Dennis 2008)

3) Los factores de transcripción de la familia FoxO, responsables de mediar el factor de crecimiento insulínico, la resistencia al estrés oxidativo (Paroni y cols., 2012) y la inducción de la apoptosis (Brunet y cols., 1999).

4) La proteína YAP encargada de regular p73, una proteína de la familia de p53, considera también un supresor tumoral. (Basuu y cols., 2003)

5) La proteína CREB, también capaz de la transcripción de genes pro-sobrevivencia (Barkett y Gilmore 1999; Wang y cols., 1999) Fig.7.2.

II. Los efectos de Akt sobre el metabolismo celular

Estudios en roedores mostraron que la fosforilación e inhibición de la enzima GSK3beta (del inglés glycogen synthase kinase 3 beta) a partir de Akt atenuó la activación de caspasa-3 (Bijur y cols., 2000) y p53 (Jope y cols., 2006), al mismo tiempo que permitió una mayor expresión de las proteínas de choque térmico, reforzando la plasticidad celular y la supervivencia (Bijur y Jope 2000) Fig.7.2.

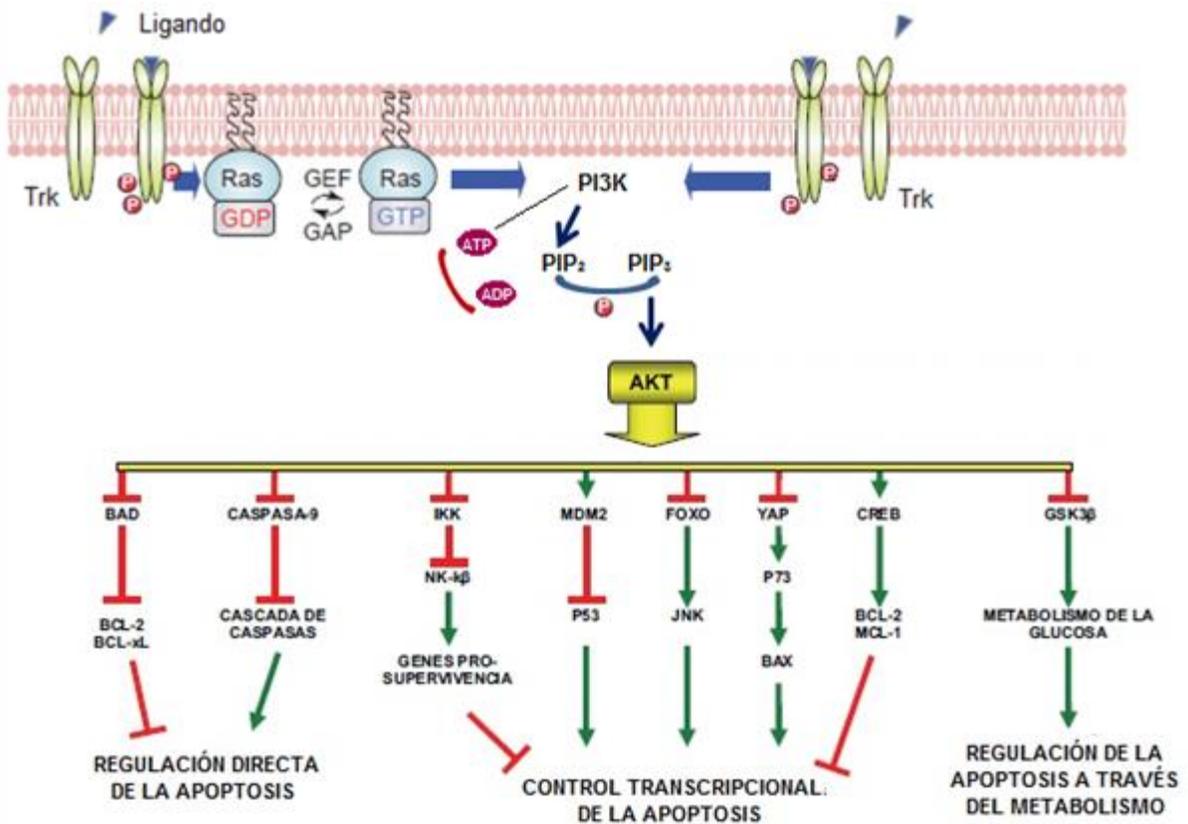


Fig. 7.2 Vía de señalización PI3K/Akt y los posibles sustratos de Akt activado, las flechas verdes indican aquellas rutas que se ven favorecidas tras su activación por AKT y las líneas rojas aquellas que se ven inhibidas. Tomado y adaptado de Song 2005

7.3 Alteraciones epigenéticas.

Otro factor que se ha visto responsable de afectar la proliferación y supervivencia hipocampal en el estrés, son las alteraciones epigenéticas ocasionadas por los elevados niveles de GCs. Tal es el caso de la fosforilación de Serina 10 y acetilación de Lisina 14 en la histona 3 (H3S10p K14ac) que muestran las células granulares del GD de roedores sometidos a nado forzado, y que se han

visto responsables de la transcripción de genes como c-Fos y ERG-1, lo que es factor crucial para el aumento en la proliferación de células del GD (Madhavan y cols., 2003).Fig. 7. 3.

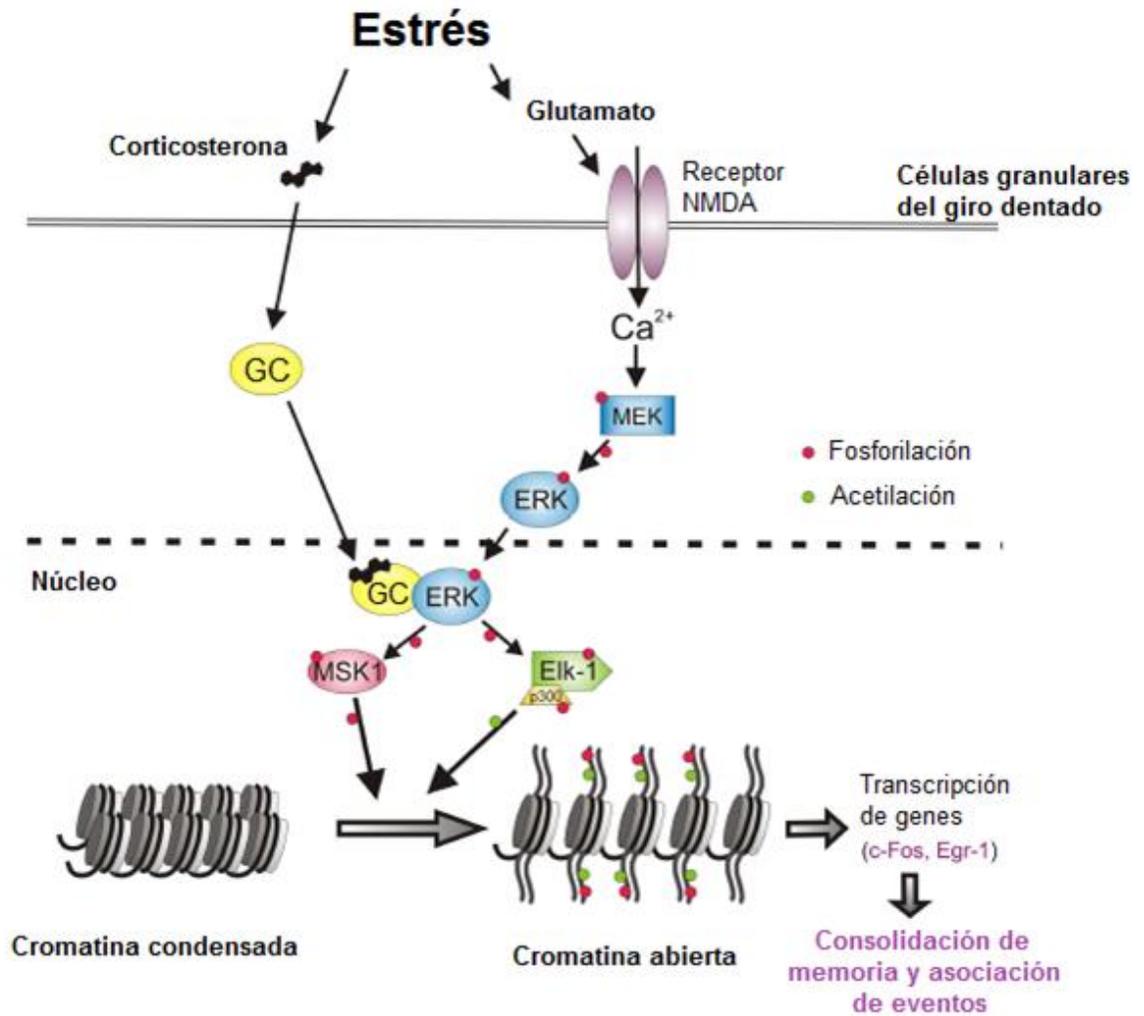


Fig. 7.3 Estudios han mostrado que el aumento en los niveles de GCs es capaz de originar modificaciones epigenéticas en la histona 3, ya sea fosforilando directamente a la quinasa ERK o vía receptores NMDA – MEK – ERK, ocasionando la transcripción de genes que promueven la proliferación celular en el GD. Tomado y adaptado de Reul 2014

Capítulo 8. Diseño de la investigación

8.1 Planteamiento del problema

El aumento de los niveles de glucocorticoides en respuesta al estrés es considerado un factor importante para el desarrollo de enfermedades psiquiátricas (Lee y cols., 2012), debido a que se le ha asociado con la disminución en la proliferación, sobrevivencia, diferenciación y apoptosis de neuronas y células gliales (Duman 2004; Mirescu y cols., 2006; Holsen y cols., 2011).

Diversos estudios realizados en ratas macho adultos sometidos a estrés agudo y crónico muestran que el tiempo de exposición al agente estresor es importante para la afectación en los procesos neurogénicos y de plasticidad en las células del hipocampo (Magarinos y cols., 1996; Galea y cols., 1997; Hillerer y cols., 2013, Kirby y cols., 2014), estos efectos parecen depender del sexo del individuo y en el caso de las hembras, la magnitud del efecto puede estar asociada a las fluctuaciones hormonales propias del ciclo reproductivo.

En el presente trabajo se espera observar una disminución en la proliferación y sobrevivencia, así como un aumento en la apoptosis de células del hipocampo de ratas que han sido ovariectomizadas, y por lo tanto, sus hormonas gonadales están ausentes, o bien en aquellas que se encuentran en las fases reproductivas de diestro-metaestro, donde los niveles de hormonas ováricas son bajos.

8.2 Pregunta de investigación

¿Cómo afecta el estrés agudo a la proliferación, sobrevivencia y apoptosis de las neuronas hipocámpicas en ratas hembra en diferentes condiciones endócrinas?

8.3 Justificación

Debido a que el estrés es un factor cada vez más común en la vida diaria, así como un detonador de enfermedades depresivas que pueden convertirse en discapacitantes, afectando principalmente a individuos del sexo femenino (Caraveo-Arduaga y cols., 1999; Bello y cols., 2005).

El presente trabajo busca evaluar si las hormonas ováricas reportadas como moduladores positivos de la neurogénesis y la plasticidad de células hipocámpicas (Fink y cols., 1996; McEwen y Alves, 1999; Gillies y cols., 2004; Craig y cols., 2005, Cahill, 2006; Chao y cols., 2006; Galea y cols. 2006, 2008, 2013; Brann y cols., 2007; Craig y Murphy, 2007; Kataria y cols., 2010, Estrada-Camarena y cols., 2010; Horst 2011; Scott y cols., 2012; Karki y cols., 2014), son factores determinantes en el efecto del estrés agudo sobre la proliferación, sobrevivencia y apoptosis neuronal, así como el desarrollo de conductas tipo depresivas en ratas hembra que se encuentran en diferentes condiciones endócrinas. A fin de contribuir a esclarecer la etiología molecular de los trastornos depresivos asociados al estrés.

8.4 Hipótesis

Si las hormonas gonadales confieren protección al cerebro reduciendo la respuesta al estrés, entonces el efecto del estrés agudo sobre la proliferación, sobrevivencia y apoptosis de células hipocampales, será mayor en ratas hembras ovariectomizadas que en ratas en proestro-estro.

8.5 Objetivo general

Conocer el efecto del estrés agudo sobre la proliferación, sobrevivencia y apoptosis de células en el hipocampo, así como el desarrollo de conductas tipo depresivas en ratas hembra en diferentes condiciones endócrinas.

8.6 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto del estrés agudo sobre el desarrollo de conductas tipo depresivas en la rata en proestro, diestro y ovariectomizada
2. Determinar el impacto del estrés agudo en la proliferación y apoptosis de células del hipocampo de ratas en proestro, diestro y ovariectomizadas.

Capítulo 9. Material y métodos

9.1 Animales

Se emplearon 60 ratas hembras de la cepa Wistar con un peso de entre 250 y 300 gramos aproximadamente, las cuales se mantuvieron en bioterio en condiciones de temperatura y humedad controladas, ciclo de luz-obscuridad invertido (12/12h), y con acceso libre a agua y alimento. Su manipulación fue llevada a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y manejo de los animales (NOM-062-ZOO-1999).

9.2 Metodología

Los animales fueron divididos en tres grupos de forma aleatoria, el primer grupo fue sometido a ovariectomía (OVX) a fin de retirar la principal fuente natural de hormonas gonadales, mientras que el segundo y tercer grupo fueron falsamente operados (sham). Todas las cirugías se realizaron bajo anestesia con tribromoetanol (200mg/kg, i.p.) con un periodo de recuperación de tres semanas. Al término de dicho periodo cada grupo fue subdividido en dos grupos, uno de ellos fue sometido a estrés agudo mediante la prueba de Porsolt, el otro fue el grupo control (Figura 9.1).

Posteriormente los roedores fueron agrupados según su condición endocrina en: proestro/estro (niveles de estrógenos y progestinas elevados), metaestro/diestro (niveles bajos de estrógenos y progestinas) y ovariectomizadas (ausencia de

hormonas gonadales). La fase del ciclo estral se determinó mediante la toma de frotis vaginal media hora antes de la preprueba y prueba a fin de determinar mediante la citología vaginal las fases del ciclo estral. Predominio de células nucleadas como indicador del proestro, cornificadas del estro y leucocitos como indicador de diestro (Mirescu y cols. 2006).

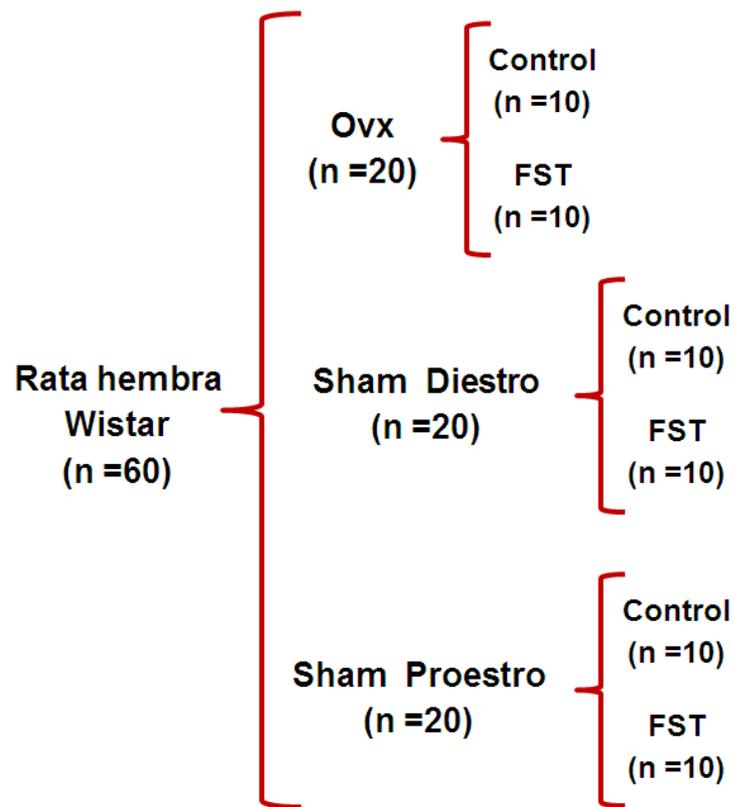


Figura 9.1. Diagrama de flujo que muestra la distribución de los grupos. Abreviaturas. Ovx = ovariectomía; FST = Prueba de nado forzado por sus siglas en inglés; Diestro= Animales en Diestro y metaestro o niveles de hormonas gonadales bajos; Proestro= Animales en proestro y estro o niveles de hormonas gonadales elevados

Modelo de estrés agudo: Prueba de Porsolt o de nado forzado (FST).

Esta prueba consta de dos sesiones, la primera llamada pre-prueba, tiene una duración de 15 minutos y tiene como finalidad inducir un estado de desesperanza en el roedor. La segunda sesión llamada prueba se realiza 24 horas después de la pre-prueba, tiene una duración de 5 minutos y consiste en colocar nuevamente al animal en el cilindro con agua, a fin de evaluar los efectos ocasionados por la pre-prueba. Dicha prueba consiste, en introducir a la rata en un cilindro de 20 cm de diámetro por 46 de alto con agua hasta 30 cm de profundidad, de tal forma que el roedor no pueda salir ni tocar el fondo. En un principio el animal realizara movimientos vigorosos con la finalidad de escapar a la situación que se le presenta, pero al darse cuenta que no existe manera de hacerlo adquirirá una conducta de desesperanza, representada por la inmovilidad (movimientos mínimos para mantenerse a flote con la cabeza fuera del agua). Ambas sesiones son videograbadas y posteriormente analizadas al cuantificar el número de veces que el animal permanece inmóvil en intervalos de 5 segundos.

9.3 Obtención y procesamiento de tejido

Media hora después de concluido el estrés, los animales fueron anestesiados con tribromoetanol y perfundidos con un buffer de fosfatos (pH=7.4). Los cerebros fueron extraídos y posfijados por 7 días en paraformaldehído al 4%, para posteriormente ser almacenados en una solución de sacarosa al 30% durante una semana para su estabilización.

Posteriormente se realizaron cortes coronales del tejido cerebral en un microtomo deslizante (Leica, Buffalo Grove, IL, EE.UU.), las secciones se almacenaron a 4°C en solución crioprotectora hasta su uso.

9.4 Medición de corticosterona en sangre.

Previo a la perfusión, se extrajo sangre por punción cardiaca para posteriormente ser centrifugada a 3000 rpm durante 30 min. El suero fue recuperado y almacenado a 4°C para la determinación de niveles de glucocorticoides. Los niveles de corticosterona se determinaron usando un kit comercial de Elisa (Enzo LifeSciences) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Todas las muestras se corrieron por triplicado, incluyendo las de la curva estándar para determinar la dilución a usar.

9.5 Inmunohistoquímica

El método empleado fue inmunohistoquímica por flotación libre para marcajes simples. Para proliferación se empleó el anticuerpo anti-Ki67 de conejo (1:1000; Abcam, San Francisco, CA, EE.UU.) y para sobrevivencia el anticuerpo anti-BrdU de rata (1:500; Accurate, Westbury, NY, USA) previo tratamiento para la inmunodetección de BrdU por incubación en HCl 2N durante 30 minutos a 37°C seguido por lavados en buffer de boratos al 0.1M pH 8.5

La detección de apoptosis se determinó con un anticuerpo monoclonal anti-Caspase-3 de ratón (1: 500; Imgenex, San Diego, California, EE.UU.). Todos los anticuerpos primarios fueron reconocidos con anticuerpos secundarios acoplados a biotina (Jackson Immunoresearch, West Grove, Pensilvania, EE.UU.) y marcados con el complejo ABC para posteriormente ser revelados con diaminobezidina Fig.9.2

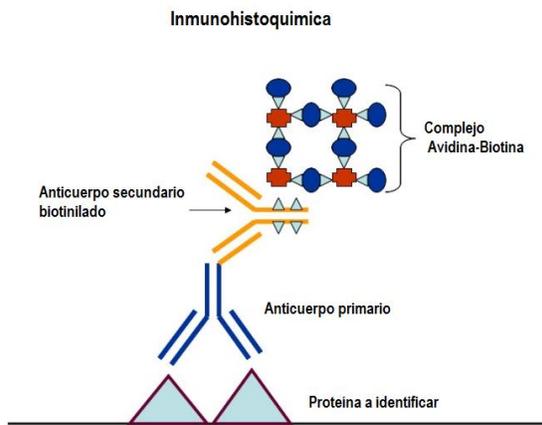


Fig. 9.2 La Avidina es una glicoproteína con gran afinidad por la Biotina, lo que le permite formar el complejo peroxidasa Avidina-Biotina que posteriormente será revelado con ayuda de aminodiabencidina (DAB). Tomado y adaptado de: https://www.labce.com/spg538343_avidin_biotin_complex_abc_methods.aspx

Debido a que el BrdU es un marcador exógeno se realizó la administración previa del mismo en una dosis de 75 mg /kg, ip, a las 14 y 2 hrs previas a la primera sesión del estrés agudo (FST) (Vega-Rivera, 2014) Fig. 9.3.

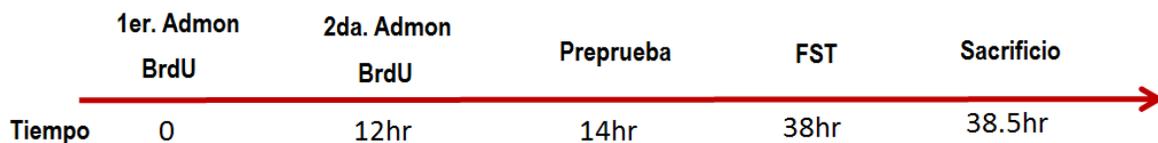


Fig. 9.3 Línea de tiempo desde la primer administración de BrdU hasta el sacrificio de los animales. Abreviaturas. BrdU = 5-bromo-2-desoxiuridina; FST = Prueba de nado forzado por sus siglas en inglés.

El número total de marcas fue determinado de manera manual a través de un microscopio equipado con cámara digital (Leica), las áreas evaluadas fueron la ZSG del GD para Ki67 y BrdU mientras que para apoptosis se cuantificó GD y CA3, esta última con la finalidad de identificar si existe muerte en las células maduras. Todas las muestras se procesaron por triplicado.

9.6 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar. La comparación entre grupos se realizó por ANOVA de dos vías considerando el estrés como factor A y la condición endocrina como factor B, en el caso de los datos que no cumplen con los supuestos de normalidad y varianzas iguales, se emplea ANOVA de rangos (Kruskal-Wallis), la prueba post-hoc empleada fue Student-Newman-Keuls (SNK). Las diferencias con una $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

Capítulo 10. Resultados

10.1 Efecto de la exposición a la prueba de Porsolt sobre la conducta de inmovilidad

Figura 10.1 Muestra el desarrollo de la conducta de inmovilidad en intervalos de 5 minutos durante la pre-prueba (primer sesión de nado con duración de 15 minutos). Se observa que independientemente de las condiciones endocrinas el nivel de desesperanza aumenta significativamente conforme transcurre la sesión ($p < 0.05$ vs mismos grupos a los 15 min). El análisis multivariado de dos vías mostró significancia para el factor tiempo ($F: 2,81=57.07$; $p < 0.001$); No así para el factor condición endocrina ($F: 2,81=1.18$, ns) y la interacción ($F: 4,81=0.93$; ns).

La figura 10.2 muestra la conducta de inmovilidad en animales en diferentes condiciones endocrinas durante la sesión de prueba (sesión de 5 min). Como puede observarse los animales en proestro/estro (hormona alta), presentaron menor inmovilidad en comparación al grupo de hembras OVX ($p=0.014$) y en metaestro/diestro (hormona baja) ($p=0.005$). La ANOVA de una vía mostró los siguientes valores $F: 2,27 = 6.208$; $p = 0.006$

Palabras clave y su significado: proestro/estro = niveles altos de hormonas gonadales; metaestro/diestro = niveles bajos de hormonas gonadales; ovx = sin hormonas gonadales; FST = Prueba de nado forzado; control = animales no expuestos a ningún estresor

Inmovilidad en la pre-prueba en intervalos de 5 min

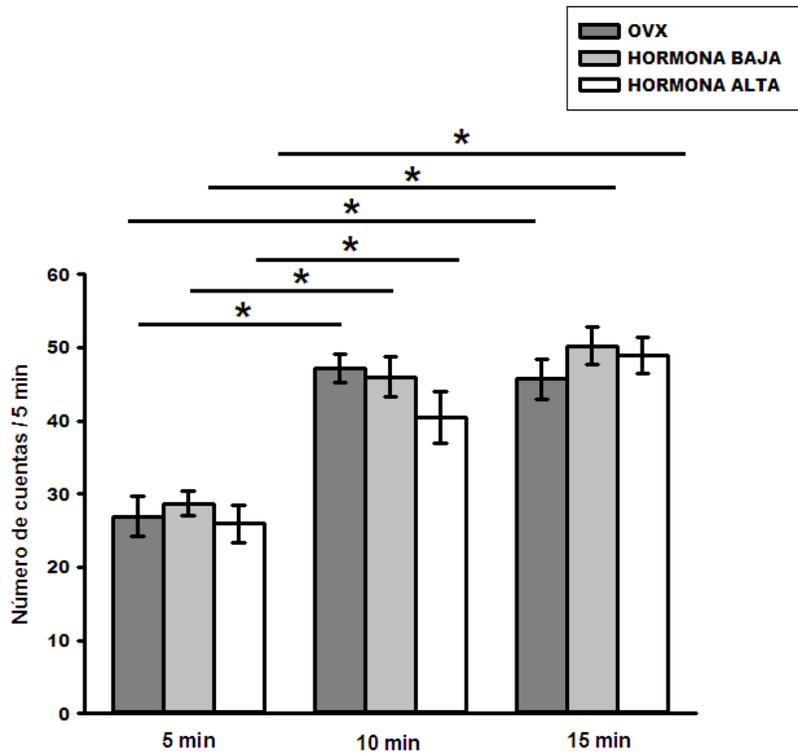


Fig. 10.1 Efecto de la exposición al nado forzado durante 15 min en intervalos de 5 min sobre el desarrollo de la conducta de inmovilidad en hembras ovx y sham en metaestro/diestro (hormona baja) y proestro/estro (hormona alta) ($n = 10$). Los datos representan la media \pm E.S M de la frecuencia de la conducta de inmovilidad registrada en intervalos de 5 segundos durante 15 minutos. * $p < 0.05$. Prueba post hoc Student-Newman-Keuls (NSK).

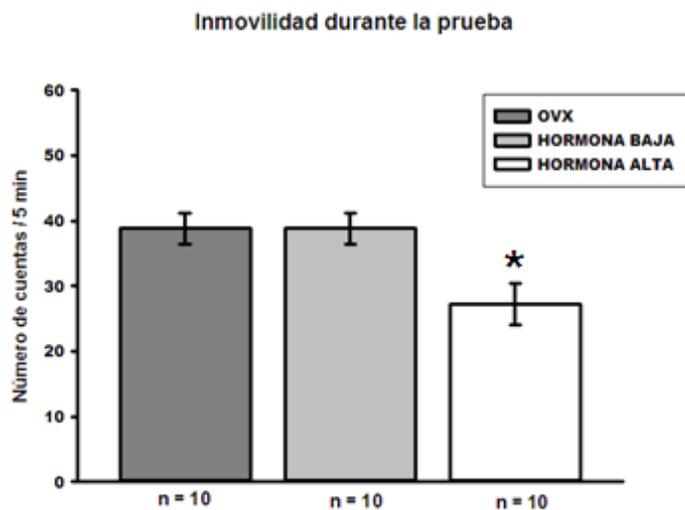


Figura 10.2 Efecto de la exposición a una segunda sesión de nado en el desarrollo de la conducta de inmovilidad en hembras ovariectomizadas y sham en metaestro/diestro (con **los** hormona baja) y en proestro/estro (hormona alta (n = 10). Los datos representan la media \pm E.S M de la frecuencia de la conducta de inmovilidad durante los 5 min que dura la prueba. *p = \leq 0.05 y **p <0.001. Prueba post-hoc Student-Newman-Keuls (NSK).

La figura 10.3 muestra los niveles de corticosterona en animales con diferentes condiciones endocrinas que fueron sometidos a las dos sesiones de estrés versus aquellos que no fueron estresados (control). Se observa que el FST incrementa los niveles de corticosterona en animales independientemente de la condición endocrina.

El análisis multivariado de dos vías mostró los siguientes resultados: para el factor estrés (F: 1,19=30.673; p<0.001); para el factor condición endocrina (F:2,19=9.031; p=0,002); y la interacción (F:2,19=3.221; p=0.062).

En la prueba post-hoc se muestra que los niveles de hormonas gonadales si influyen en la respuesta al estrés, ya que los grupos de animales estresados mostrarán mayor concentración de corticosterona en los animales sham que en

hembras OVX. Esto es metaestro/diestro/estrés vs ovx/estrés; $p=0.022$; lo mismo que un aumento del 58%, mientras que en los grupos proestro/estro/estrés vs ovx/estrés; $p=0.009$; o aumento del 108%. En cuanto a los grupos control se observó algo similar, donde las concentraciones de corticosterona son mayores en el grupo de hembras en proestro/estro vs las OVX; $p= 0.027$ o lo mismo que un aumento del 56%, y proestro/estro vs metaestro/diestro; la $p = 0.008$; lo mismo que un aumento del 86%. Sin diferencias significativas entre los controles en metaestro/diestro y OVX (ns).

CORTICOSTERONA

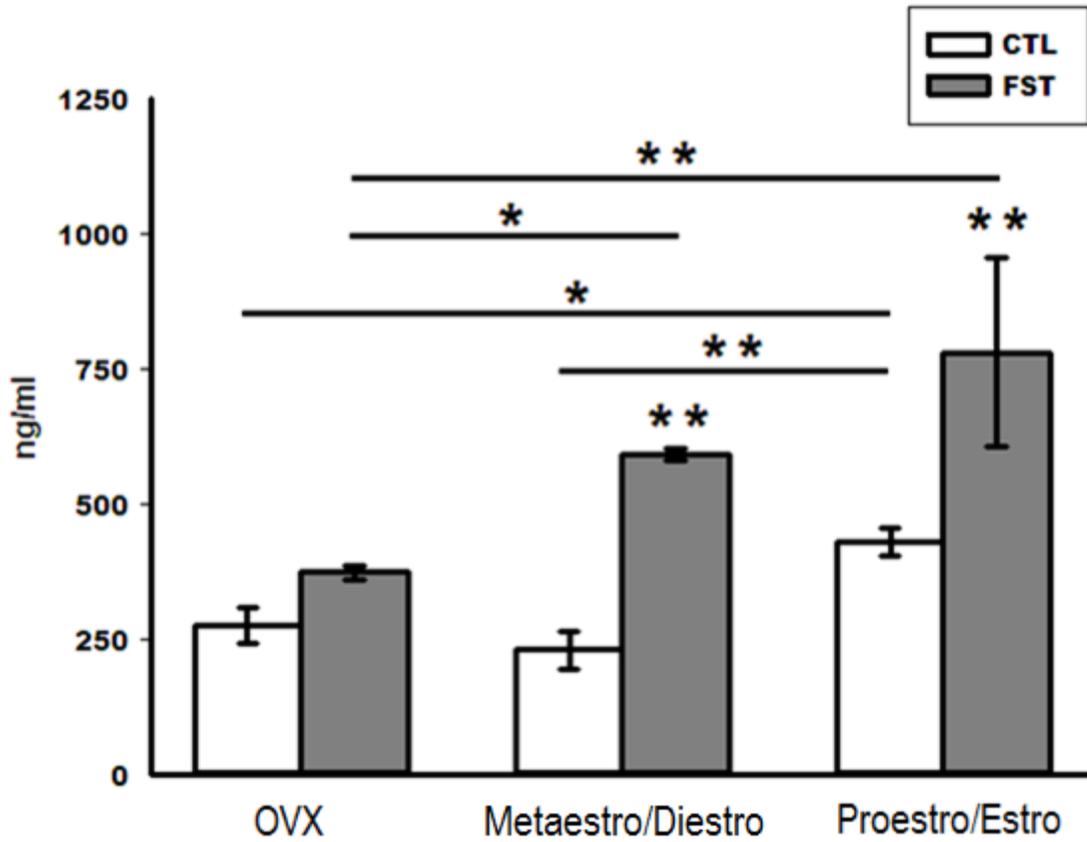


Figura 10.3 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la concentración de corticosterona en plasma al momento del sacrificio de hembras ovx y sham en metaestro/diestro (hormona baja) y proestro/estro (hormona alta) (n = 5). Los datos representan la media de la concentración de corticosterona en plasma ± E.S M. *p = ≤0.05, **p<0.01 Prueba post-hoc Student-Newman-Keuls (NSK).

10.3 Efecto de la exposición a la prueba de Porsolt en la proliferación de células de nueva generación en el giro dentado (GD).

La figura 10.4 muestra fotomicrografías representativas de cortes coronales del cerebro de animales en diferentes condiciones endocrinas sometidos a la prueba de Porsolt que fueron procesados mediante la inmuno-histoquímica para medir la proliferación celular (Ki67).

La figura 10.5 muestra el promedio del número de células inmunopositivas al marcador Ki67. El análisis multivariado indica que los efectos del estrés sobre la proliferación dependen de la condición endocrina, donde se muestran los siguientes resultados: para el factor estrés ($F:1,24=32.450$; $p < 0.001$); para el factor condición endocrina ($F: 2,24=2.055$; ns) y la interacción ($F: 2,24 = 10.616$; $p < 0.001$).

La prueba post-hoc muestra una disminución de la proliferación de células de nueva generación en los animales control en proestro/estro en comparación a los OVX ($p = 0.025$). No se observaron diferencias entre los animales en metaestro/diestro y las OVX.

Sin embargo el mayor efecto se muestra en el grupo de animales en proestro/estro, donde la exposición a la FTS incremento la proliferación de células de

nueva generación en el GD un 190%; $p < 0.001$; No así en las otras condiciones endocrinas que fueron expuestas a estrés vs su control (ns)

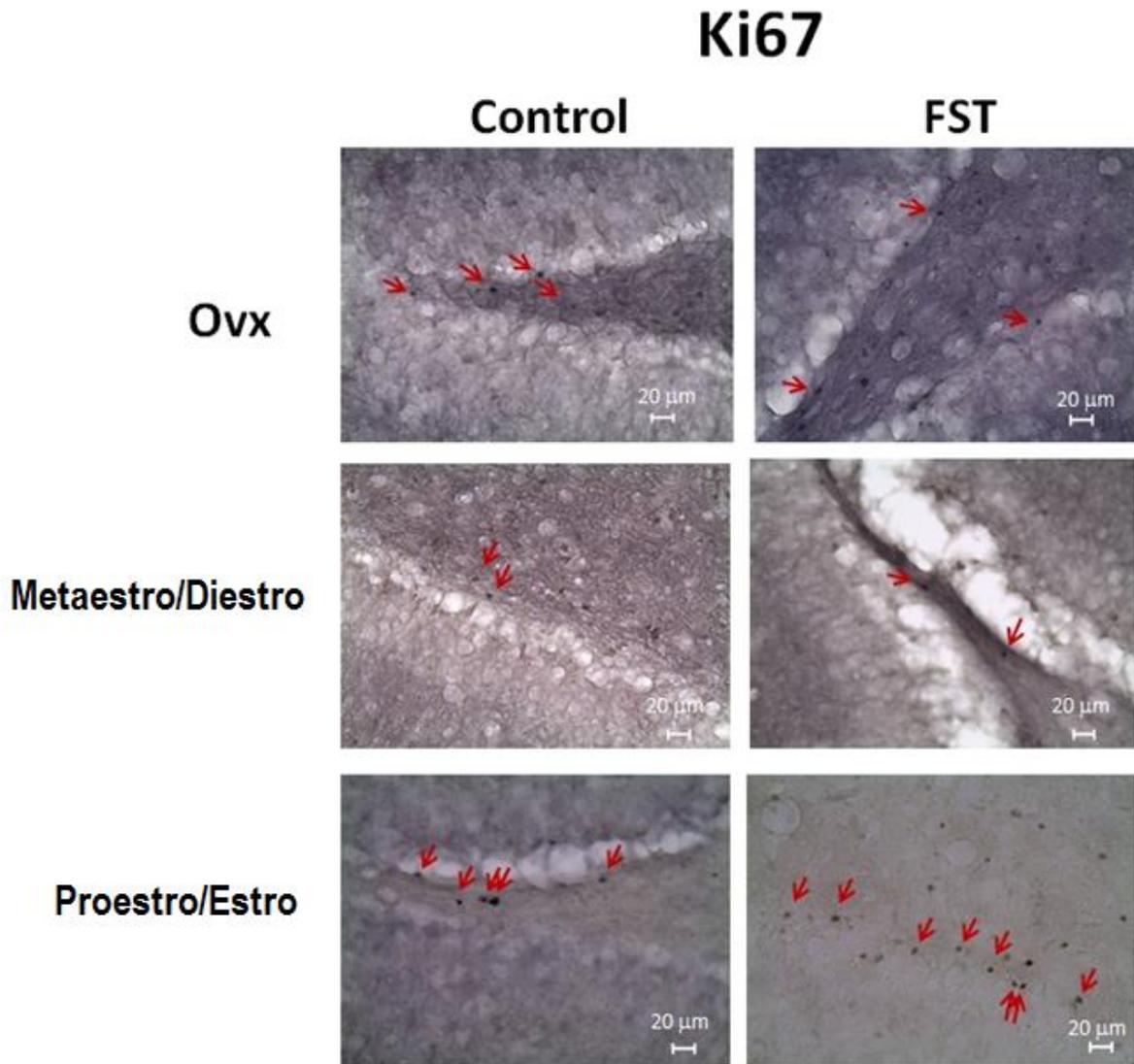


Fig. 10.4 Fotomicrografías representativas de cortes coronales del cerebro de animales en diferentes condiciones endocrinas que fueron sometidos a la prueba de Porsolt y procesados mediante inmuno-histoquímica con el marcador Ki67 para medir la proliferación celular. Las flechas muestran las marcas contabilizadas. El área que se evaluó fue la zona sub-granular del GD.

PROLIFERACIÓN (Ki67)

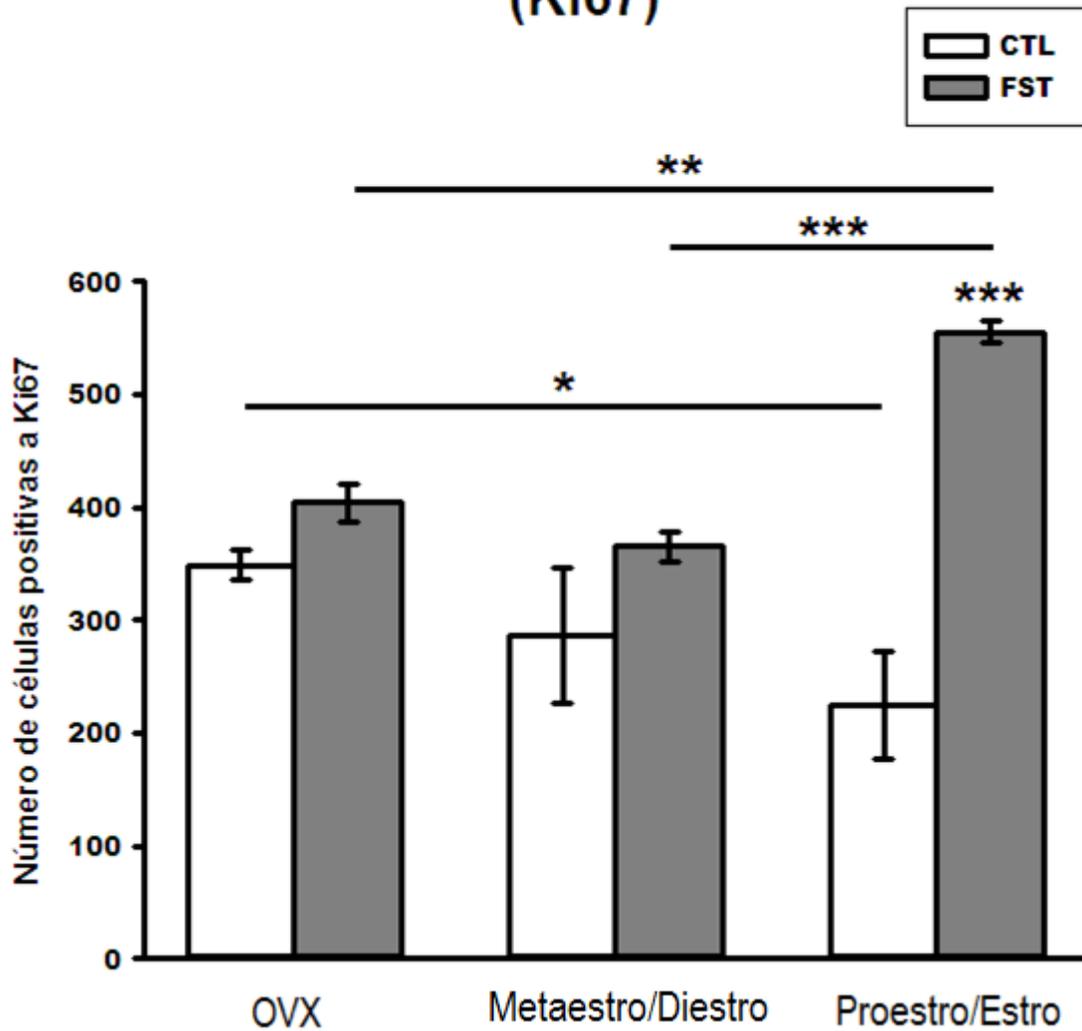


Figura 10.5 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la proliferación de células de nueva generación en el giro dentado de animales ovariectomizados y sham en diestro/ y proestro (n = 5). Los datos representan la media del número de células inmunorreactivas a Ki67±E.S.M. *p = ≤0.05, **p≤0.01 y ***p≤0.001. Prueba post-hoc Student-Newman-Keuls (NSK).

10.4 Efecto de la exposición a la prueba de Porsolt en la sobrevivencia temprana de células de nueva generación en el giro dentado (GD).

La figura 10.6 muestra fotomicrografías representativas de cortes coronales del cerebro de animales en diferentes condiciones endocrinas sometidos a la prueba de Porsolt que previamente fueron administrados con BrdU y que fueron procesados mediante la inmuno-histoquímica para medir la sobrevivencia temprana (BrdU).

La figura 10.7 muestra el promedio del número de células inmunopositivas a BrdU. La ANOVA de dos vías mostró los siguientes resultados: para el factor estrés ($F: 1,23 = 25.75; p < 0.001$); para el factor condición endocrina ($F: 2,23 = 36.38; p < 0.001$); y la interacción ($F: 2,23 = 2.85; ns$).

El análisis post-hoc indica que en los animales no estresados, las hembras en proestro/estro mostraron mayor número de células positivas a BrdU en comparación a las hembras en metaestro/diestro ($p < 0.001$) y ovariectomizadas ($p < 0.001$) no así al comparar los grupos de animales en metaestro/diestro y ovx (ns). En contraste, se observó que el estrés disminuyó el número de células inmunopositivas a BrdU en todas las condiciones endocrinas, no siendo significativo en los animales ovx, mientras que en los grupos de animales sham si se muestra significancia de $p < 0.01$ para los animales en metaestro/diestro/estrés vs su control y de $p < 0.001$ para los animales en proestro/estro/estrés vs su control

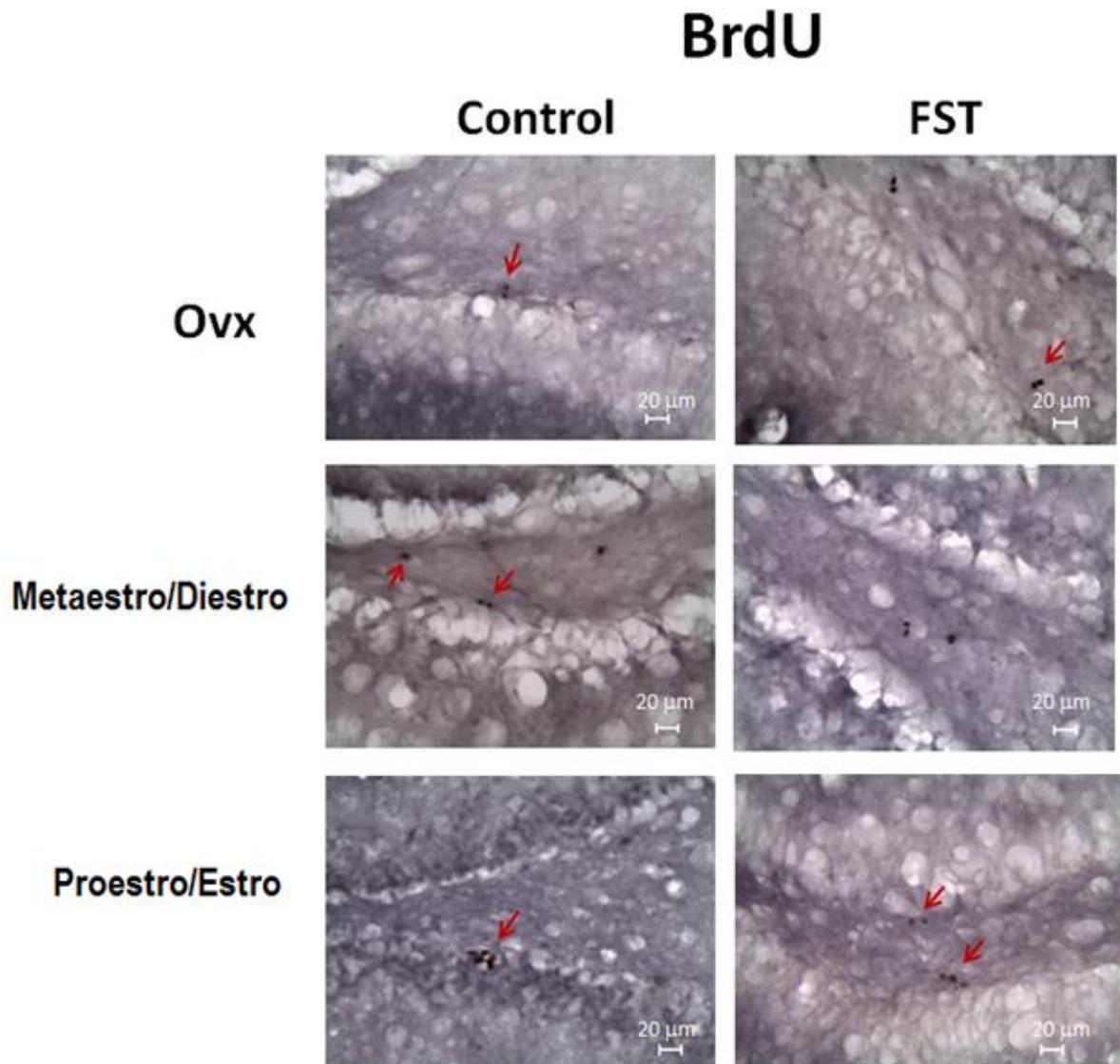


Fig. 10.6 Fotomicrografías representativas de cortes coronales del cerebro de animales en diferentes condiciones endocrinas que fueron administrados con BrdU y sometidos a la prueba de Porsolt, el tejido fue procesado mediante inmuno-histoquímica para BrdU con la finalidad de medir la sobrevivencia temprana. Las flechas muestran las marcas contabilizadas. El área que se evaluó fue la zona zub-granular del GD.

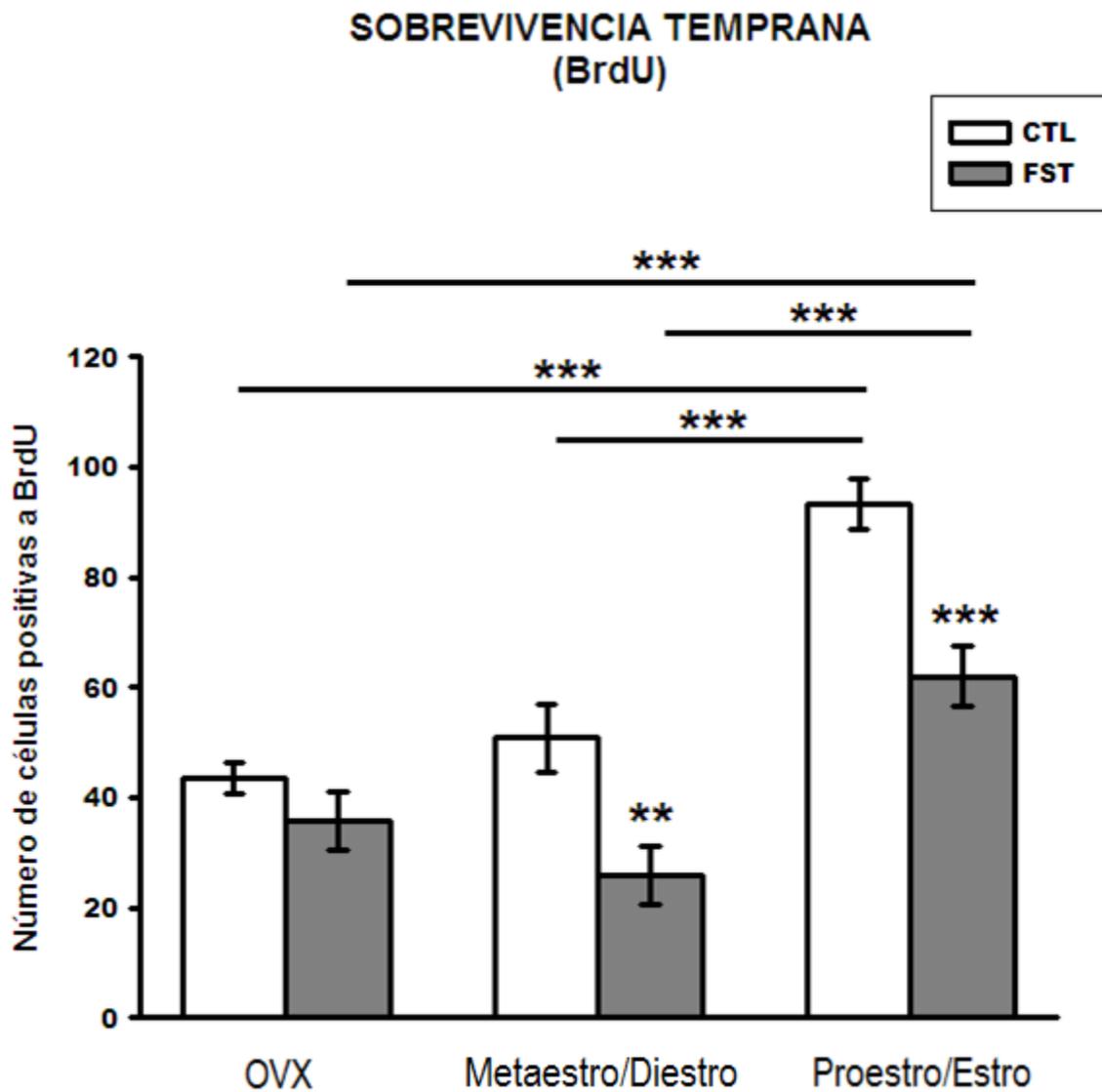


Figura 10.6 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la sobrevivencia temprana (24 hrs) de células de nueva generación en el giro dentado de animales ovariectomizados y sham en las fases de metaestro/diestro y proestro/estro (n = 5). Los datos representan la media del número de células inmunorreactivas a BrdU \pm E.S.M* $p = \leq 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Prueba post-hoc Student-Newman-Keuls (NSK).

10.5 Efecto de la exposición a la prueba de Porsolt en la apoptosis de células de nueva generación en el giro dentado (GD).

La figura 10.8 muestra fotomicrografías representativas de cortes coronales del cerebro de animales en diferentes condiciones endocrinas sometidos a la prueba de Porsolt y que fueron procesados mediante la técnica de inmuno-histoquímica para medir apoptosis a través de caspasa 3.

La figura 10.9 muestra la cuantificación de células inmunopositivas a BrdU. La ANOVA de dos vías mostró los siguientes resultados: para el factor estrés ($F: 1,20 = 8.082$; $p = 0.010$); para el factor condición endocrina ($F: 2,20 = 0.160$; ns) mientras que en la interacción ($F: 2,20 = 6.272$; $p=0.008$).

El análisis post-hoc indica que en las hembras no estresadas en la fase de hormona alta muestra menor número de células reactivas a caspasa 3 en comparación con grupo en hormona baja ($p < 0.001$), no así al compararlo con el grupo de ovariectomizadas (ns), de igual manera que no existen diferencias significativas entre hembras en hormona baja-control vs ovariectomizadas- control (ns).

En contraste, los animales estresados no muestran ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes condiciones endocrinas.

Al comparar las hembras bajo la misma condición endocrina que fueron estresadas de las sin estresar, se observa que solo en la hormona alta existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), mientras que entre los animales en hormona baja (ns) y hormona alta (ns) no.

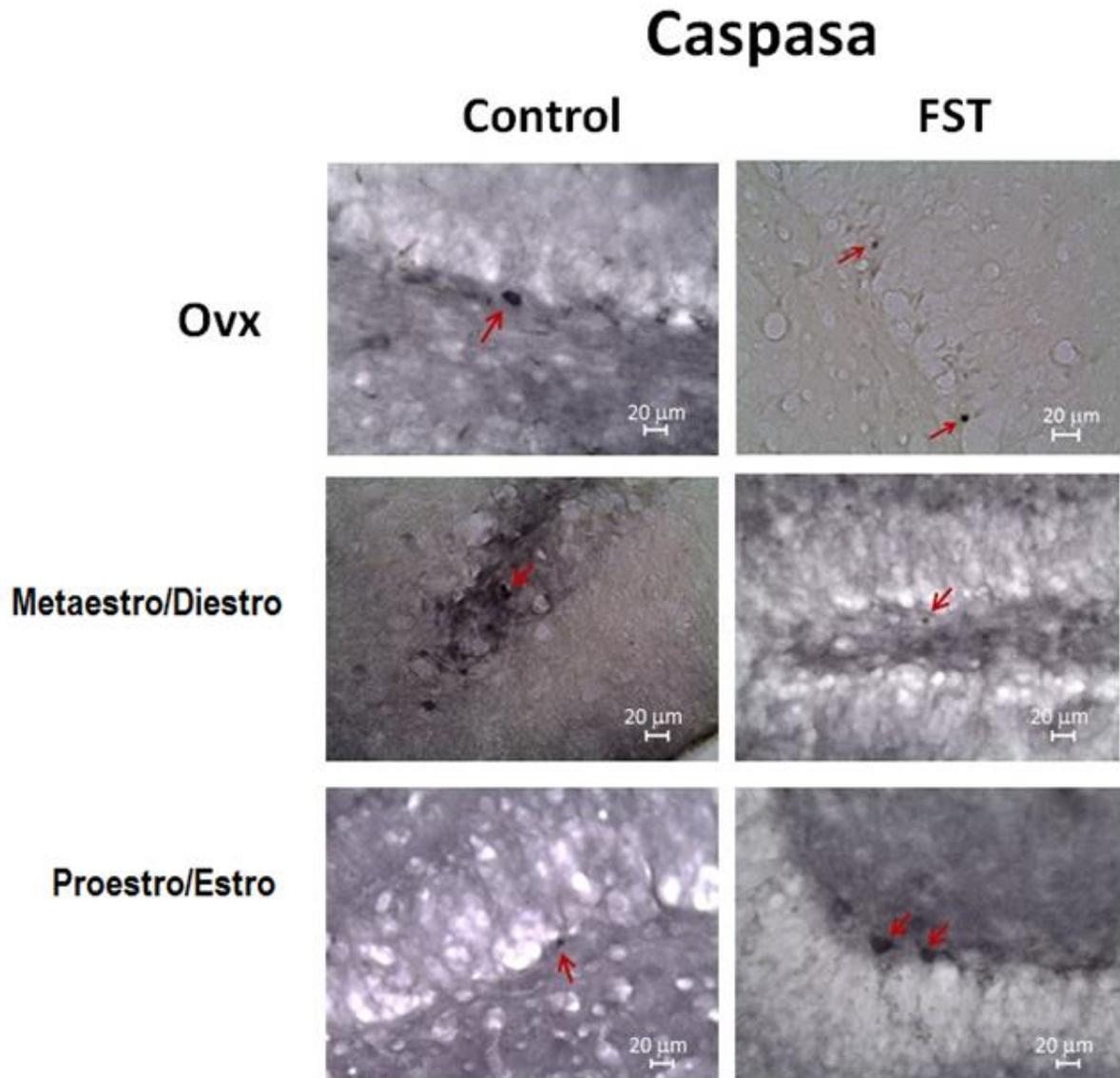


Fig. 10.8 Fotomicrografías representativas de cortes coronales del cerebro de animales en diferentes condiciones endocrinas que fueron sometidos a la prueba de Porsolt, el tejido fue procesado mediante inmuno-histoquímica para caspasa 3 con la finalidad de medir apoptosis. Las flechas muestran las marcas contabilizadas. El área que se evaluó fue la zona zub-granular del GD.

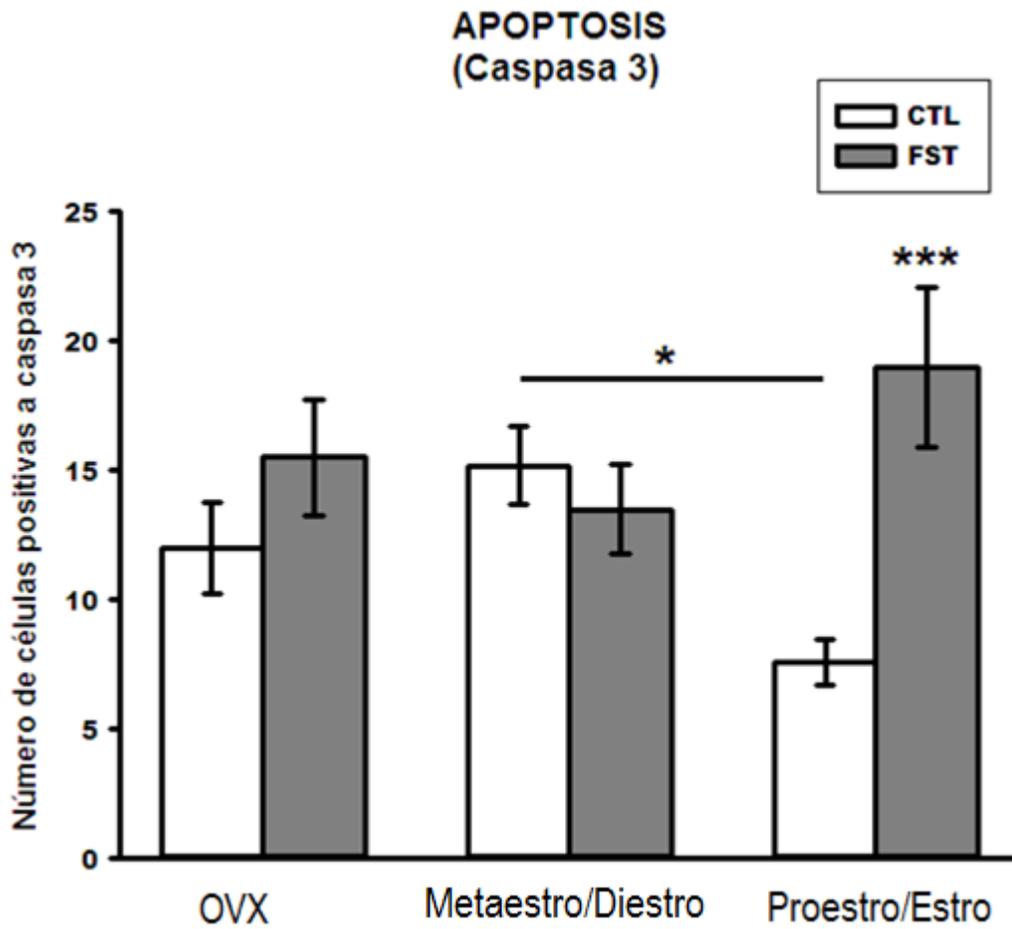


Figura 10.9 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la apoptosis de células de nueva generación en el giro dentado de animales ovariectomizados y sham en metaestro/diestro y hormona alta proestro/estro. (n=4 en ovx, diestro estrés y proestro estrés, n=5 en diestro control y proestro control). Los datos representan la media del número de células inmunorreactivas a caspasa 3 \pm E.S.M *p = ≤ 0.05 y ***p<0.001. Prueba post-hoc Student-Newman-Keuls (NSK).

Capítulo 11. Discusión

11.1 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la conducta de inmovilidad.

El presente trabajo mostró que durante la sesión de pre-prueba no se presentaron diferencias en la conducta de inmovilidad asociadas a la condición endócrina, mientras que en la prueba, los animales con hormona alta mostraron menor inmovilidad, por tal motivo se propone que la exposición a un estresor agudo en presencia de hormonas gonadales, desensibiliza al organismo ante una segunda exposición al mismo estresor (Belda y cols., 2004; Dal-Zotto y cols., 2002), permitiéndole contender mejor ante una situación que se le vuelve a presentar (Mitchell y Meaney 1991; Dal-Zotto y cols., 2002; Bilang-Bleuel y cols., 2005; Chandramohan y cols., 2008; Gutierrez-Mecinas y cols., 2011; Ter Horst y cols., 2013).

En este sentido, se proponen varios mecanismos que tal vez en conjunto son responsables de comportamiento. Uno de ellos es la presencia del metabolito allopregnenolona (ALLO), responsable de activar al receptor GABA-A disminuyendo los niveles de GCs liberados por la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Glándula adrenal (HHA) (Purdy 1991; Barbaccia y cols., 1996, 1998; Kalil y cols., 2013; Frye 2007).

Esta disminución que ejerce la ALLO sobre los GC en el estrés, pareciera no llevarse a cabo del todo, ya que los grupos de animales sham sometidos a FST muestran niveles elevados de corticosterona frente a su control, lo que nos lleva a sugerir que los efectos de la ALLO no son propiamente un freno, si no una regulación del propio organismo que le permite mantener el nivel de corticosterona necesaria para activar receptores citoplasmáticos involucrados en los efectos reportados como beneficios (Frye 2007; Jöels 2009), prueba de esto es que solo ambos grupos sham muestran aumento de corticosterona frente al estrés, pero solo el de animales en proestro/estro aumento en la proliferación celular.

Es así que se propone para el presente trabajo, que una segunda sesión de nado forzado en presencia de hormonas gonadales está implicada en la activación de RMs seguida en menor medida, de la activación de los RGs, (Oitzl y De Kloet, 1992., Lupien y McEwen 1997., Oitzl y cols., 2010; Dirk-Jan y Erno 2014), lo que pareciera ubicar a los organismos con hormona gonadal elevada, en la primer parte de la gráfica y hasta el techo de la U invertida descrita por Jöels respecto a los efectos beneficios del estrés (Jöels 2006; Dirk-Jan y Erno 2014), facilitando así la contención ante el estrés, favoreciendo la neurogénesis (Korz y Frey 2003; Jöels 2006; Ter Horst y cols., 2013; Dirk-Jan y Erno 2014)

Otro mecanismo donde también pudiera estar implicada la regulación de los GCs a partir de la ALLO, involucra ciertas vías de señalización que actúan en favor

de procesos adaptativos, tal pudiera ser el caso de la vía ERK-MAPK mediada por el receptor NMDA (Kelly y cols., 2003; Gutiérrez-Mecinas y cols., 2011), así como la fosforilación de la histona 3 (H3S10p K14ac) en células granulares del GD (Chandramohan y cols., 2008). Ambos mecanismos responsables de la transcripción de genes como c-Fos y ERG-1 capaces de promover cambios conductuales, que de acuerdo con lo reportado por Bilang-Bleuel y cols., en el 2005 y Chandramohan y cols., en el 2008, no se observan en una primera sesión de nado, pero sí en una segunda exposición 24 horas después (Bilang-Bleuel y cols., 2005 y Chandramohan y cols., 2008).

Un tercer mecanismo involucra al estradiol (E2) y su efecto neuroprotector a partir de las proteínas que de él se transcriben, como es el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) cuya activación por receptores TrkB (Huang y Reichardt 2003) estimula las vías de señalización ERK-MAPK relacionada con la conducta y proliferación y PI3K-Akt necesaria para la potenciación a largo plazo (LTP) (Kelly y Lynch 2000; Horwood y cols., 2006; Bekinschtein y cols., 2008; Wu y cols., 2008).

11.2 Efecto de la prueba de Porsolt sobre los niveles de corticosterona.

En el presente trabajo se observa que dos sesiones de nado forzado aumentaron los niveles de corticosterona en animales que poseen sus hormonas

gonadales, no así en aquellos que han sido ovariectomizados. Estos datos coinciden con lo previamente reportado por Seale y cols., en el 2004 y Kalil y cols., en el 2013, donde la ovariectomía (OVX) por sí misma, reduce el nivel basal de corticosterona en roedores, incluso cuando son sometidos a estrés por ruido, aumentando ligeramente ante una inyección de lipopolisacáridos o ante el estrés por restricción, pero sin diferencias significativas respecto a las hembras sham o en proestro, sometidas al mismo estresor (Seale y cols., 2004; Kalil y cols., 2013).

Estos resultados aparentemente contradictorios con lo reportado recientemente por Vega Rivera y cols., en el 2014 donde la sola OVX aumenta los niveles de corticosterona que no regresan a la basal después de un mes post-cirugía (Vega-Rivera y cols., 2014). En realidad, refleja una respuesta pobre del eje a consecuencia de un daño por la supresión brusca ovárica y que dependerá del tiempo post-cirugía.

En cuanto a la diferencia observada en los niveles de corticosterona de los grupos control, este efecto se atribuye a las oscilaciones hormonales propias del ciclo estral sobre los niveles de corticosterona plasmática, donde el proestro se ha relacionado con la fase del ciclo donde estrógenos y corticosterona presentan su mayor concentración (Malendowicz y Mlynarczyk 1982; Atkinson y Waddell 1997).

11.3 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la proliferación de células en el hipocampo adulto.

El presente trabajo propone que dos sesiones de nado incrementan la proliferación de células en el GD sólo en presencia de hormonas gonadales elevadas, situación que no se observa tras una sola exposición al mismo estresor en condiciones hormonales similares (Vega-Rivera y cols. 2014). Esto nos lleva a proponer que la corticosterona liberada tras la primera sesión de nado, activa algún mecanismo que conlleva al incremento de la proliferación y que es evidente hasta la segunda exposición al mismo estresor, efecto posiblemente similar a lo planteado en la respuesta conductual (Bilang-Bleuel y cols., 2005 y Chandramohan y cols., 2008).

Para este efecto se proponen diversos mecanismos, tal vez el más importante es la activación de la vía ERK-MAPK implicada en la proliferación celular. (O'Neill y Kolch 2004; Duman y Voleti 2011). Estudios realizados en ratas han mostrado que tanto receptores NMDA (Chandramohan y cols., 2008; Marsden 2013) como citoplasmáticos para GCs (Chandramohan y cols., 2008) pueden activar dicha vía tras una sesión de nado forzado, manifestándose sus efectos conductuales hasta una segunda exposición al mismo estresor, sin reportes en la proliferación.

Otro mecanismo es la activación de la vía PI3K–Akt, a través de diversas moléculas como el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), el BDNF y las Neurotrofinas 3 (NT-3), 4 (NT-4) y 5 (NT-5) (Huang y Reichardt 2003; Bekinschtein y

cols; 2008; Wu y cols; 2008), todos factores de transcripción que promueven la proliferación y sobrevivencia neuronal.

En este sentido, se ha visto que las neurotrofinas juegan un papel importante en la proliferación, tal es el caso del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (FGF2) y el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), que se ven aumentados en el estrés agudo, así como después de la administración de ACTH (15 U/kg), Corticosterona (10mg/kg) y Dexametasona (0.5mg/kg) (Mocchetti y cols; 1996).

Por otra parte, la activación de receptores membranales para estrógenos (GPR30) también puede estar implicada en la proliferación a través de la activación de canales de Ca²⁺ (Foradori y cols., 2008; Vasudevan y Pfaff, 2008) que activan la vía de proteína quinasa MAPK (Chaban et al, 2011; Kelly y Ronnekleiv, 2012).

Esta propuesta que la corticosterona aumenta la proliferación en el GD del hipocampo de animales con hormonas gonadales elevadas va en línea con lo reportado por Kirby y cols., en el 2013, donde el estrés por restricción o una dosis de 40 mg/kg de corticosterona ocasiona incremento en los niveles de FGF2, así como de células de nueva generación en el GD dorsal de ratas macho gonadalmente intactas, no así cuando se usó una dosis menor de corticosterona 5mg/kg (Kirby y cols., 2013) o la misma por tiempo prolongado como lo reportado por Chetty y cols., en el 2014, donde una inyección diaria de 40 mg/kg de corticosterona por 7 días disminuye la proliferación celular en el GD sin reporte en los niveles de FGF2 (Chetty

y cols 2014). Situación que corrobora el efecto distinto que induce la administración crónica de los GCs o la exposición al estrés frente a dosis o exposiciones agudas.

Lo anterior nos lleva a proponer que la cantidad de corticosterona que se une al receptor dependiendo de la naturaleza del estresor, el número de veces que esto sucede y la presencia de hormonas gonadales y neurotrofinas, son factores determinantes en las vías de señalización que se encienden y por lo tanto en la proliferación hipocampal, y que estos efectos originados desde la primera sesión de estrés muchas veces se manifiestan a partir de la segunda exposición. De tal forma que existan tantos y tan variados reportes en cuanto a los efectos del estrés en la proliferación de células del GD (Galea y cols., 1996, Gould y cols., 1998; Tanapat y cols., 2001; Thomas y cols., 2006, Dągys y cols., 2009; Kirby y cols., 2013; Chetty y cols 2014; Vega-Rivera y cols. 2014).

Al analizar la proliferación de células en el GD de los animales que no fueron estresados, se observa una tendencia inversamente proporcional en los niveles de corticosterona, lo que nos lleva a proponer que la proliferación celular en el GD se comporta de manera diferente ante niveles basales de hormonas adrenales que ante niveles inducidos por el estrés, esto se apoya en la propuesta de que los niveles basales de esteroides suprarrenales son inversamente proporcionales a la tasa de proliferación en el GD hecha por Schlessinger y cols., en 1975 y posteriormente por Sapolsky y Meaney en 1986 (Schlessinger y cols., 1975; Sapolsky y Meaney 1986).

11.4 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la sobrevivencia temprana de células en el hipocampo adulto.

El presente trabajo mostró que dos sesiones de nado originan una disminución en la sobrevivencia temprana respecto a su control, siendo esta disminución significativa solo en animales sham y no en aquellos privados de hormonas gonadales. Este efecto, con tendencia inversa a lo observado en la proliferación, sugiere que gran número de las células que nacen como respuesta a las dos sesiones de nado no llegan a crecer, diferenciarse e integrarse a redes neuronales, situación que posiblemente se deba a que los requerimientos del organismo han cambiado con el cese del estresor o a un proceso compensatorio que busca mantener el equilibrio en el número de células del cerebro, evitando patologías similares a tumores, esto último explicaría porque en animales ovx no se observa una disminución de la sobrevivencia, ya que en tampoco existió un aumento o tendencia al aumento de la proliferación.

En este sentido, se proponen tres mecanismos relacionados con la disminución de la sobrevivencia y que posiblemente actúen de manera simultánea. Dos de ellos asociados a la activación de los receptores membranales para GCs, son el daño al DNA y las modificaciones epigenéticas relacionadas con trastornos psiquiátricos como la depresión (Bagot y cols; 2014). El tercero es el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) originado por el estrés agudo (Valko y cols., 2007) e incluso por la ovx (Yazğan y Nazıroğlu 2016).

Sin embargo, al comparar las diferentes condiciones endocrinas frente al estrés, se observa que la presencia de hormonas gonadales confiere un efecto neuroprotector, efecto también visible entre los grupos control.

Por tal motivo se propone que la presencia de hormonas gonadales y por lo tanto de neurotrofinas y factores de crecimiento, activan las vías de supervivencia PI3-Akt y ERK-MAPK ,donde el receptor GPR30 (Hui Tang y cols., 2014) y las neurotrofinas; BDNF, NGF y Neurotrofinas 3, 4 y 5 son capaces de regular proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, así como las proteínas pro-apoptóticas Bax, Bad, Bak y Bid (Desagher y Martinou 2000; Dimmer y Scorrano 2006; Karbowski y cols; 2006; Vasconsuelos y cols; 2014).

Más aún, existen reportes donde confirman que el BDNF confiere un efecto neuroprotector ante la muerte celular solo en presencia de estrógenos (Vasconsuelo y cols., 2008).

En cuanto a la producción de ROS, se propone que el efecto neuroprotector de los estrógenos es a través del receptor para estrógenos mitocondrial, capaz de afectar la cadena transportadora de electrones (Tuquet y cols., 2000), la morfología mitocondrial (Vic y cols., 1982; Vasconsuelo y cols., 2008) y la expresión de genes mitocondriales (Chen y Yager 2004), así como de genes nucleares implicados en la producción de enzimas antioxidantes (Borrás y cols., 2003).

11.5 Efecto de la prueba de Porsolt sobre la proliferación, sobrevivencia y muerte programada (apoptosis) de células en el hipocampo adulto.

Al analizar el número de células positivas para caspasa 3 se observa que existe un incremento en la muerte programada de células en el GD de animales estresados con hormona alta respecto su control, hecho que pareciera responder al aumento en la proliferación y disminución de la sobrevivencia previamente mencionado. Sin embargo, los alcances del presente trabajo no permiten determinar si el número de células positivas para caspasa 3 corresponde a las células recién formadas o a algunas ya existentes antes del estrés.

Al comparar el número de células positivas para caspasa 3 con aquellas que expresaron Ki67 y BrdU se observa que el número de células que se encuentran en apoptosis está muy por debajo de la diferencia de células en proliferación vs aquellas que sobreviven, por lo que se propone que la corticosterona de las dos sesiones de nado forzado, no indujo apoptosis de manera significativa, pero si el arresto del ciclo celular antes de que se iniciara la fase S y se introdujera el BrdU en el DNA de las células recién formadas. Este dato va en línea con estudios previos hechos en ratas administradas con dexametasona, donde los niveles elevados de glucocorticoides fueron capaces de arrestar la célula en G1-G0 (Johnson y cols., 2006; Goya y cols., 1993).

Lo anterior se apoya en que, ya que sea por daño al DNA, producción de ROS o ausencia de las condiciones adecuadas, la maquinaria de cualquier célula sana está programada para detener el ciclo celular, evaluar los daños, de ser posible repararlos, para finalmente decidir si se continua con el ciclo, se entra en senescencia (G0) o se induce apoptosis (Pietenpol y Stewart 2002; Unal-Cevik y cols; 2004; Dehay y Kennedy 2007, Guyton 2011; Hein y cols; 2014)

Si consideramos que las células progenitoras neuronales (CPN) del cerebro adulto tienen un ciclo celular de 26 horas donde 21 hrs corresponden a la fase G1 (Arai y cols., 2011), al realizar la primer administración de BrdU 14 horas antes de la primer sesión de nado, no se habrá dado una vuelta completa al ciclo celular antes de la primer exposición al estrés, y las células que estén marcadas por BrdU serán aquellas que se encontraban en o próximas a la fase S cuya duración es de 3 horas aproximadamente (Arai y cols., 2011). Si es que la pre-prueba es suficiente para inducir arresto de algunas poblaciones celulares en G1, el BrdU que observamos es el de las células tomaron las primeras 14 horas de las 38.5 horas que transcurren entre la primer administración de BrdU y el sacrificio.

Es así que se propone para el presente trabajo, que dos exposiciones al mismo estresor agudo aumentan la proliferación de células en el GD con respuesta conductual favorable en la segunda sesión y que dichas células son arrestadas en G1, formando parte de un pool neurogénico no diferenciado que probablemente está en espera de las condiciones adecuadas para integrarse nuevamente al ciclo celular.

11.6 Efecto de la prueba de Porsolt sobre el fenotipo de las células que sobreviven en CA3.

Al realizar la cuantificación de células positivas para caspasa 3 en la región de CA3 se observa que no existe expresión del marcador en ninguno de los grupos experimentales, por lo que se propone que el aumento en la concentración de GCs tras dos sesiones de nado, no afecta esta región del hipocampo, probablemente porque solo las áreas de GD y CA1 cuentan con receptores para mineralocorticoides (RM) y glucocorticoides (RG) (Jöels 2006).

Motivo por el que se propone al fenotipo de las células maduras en CA3 de los animales sometidos a estrés, similar al de los grupos control, ya que no existe muerte en esta región del hipocampo a consecuencia del aumento en los niveles de corticosterona.

Capítulo 12. Conclusión

La exposición a una sesión de nado forzado es suficiente para originar modificaciones en el organismo que solo se observan tras una segunda exposición al estresor.

Para que estas modificaciones sean favorables, es necesario que los organismos cuenten con los recursos necesarios, en este sentido, la presencia de hormonas gonadales, estrógenos y progestágenos son factores que permiten al organismo contender con el estresor, estimulando la proliferación de células de nueva generación en el GD y confiriendo neuroprotección ante el daño celular que pueda ocasionar el estrés.

Lo anterior se confirma al observar que la OVX por sí misma es capaz de bloquear la funcionalidad del eje adrenal, impidiendo su retroalimentación, situación que se observa al no existir una respuesta de los animales OVX ante el estrés. Sin diferencias significativas entre los grupos OVX/estrés vs OVX/control en corticosterona, proliferación, sobrevivencia y apoptosis.

Perspectivas

Se proponen la presencia del metabolito ALLO como responsable de la activación de los RMs y en menor medida de los RGs como responsables del efecto

benéfico del estrés, en donde vías como ERK-MAPK y 3IP-Akt pueden ser responsables del comportamiento que presentan los roedores ante una segunda exposición al agente estresor, beneficiando la proliferación de células en el GD y confiriendo un efecto neuroprotector ante la apoptosis.

Capítulo 13. Bibliografía

1. Abelaira H.M., Réus G. Z., Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2013;35:S112–S120.
2. Aimone JB, Deng W, Gage FH. Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends Cogn Sci* 2010;14:325-337.
3. Ahmed T, Frey JU, Korz V Long-term effects of brief acute stress on cellular signaling and hippocampal LTP. *J Neurosci* 2006; 26: 3951–3958.
4. Alani B., Maghsoudi N., Khatibi A., Nouredini M., Asefifar F., Shams J. Study of the variations in apoptotic factors in hippocampus of male rats with posttraumatic stress disorder. *Advanced biomedical research*. 2013; 2:42.
5. Álvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neuroscience* 2002;22:629–634.
6. Álvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neuroscience* 2001 Apr; 2(4):287-93.
7. Álvarez-Buylla A, Seri B, and Doetsch F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* 2002;57:751–758.
8. Álvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 1994;264:1145-81.
9. Álvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2074-7.
10. Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B. Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res* 1990;83:1-11.
11. Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM. The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment?. *Psychoneuroendocrinology* 2011;36:415-25.
12. Arai Y., Pulvers JN., Haffner C., Schilling B., Nüsslein I., Calegari F, y Huttnera WB. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* 2011; 2: 154."
13. Atkinson HC, Waddell BJ. Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology*. 1997 Sep;138(9):3842-8. PMID:9275073
14. Bain MJ, Dwyer SM, Rusak B. Restraint stress affects hippocampal cell proliferation differently in rats and mice. *Neuroscience Letters* 2004;368:7–10.
15. Barbaccia ML, Roscetti G, Bolacchi F, Concas A, Mostallino MC, Purdy RH, Biggio G. Stress-induced increase in brain neuroactive steroids: antagonism by abecarnil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1996; 54(1):205-210.
16. Bean LA., Janov L., Foster TC. Estrogen Receptors, the Hippocampus, and Memory. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2014.
17. Becker J, Monteggia L, Perrot-Sinal T, Romeo R, Taylor J, Yehuda R, et al. Stress and disease: Is being female a predisposing factor? *J Neurosci* 2007;27:11851.
18. Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH. 2008. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2711–2716.

19. Bekris S., Antoniou K., Daskas S. and Papadopoulou-Daifoti Z., Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. 2005 *Behav Brain Res.* 161: 45-59.
20. Belda X, Márquez C, Armario A. Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: comparison of two outbred rat strains. *Behav Brain Res.* 2004 Oct 5;154(2):399-408.
21. Bello M., Puentes-Rosas E., Medina-Mora ME., Lozano R., 2005 [Prevalence and diagnosis of depression in Mexico]. *Salud Publica Mex.* 47: S4-11.
22. "Belzung C., Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biology of Mood & Anxiety Disorders* 2011, 1:9. "
24. Benjet C, Borges G, Medina-Mora ME, Fleiz-Bautista C, Zambrano-Ruiz J. La depresión con inicio temprano: prevalencia, curso natural y latencia para buscar tratamiento. *Salud Pública Méx* 2004;46 (5):417-424.
25. Berlanga C, Flores-Ramos M. Different gender response to serotonergic and noradrenergic antidepressants. A comparative study of the efficacy of citalopram and reboxetine. *J Affect Disord* 2006;95:119–23.
26. Bielajew C., Konkle A., Kentner A., Baker S., Stewart A., Hutchins A. Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. *Stress* 2003;6:269–80.
27. Bijur GN, De Sarno P, Jope RS Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem.* 2000 Mar 17;275(11):7583-90
28. Bilang-Bleuel A, Ulbricht S, Chandramohan Y, De Carli S, Droste SK, Reul JMHM. Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response. *Eur J Neurosci* 2005; 22:1691–70010.1111/j.1460-9568.2005.04358.x
29. Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med* 2007; 25: 139-53.
30. Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* 2003;5:546–52.
31. Borsoi M., Boque-Antonio C., Fialho-Viana A., Nardin P., Gonçalves CA., Kuze-Rates SM. Immobility behavior during the forced swim test correlates with BDNF levels in the frontal cortex, but not with cognitive impairments. *Physiology & Behavior* 2015;140:79–88.
32. Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, et al. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2003;24:603–613.
33. Bredemann y McMahon. 17b Estradiol increases resilience and improves hippocampal synaptic function in helpless ovariectomized rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2014(42): 77—88
34. Brian RC, Cameron HA. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Hippocampus* 2006;16:199–207.
35. Brot MD, Akwa Y, Purdy RH, Koob GF, Britton KT. The anxiolytic-like effects of the neurosteroid allopregnanolone: interactions with GABA(A) receptors *Eur J Pharmacol.* 1997 Apr 23;325(1):1-7.

36. Brown GR., Spencer KA. Steroid hormones, stress and the adolescent brain: a comparative perspective. *Neuroscience*. 2013;249:115-28. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.016.
37. Calil CM., Marcondes FK. The comparison of immobility time in experimental rat swimming models. *Life Sciences* 2006;79:1712–1719.
38. Cameron HA, Gould E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 1994;61(2):203-209.
39. Cameron HA, McEwen BS, Gould E. Regulation of Adult Neurogenesis by Excitatory Input and NMDA Receptor Activation in the Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience* 1995;75(6):4687-4692.
40. Cammarota M, Bevilaqua LRM, Ardenghi P, Paratcha G, de Stein ML, Izquierdo I, et al. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res* (2000) 76:36–46
41. Canevari L, Richter-Levin G, Bliss TV. LTP in the dentate gyrus is associated with a persistent NMDA receptor-dependent enhancement of synaptosomal glutamate release. *Brain Res*. 1994; 667:115–710.1016/0006-8993(94)91720-5
42. Caraveo-Arduaga J., Colmenares E. and Saldívar G., 1999. Estudio clínicoepidemiológico de los trastornos depresivos. *Salud Mental*. 22: 7-17.
43. Caspi A., Sugden K., Moffitt TE, Taylor A., Craig IW., Harrington H., McClay J., Mill J., Martin J., Braithwaite A., Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science (New York, NY)*. 2003;301 (5631):386-389.
44. Chandramohan Y, Droste SK, Arthur JS, Reul JM. The forced swimming induced behavioral immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl- D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *Eur J Neurosci* 2008; 27:2701–2713.
45. Chen JQ, Yager JD. Estrogen's effects on mitochondrial gene expression: mechanisms and potential contributions to estrogen carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2004;1028:258–72. mechanisms and potential contributions to estrogen carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2004;1028:258–72.
46. Chetty S, Friedman AR, Taravosh-Lahn K, Kirby ED, Mirescu C, Guo F, Krupik D, Nicholas A, Geraghty AC, Krishnamurthy A, Tsai MK, Covarrubias D, Wong AT, Francis DD, Sapolsky RM, Palmer TD, Pleasure D, Kaufer D. Stress and glucocorticoids promote oligodendrogenesis in the adult hippocampus. *Mol Psychiatry*. 2014 Dec;19(12):1275-83. doi: 10.1038/mp.2013.190. PMID:24514565
47. Chiara R, Verdon T. Neural Stem Cell of the Hippocampus: Development, Physiology Regulation, and Dysfunction in Disease. *Current Topics in Developmental Biology*, Volume 107 # 2014 Elsevier Inc. ISSN 0070-2153 (<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416022-4.00007-X>)
48. Choi DC, Maguschak KA, Ye K, Jang SW, Myers KM, Ressler KJ. 2010. Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:2675–2680.
49. Christie BR., Cameron HA. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* 2006;16 (3):199-207.
50. Dagtý G., Van der Zee EA., Postema F., Luiten PG., Den Boer JA., Trentani A., Meerlo P. Chronic but not acute footshock stress leads to temporary suppression of cell proliferation in rat hippocampus. *Neuroscience* 2009 (162):904-913.

51. Dalla C., Antoniou K., Drossopoulou G., Xagoraris M., Kokras N., Sfikakis A., Papadopoulou-Daifoti Z. Chronic mild stress impact: are females more vulnerable?. *Neuroscience* 135 (2005) 703–714.
52. Dal-Zotto S, Martí O, Armario A. Is repeated exposure to immobilization needed to induce adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? Influence of adrenal factors. *Behav Brain Res* 2002;129, 187–195.
53. Datson NA, van den Oever JME, Korobko OB, Magarinos AM, De Kloet ER, McEwen BS. Previous History of Chronic Stress Changes the Transcriptional Response to Glucocorticoid Challenge in the Dentate Gyrus Region of the Male Rat Hippocampus. *Endocrinology* 2013;154 (9):3261-3272.
54. De Almagro MC, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol*.2012 Oct;34(3):200-11
55. De Kloet E. Stress: a neurobiological perspective. *Tijdschriftvoorpsychiatrie*. 2009;58 (8):541-50.
56. De Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 1999;22,422–426.
57. De Quervain DJ, Aerni A, Roozendaal B. Preventive effect of beta-adrenoceptor blockade on glucocorticoid-induced memory retrieval deficits. *American Journal Psychiatry* 2007;(164):967–969.
58. Dedovic K., Duchesne A., Andrews J., Engert V., Pruessner J. The brain and the stress axis: The neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *Neuroimage* 2009 Sep;47 (3):864-71.
59. Dehay C., Kennedy H. Cell-cycle control and cortical development. *Nature* 2007; 8: 438-450 doi:10.1038/nrn2097
60. Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 2010;11(5):339-350.
61. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000;1:369–77.
62. Diamond DM, Fleshner M, Rose GM. Psychological stress repeatedly blocks hippocampal primed burst potentiation in behaving rats, *Behav. Brain Res.*, 62 (1994) 1-9.
63. Diamond DM, Bennett MC, Fleshner M, Rose GM. Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus*. 1992; 2(4):421-30.
64. Dickerson SS., Kemeny ME .Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol Bull*. 2004 May;130(3):355-91.
65. Dimer KS, Scorrano L. (De) constructing mitochondria: what for? *Physiology* 2006; 21:233–41
66. Doetsch F, Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14895–14900.
67. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 1997;17:5046–5061.
68. Dranovsky A, Picchini AM, Moadel T, Sisti AC, Yamada A, Kimura S, et al. Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus. *Neuron* 2011;70:908–23.

70. Drossopoulou G., Atoniou K., Kitraki E., Papathanasiou G., Papalexi E. Dalla Papadopoulou-Daifoti. Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. *Neuroscience* 2004 (126) 849–857.
71. Du X, Pang TY, Mo C, Renoir T, Wright DJ, Hannan AJ. The influence of the HPG axis on stress response and depressive-like behaviour in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Exp Neurol.* 2015 Jan;263:63-71. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.09.009. Epub 2014 Sep 20.
72. Dubrovsky, B.O., Liquomik, M.S., Noble, P. and Gijsbers, K., Effects of 5alpha-dihydrocorticosterone on evoked responses and long-term potentiation, *Brain Res. Bull*, 19 (1987) 635-638.
73. Dulawa, S. C, Hen R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: The novelty-induced hypophagia test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2005;29 (4-5):771-783.
74. Duman RS. Neural plasticity: consequences of stress and actions of antidepressant treatment. *Dialogues Clin Neurosci* 2004 Jun; 6 (2):157–169.
75. Duman RS., Voleti B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends in Neurosciences.* 2012; 35 (1): 47-56. doi:10.1016/j.tins.2011.11.004
76. Dunn JD, Orr SE. Differential Plasma Corticosterone Responses to Hippocampal Stimulation. *Exp Brain Res* 1984;54:1-6.
77. Duval F, Mokrani M, Monreal-Ortiz J, Fattah S, Champeval C, Schulz P, et al. Cortisol hypersecretion in unipolar major depression with melancholic and psychotic features: Dopaminergic, noradrenergic and thyroid correlates. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:876-88.
78. Duval MD, González MD, Rabia MD. Neurobiology of stress. *Rev Chil Neuro Psiquiatría* 2010; 48(4):307-318.
79. Encinas J, Sierra A, Valcárcel-Martín R, Martín-Suárez S. A developmental perspective on adult hippocampal neurogenesis. *Int J Dev Neurosci* 2013;31:640–645.
80. Estrada Camarena E, Fernández Guasti A, López Rubalcava C. Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;173:139–45.
81. Estrada Camarena E., Fernandez Guasti A, López Rubalcava C. Antidepressant-Like Effect of Different Estrogenic Compounds in the Forced Swimming Test. *Neuropsychopharmacology* 2003;28,830–838.
82. Estrada-Camarena E, López-Rubalcava C, Hernández-Aragón A, Mejía-Mauries S, Picazo O. Long-term ovariectomy modulates the antidepressant-like action of estrogens, but not of antidepressants. *J Psychopharmacol.* 2011 Oct;25(10):1365-77. doi: 10.1177/0269881111408456. Epub 2011 Sep 2.
83. Estrada-Camarena E, Fernández-Guasti A, López-Rubalcava C. Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology.* 2003 May; 28(5):830-838. doi:10.1038/sj.npp.1300097
84. Estrada-Camarena E, Fernández-Guasti A, López-Rubalcava C. Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2004 Apr;173(1-2):139-45. Epub 2004 Jan 17.

85. Evans SJ, Murray TF, Moore FL. Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000 Apr;72(5):209-21.
86. Falconer y Galea 2003
87. Feng C, Fang M, Liu XY. The neurobiological pathogenesis of poststroke depression. *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 521349, 8 pages, 2014. doi:10.1155/2014/521349
88. Filipini, D., Gijsbers, K., Birmingham, M.K. and Dubrovsky, B., Effects of adrenal steroids and their reduced metabolites on hippocampal long-term potentiation, *J. Steroid Biochem. molec. Biol.*, 40 (1991) 87-92.
89. Frye CA. Progestins influence motivation, reward, conditioning, stress, and/or response to drugs of abuse. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007 Feb; 86(2):209-19.
90. Fuchs E, Uno H, Flugge G. Chronic psychosocial stress induces morphological alterations in hippocampal pyramidal neurons of the tree shrew. *Brain Res* 1995;673:275–282.
91. Gadek-Michalska A, Spyrka J, Rachwalska P, Tadeusz J, Bugajski J. Influence of chronic stress on brain corticosteroid receptors and HPA axis activity. *Pharmacological Reports* 2013;65:1163-1175.
92. Galea LA, Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents *Braian Reserch reviews* 2008; 57: 332-341
93. Galea LA, Leuner B., Slattery D. A. Hippocampal Plasticity during the Peripartum Period: Influence of Sex Steroids, Stress and Ageing *Journal of Neuroendocrinology*, 2014, 26, 641–648
94. Galea LA, McEwen BS, Tanapat P, Deak T, Spencer RL, Dhabhar FS. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience* 1997; 81(3):689-97.
95. Galea LA., Spritzer M., Barker JM., Pawluski JL. Gonadal Hormone Modulation of Hippocampal Neurogenesis in the Adult. *Hippocampus* 2006;16:225–232.
96. Galea LA, Wainwright SR, Roes MM, Duarte-Guterman P, Chow C, Hamson DK. Sex, hormones and neurogenesis in the hippocampus: hormonal Modulation of Neurogenesis and Potential Functional Implications. *Journal of Neuroendocrinology* 2013;25:1039-61.
97. Galea 1996 estrés agudo
98. Garcia-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* 1998;36:234–248.
99. Ge S, Sailor KA, Ming GL, Song H. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Parasitol* 2011;586:3759–65.
100. Gillies G, McArthur S. Estrogen Actions in the Brain and the Basis for Differential Action in Men and Women: A Case for Sex-Specific Medicines. *PharmacolRev* 2010;62:155–198.
101. Gould E., McEwen BS., Tanapat P., Galea LA., Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience* 1997;17 (7):2492-8.
102. Gould E., Tanapa P., Cameron HA. Adrenal steroids suppress granule cell death in the developing dentate gyrus through an NMDA receptor-dependent mechanism *Developmental Brain Research.* 1997 (103): 91–93

103. Gould E., Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 1999 (46):1472-1479.
104. Gould E., Tanapat P., Mc Ewen B., Flügge G., Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Neurobiology* 1998 (95) 3168–3171
105. Goya L, Maiyar AC, Ge Y, Firestone GL. Glucocorticoids induce a G1/G0 cell cycle arrest of Con8 rat mammary tumor cells that is synchronously reversed by steroid withdrawal or addition of transforming growth factor-alpha. *Mol Endocrinol* 1993, 7:1121-1132
106. Gunnar M, Quevedo K. The Neurobiology of Stress and Development. *Ann Rev Psychol* 2007;58:145–73.
107. Gutierrez-Mecinas M, Trollope AF, Collins A, Morfett H, Hesketh SA, Kersante F, et al. Long-lasting behavioral responses to stress involve a direct interaction of glucocorticoid receptors with ERK1/2-MSK1-Elk-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:13806–1110.1073/pnas.1104383108
108. Gutierrez-Mecinas M, Trollope AF, Collins A, Morfett H, Hesketh SA, Kersante F. Long-lasting behavioral responses to stress involve a direct interaction of glucocorticoid receptors with ERK1/2-MSK1-Elk-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:13806–1110.1073/pnas.1104383108
109. Han BH, Holtzman DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci*. 2000 Aug 1;20(15):5775-81.
110. Handa RJ, Weiser MJ. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2014;(35)197–220.
111. Heale VR, Vanderwolf CH, and Kavaliers M. Components of weasel and fox odors elicit fast wave bursts in the dentate gyrus of rats. *Behav Brain Res* 1994; 63: 159–165.
112. Hein AL, Ouellette MM, Yan Y. Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (Review). *International Journal of Oncology* 2014; 45: 1813-1819 doi: 10.3892/ijo.2014.2614
113. Heine VM, Maslam S, Zareno J, Joëls M, Lucassen PJ. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur J Neuroscience* 2004;19(1):131-44.
114. Hendrick V., Altshuler LL., Suri R. Hormonal Changes in the Postpartum and Implications for Postpartum Depression. *Psychosomatics* 1998;39:93–101.
115. Herrera-Pérez JJ., Martínez-Mota L., Fernández-Guasti A. Aging increases the susceptibility to develop anhedonia in male rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2008;32:1798–803.
116. Heslen W, Joels M. Modulation of 5HT1A responsiveness in CA1 pyramidal neurons by in vivo activation of corticosteroid receptors. *J Neuroendocrinol* 1996;8 (6):433–438.
117. Hetman M., Kanning K., Cavanaugh JE., Xia Z. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1999 Aug 6;274(32):22569-80.
118. Homberg JR, Molteni R, Calabrese F, Riva MA. The serotonin–BDNF duo: Developmental implications for the vulnerability to psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2014;43:35–47.

119. Horwood JM., Dufour F., Laroche S., Davis S. 2006. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci* 23:3375–3384.
120. Hua-Cheng Y., Xiong CAO., Manas D., Xin-Hong Z., Tian-Ming G. Behavioral animal models of depression. *Neuroscience Bull* 2010.26(4):327-337.
121. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72:609–642.
122. Hui Tang, Quanguang Zhang, Licai Yang, Yan Dong, Mohammad Khan, Fang Yang, Darrell W. Brann, and Ruimin Wang. GPR30 Mediates Estrogen Rapid Signaling and Neuroprotection *Mol Cell Endocrinol.* 2014 April 25; 387(0): 52–58. doi:10.1016/j.mce.2014.01.024.
123. Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 1990 May 22; 295(4):580-623.
124. Jayatissa MN, Henningsen K, West MJ, Wiborg O. Decreased cell proliferation in the dentate gyrus doesnot associate with development of anhedonic-like symptoms in rats. *Brain research* 2009;1290:133–141.
125. Joëls M, Karst H, Alfarez D, Heine V, Qin Y, Van Riel E, Verkuyl M, Lucassen P, Krugers H. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress* 2004;7(4):221-31
126. Joëls M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ. Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol* 2007;28:72–96.
127. Joëls M, Kloet E. Effects of glucocorticoids and norepinephrine on the excitability in the hippocampus. *Science* 1989; 245.
128. Joëls M. Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends in Pharmacological Sciences* 2006;27(5):244-250 .
129. Johnson CS, Muindi JR, Hershberger PA, Trump DL. The antitumor efficacy of calcitriol: preclinical studies. *Anticancer Res.*2006; 26:2543-2549.
130. Joseph-Bravo J, De Gortari P. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biotecnología* 2007;(14)CS365:76
131. Kajantie E., Phillips DI. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2006 Feb;31(2):151-78.
132. Kalil B., Leite CM., Carvalho-Lima M., Anselmo-Franci JA. Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. *Stress,* 2013; 16(4): 452–460
133. Karatsoreos IN., McEwen BS. Resilience and vulnerability: a neurobiological perspective. *F1000Prime Reports* 2013;5:13.
134. Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY, Youle RJ. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 2006;443:658–62.
135. Karst, H. et al. Corticosteroid actions in hippocampus require DNA binding of glucocorticoid receptor homodimers. *Nat. Neurosci* 2000; 3:977–978.
136. Kassi E, et al. *Stress. Endocrine Physiology and Pathophysiology.* Endotext, South Dartmouth (MA) 2012.
137. Kataria S, Varshney M. K, Kumar P. Dhar P, MehraRaj D. Role of estrogen in regulation of morphology and synaptic connectivity in female rat subiculum Department of Anatomy, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi. *J. Anat. Soc. India* 2010; 59(2) 144-149

138. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Alonso OF, Aldana P, Dietrich W. Apoptotic and Antiapoptotic Mechanisms After Traumatic Brain Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2001;21:1189–1198.
139. Kelemen E., Bahrendt M., Born J., Inostroza M. Hippocampal corticosterone impairs memory consolidation during sleep but improves consolidation in the wake state. *Hippocampus*. 2014;24 (5):510-5.
140. Kelly A., Lynch MA. 2000. Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Neuropharmacology* 39:643–651.
141. Kempermann G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci* 2008;31:163–9.
142. Kenneth Maiese, Zhao Zhong Chong, Shaohui Wang, Yan Chen Shang Oxidant Stress and Signal Transduction in the Nervous System with the PI 3-K, Akt, and mTOR Cascade *Int J Mol Sci*. 2012; 13(11): 13830–13866. doi: 10.3390/ijms131113830
143. Kerr DS, Campbell LW, Thibault O, Landfield PW. Hippocampal glucocorticoid receptor activation enhances voltage-dependent Ca²⁺ conductances: relevance to brain aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89(18):8527-8531.
144. Kirby ED., Muroy SE., Sun WG., Covarrubias D., Leong MJ., Barchas LA., Kaufer D. Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2. *eLife* 2013; 2:e00362.
145. Kirby LG., Chou-Green JM., Davis K, Lucki I. The effects of different stressors on extracellular 5 hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid *Brain Research* 1997; 760 (1-2):218-230.
146. Kirschbaum C, Kudielka B, Gaab J, Schommer N, Hellhammer D. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychosom Med* 1999;61:154-62.
147. Kleen JK., Sitomer MT., Killeen PR., Conrad CD. Chronic Stress Impairs Spatial Memory and Motivation for Reward Without Disrupting Motor Ability and Motivation to Explore. *Behavioral neuroscience* 2006; 120(4):842-851.
148. Konkle A. , Baker S., Kentner A., Barbagallo L., Merali Z., Bielajew C. Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: sex and strain compared. *Brain Res* 2003; 992 (2): 227-38.
149. Korosi A, Naninck EFG, Oomen CA, Schouten M, Krugers H, Fitzsimons C, Lucassen PJ. Early-life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior. *Brain Research* 2012;227:400–409.
150. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997;278:294–298.
151. Krugers HJ, Lucassen PJ, Karst H, Joëls M. Chronic Stress Effects on Hippocampal Structure and Synaptic Function: Relevance for Depression and Normalization by Anti-Glucocorticoid Treatment. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2010; 2:24.
152. "Kudielka BM., Kirschbaum C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol*. 2005;69(1):113-32.
153. Kumar A. Long-Term Potentiation at CA3–CA1 Hippocampal Synapses with Special Emphasis on Aging, Disease, and Stress. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2011; 3(7):1-20.

154. Lanshakov DA, Bulygina VV, Romanova IV, Dygalo NN. Immunohistochemical Analysis of Active Caspase-3 Expression in Structures of Neonatal Brain. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2009 May; 147(5):567-570.
155. Lee HJ., Ban JY., Cho SO., Seong YH. *Pharmacol Res* 2005;51(3):261–268.
156. Lee MM., Reif A., Schmitt AG. Major depression: a role for hippocampal neurogenesis? *Curr Top Behav Neurosci* 2013;14:153-79.
157. Lee SY, Lee SJ, Han C, Patkar AA, Masand PS, Pae CU. Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013 Oct 1;46:224-35. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.09.008. Epub 2012 Sep 26.
158. Lenington JB, Yang Z, Conover JC. Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003 Nov; 13:1:99.
159. Leonard BE. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. *Eur Psychiatry*. 2005 Oct; 20 Suppl 3:S302-6.
160. Liberzon I, Krstov M, Young EA. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology* 1997 Aug;22(6):443-53.
161. Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *NatRevNeurosci* 2006;7:179–93.
162. Lupien S J, McEwen BS. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Reviews* 1997; 24 1-27.
163. Madhavan L, Freed WJ, Anantharam V, Kanthasamy AG. 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation protects against N-methyl-D-aspartate-induced apoptotic cell death in striatal and mesencephalic cultures. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Mar;304(3):913-23.
164. Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, Brene S, Hibbeln J, et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis* 2009; 24: 27–53.
165. Magavi SS, Macklis JD. Induction of neuronal type-specific neurogenesis in the cerebral cortex of adult mice: manipulation of neural precursors in situ. *Brain Res Dev Brain Res* 2002 Mar;31:134(1-2):57-76.
166. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.
167. Malendowicz LK, Mlynarczyk W. Sex differences in adrenocortical structure and function. X. Lipid and corticosterone in the rat adrenal as affected by gonadectomy and testosterone or estradiol replacement. *Endokrinologie* 1982; 79: 292–300.
168. Marques-Fernandez F, Planells-Ferrer L, Gozzelino R, Galenkamp K MO, Reix S, Llecha-Cano N, Lopez-Soriano J, Yuste V J, Moubarak R S, TNF α induces survival through the FLIP-L-dependent activation of the MAPK/ERK pathway *J X Comella Cell Death Dis*. 2013 Feb; 4(2): e493. Published online 2013 Feb 14. doi: 10.1038/cddis.2013.25
169. Martínez Mota L, Fernández Guasti A. Testosterone dependent antidepressantlike effect of noradrenergic but not of serotonergic drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;78:711–8.
170. Martínez Mota L, Herrera Pérez JJ, Olivares Nazario M, Fernández Guasti A. Participación de las hormonas gonadales en el efecto de los fármacos antidepressivos en la rata macho. *SCielo Salud Mental* 2012;35:359-366.
171. Martínez Mota L., Ulloa RE., Herrera Pérez J., Chavira R., Fernández Guasti A. Sex and age differences in the impact of the forced swimming test on the levels of steroid hormones. *Physiology & Behavior* 2011; 104:900–905.

172. Mason BL, Pariante CM. The effects of antidepressants on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Drug News Perspect* 2006 Dec; 19(10):603-8.
173. Mauler F, Fahrig T, Horvath E, Jork R. *Brain Res* 2001;888(1):150–157
174. Mc Laughlin KJ, Gomez JL, Baran SE, Conrad CD. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Res* 2007 Aug 3;1161:56-64.
175. McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:105-22.
176. McEwen BS. Stress and the aging hippocampus. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20(1):49-70.
177. McHugh TJ, Jones MW, Quinn JJ, Balthasar N, Coppari R, Elmquist JK, et al. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* (2007)317:94 910.1126/science.1140263
178. mechanisms and potential contributions to estrogen carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2004;1028:258–72.
179. "Mebratu Y. and Tesfaigzi Y. How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer? *Cell Cycle*. 2009; 8(8): 1168–1175..
180. Méndez Cuesta L, Estrada Camarena E, Babu H. Los fármacos antidepresivos como reguladores de la neurogénesis hipocámpica de roedores y humanos adultos. *Salud Mental* 2011;34:497-506.
181. Mirescu C., Gould E. Stress and Adult Neurogenesis *HIPPOCAMPUS* 2006; 16:233–238.
182. Mitchell JB, Meaney MJ. Effects of corticosterone on response consolidation and retrieval in the forced swim test. *Behav Neurosci* (1991) 105:798–80310.1037/0735-7044.105.6.798
183. Mocchetti I, Spiga G, Hayes VY, Isackson PJ, Colangelo A. Glucocorticoids differentially increase nerve growth factor and basic fibroblast growth factor expression in the rat brain. *J Neurosci*. 1996 Mar 15;16(6):2141-8.
184. Molteni R, Fumagalli F, Magnaghi V, Roceri M, Gennarelli M, Racagni G, Melcangi RC, Riva MA. Modulation of fibroblast growth factor-2 by stress and corticosteroids: from developmental events to adult brain plasticity. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001 Nov;37(1-3):249-58.
185. Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez, Ma S, et al. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2005;29:1214—1224.
186. Morrison SJ, White PM, Zock Ch, Anderson D. Prospective Identification, Isolation by Flow Cytometry, and In Vivo Self-Renewal of Multipotent Mammalian Neural Crest Stem Cell. *Cell* 1999;96:737–749.
187. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 1994; 13: 1071-82
188. Morshead CM, Van der Kooy D. Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci* 1992; 12: 249-56.
189. Mou L, Heldt SA, Ressler KJ. Rapid brain-derived neurotrophic factor-dependent sequestration of amygdala and hippocampal GABA(A) receptors via different tyrosine receptor kinase B-mediated phosphorylation pathways. *Neuroscience* 2004;176:72–85.
190. Murphy LO. and Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time *TRENDS in Biochemical Sciences* 2006; 31(5):270-275

191. Nicola Z, Fabel K and Kempermann G (2015) Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Front. Neuroanat.* 9:53. doi: 10.3389/fnana.2015.00053
192. Oitzl MS, de Kloet ER. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav Neurosci.* 1992 Feb;106(1):62-71.
193. Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010 May; 34(6):853-66.
194. O'Neill E, Kolch W. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer.* 2004 Jan 26;90(2):283-8.
195. Ormerod y cols., 2003
196. Paez-Martinez N, Flores-Serrano Z, Ortiz-Lopez L, Ramirez-Rodriguez G. Environmental enrichment increases doublecortin-associated new neurons and decreases neuronal death without modifying anxiety-like behavior in mice chronically exposed to toluene. *Behavioural Brain Research* 2013;256:432– 440.
197. Pakulski C. Neuroprotective properties of sex hormones. *Anestezjol Intens Ter* 2011 Apr-Jun;43(2):113-8.
198. Park HJ, Lee S, Jung JW, Kim BC, Ryu JH, Kim DH. Glucocorticoid and long term stress induced aberrant synaptic plasticity are mediated by activation of the glucocorticoid receptor. *Arch Pharm Res.* 2015 Jun; 38(6):1204-12.
199. Pasko Rakic. Adult Neurogenesis in Mammals: An Identity Crisis. *The Journal of Neuroscience* February 1, 2002;22(3):614–618.
200. Pasqualini CD. Stress y resiliencia. Hans selye y el encuentro de las dos culturas. *Medicina (Buenos Aires)* 2013; 73: 504-505.
201. Pasqualini CD. Stress y resiliencia Hans Selye y el encuentro de las dos culturas *MEDICINA (Buenos Aires)* 2013; 73: 504-505
202. Pavlides C., Watanabe Y., McEwen BS., Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation, *Hippocampus*, 3 (1993) 183-192.
203. Pawluski JL., Brummelte S., Barha CK., Crozier T.M., Galea LA. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging Jodi L. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2009; 30: 343–357
204. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 2002; 181-182:475-481
205. Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, Posmantur RM, Wang KK, RL. Regional calpain and caspase-3 proteolysis of alpha-spectrin after traumatic brain injury. *Neuroreport* 1998;9:2437–2442.
206. Pirttimaki TM., Parri RH. Astrocyte Plasticity: Implications for Synaptic and Neuronal Activity. *Neuroscientist* 2013; 19: 604
207. Peterson DA. Stem cells in brain plasticity and repair. *Neuroscience* 2002, 2:34–42
208. Porsolt, R. D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730-732
209. Purdy SJ, Whitehouse BJ, Abayasekara DR. Stimulation of steroidogenesis by forskolin in rat adrenal zona glomerulosa cell preparations. *J Endocrinol.* 1991 Jun;129(3):391-7
210. Putnam S, Du J, Sato S, Hull E. Testosterone restoration of copulatory behavior correlates with medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Horm Behav* 2001;39:216-24.

211. Quirarte GL, de IT, I, Casillas M, Serafin N, Prado-Alcalá RA, et al Corticosterone infused into the dorsal striatum selectively enhances memory consolidation of cued water-maze training. *Learn Mem* 2009;16: 586–589.
212. Raff M, Barres B, Bume J, et al. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993;262:695-700.
213. Rakic Pasko. Adult Neurogenesis in Mammals: An Identity Crisis. *The Journal of Neuroscience* February 1, 2002;22(3):614–618.
214. Ramirez-Rodriguez G., Ortíz-López L., Domínguez-Alonso A., Benítez-King GA., Kempermann G. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res.* 2011;50(1):29-37. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00802.x.
215. Ramírez Rodríguez G., Silva Lucero MC., Gómez Virgilio L., Ocaña Fernández MA., Ortiz López L., Torres Pérez MO., Meraz-Ríos MA. Las zonas neurogénicas en el adulto y su relación con las enfermedades neuropsiquiátricas. *Salud Mental* 2013; 36(3):201-210.
216. "Récamier-Carballo S., Estrada-Camarena E., Reyes R., Fernández-Guati A. Synergistic effect of estradiol and fluoxetine in young adult and middle-aged
217. female rats in two models of experimental depression. *Behavioural Brain Research* 233 (2012) 351– 358. "
218. Reul JM. Making memories of stressful events: a journey along epigenetic, gene transcription, and signaling pathways. *Front Psychiatry.* 2014 Jan 22;5:5. doi: 10.3389/fpsy.2014.00005. eCollection 2014.
219. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707-10.
220. Robert S. B. Clark, Patrick M. Kochanek, Simon C. Watkins, MinzhiChen, C. Edward Dixon, et.al. Caspase-3 Mediated Neuronal Death After Traumatic Brain Injury in Rats. *J.Neurochem* 2000; 74 (2):740-753.
221. Robert W. Keane, Susan Kraydieh, George Lotocki, Ofelia F. Alonso, Phillip Aldana, and W. Dalton Dietrich. Apoptotic and Antiapoptotic Mechanisms After Traumatic Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21(10):1189-1199.
222. Rolando C, Taylor V. Neural Stem Cell of the Hippocampus: Development, Physiology Regulation, and Dysfunction. *Disease Curr Top Dev Biol.* 2014;107:183-206.
223. Rong W, Wang W, Yuan W, Chen Y. Rapid effects of corticosterone on cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla of rats. *Brain Res* 1999 Jan 2; 815(1):51-9.
224. Rössler OG, Thiel G. Brain-derived neurotrophic factor-, epidermal growth factor-, or A-Raf-induced growth of HaCaT keratinocytes requires extracellular signal-regulated kinase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 May;286(5):C1118-29.
225. Rupperecht R, Holsboer F. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* 1999 Sep;22(9):410-416.
226. Sahay A, Drew MR, Hen R. Dentate gyrus neurogenesis and depression. *Prog Brain Res.* 2007; 163:697-722. Review.
227. Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev.* 1986; Aug; 7(3):284-301.
228. Sapolsky, RM et al. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocr Rev* 2000: 21, 55–89.

229. Scheid MP, Schubert KM, Duronio V. Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem*. 1999 Oct 22;274(43):31108-13.
230. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* 2004 Jul; 11 Suppl 1:S45-55.
231. Schoenfeld TJ., Gould E. Stress, stress hormones and adult neurogenesis. *Experimental Neurology* 2012;233: 12–21.
232. Scholzen T, Gerdes J. The ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* 2000;182:311–322.
233. Schutsky K, Ouyang M, Castelino CB, Zhang L, Thomas SA. Stress and glucocorticoids impair memory retrieval via β 2-adrenergic, Gi/o-coupled suppression of cAMP signaling. *Journal Neurosci*. 2011; 31(40):14172-81.
234. Seale JV., Wood SA., Atkinson HC., Bate E., Lightman SL., Ingram CD., Jessop DS., Harbuz MS. Gonadectomy reverses the sexually dimorphic patterns of circadian and stress-induced hypothalamo-pituitary- adrenal axis activity in male and female rats. *J of Neuroendocrinology*. 2004 (16): 516–524.
235. Seki T. Micro environmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis. *AnatSci Int*. 2003 Jun;78(2):69-78.
236. Seoane A, Tinsley CJ, Brown MW. 2011. Interfering with perirhinal brain-derived neurotrophic factor expression impairs recognition memory in rats. *Hippocampus* 21:121–126.
237. Seyle H. *The Stress of life*. McGraw-Hill, 1956
238. Sheline YI, Mittler BL, Mintun MA. The hippocampus and depression. *Eur Psychiatry* 2002 Jul; 17 Suppl 3:300-5.
239. Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. 1992 septiembre; 116 (1): 201-11.
240. Smitha KK, Mukkadan JK. Effect of different forms of acute stress in the generation of reactive oxygen species in albino Wistar rats. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2014 Jul-Sep;58(3):229-32.
241. Snyder J, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron H. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior. *Nature* 2011; 476(7361): 458–461.
242. Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 2002; 417 :39–44.
243. Sterner EY., Kalynchuk LE. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34: 777–790.
244. Stephens MA, Mahon PB, McCaul ME, Wand GS. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute psychosocial stress: Effects of biological sex and circulating sex hormones. *Psychoneuroendocrinology*. 2016 Apr;66:47-55.
245. Stroud LR., Salovey P., Epel ES. Sex differences in stress responses: social rejection versus achievement stress. *Biol Psychiatry*. 2002 Aug 15;52(4):318-27.
246. Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 2004; 14:1 710.1016/j.conb.2004.04.001
247. Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, Mizuno T, Tohyama M. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NF κ B activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 1999 Mar 26;274(13):8531-8.

248. Tanapat P., Hastings NB., Reeves AJ., Gould E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 1999; 19, 5792-5801.
249. Tanapat P., Hastings NB., Gould E. Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *J Comp Neurol.* 2005; 17; 481(3):252-65.
250. Tanapat P., Galea LA., Gould E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 1998 Vol. 16 No. 3/4 pp.235-239
251. Tanapat P., Hastings NB., Rydel TA., Galea LM., Gould E. Exposure to Fox Odor Inhibits Cell Proliferation in the Hippocampus of Adult Rats via an Adrenal Hormone- Dependent Mechanism *The Journal of Comparative Neurology* 2001 (437):496–504
252. Tasker JG, Di S, Malcher Lopes R. Minireview: Rapid Glucocorticoid Signaling via Membrane-Associated Receptors. *Endocrinology* 2006;147(12):5549-5556.
253. Teixeira C, Figueiredo B, Conde A, Pacheco A, Costa R. Anxiety and depression during pregnancy in women and men. *Journal of Affective Disorders* 2009; (119):142–148.
254. Ter Horst JP, Kentrop J, Arp M, Hubens CJ, de Kloet ER, Oitzl MS. Spatial learning of female mice: a role of the mineralocorticoid receptor during stress and the estrous cycle. *Front Behav Neurosci.* 2013; 30; 7:56. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00056. PMID:23754993
255. The Paradox of Akt-mTOR Interactions. Lakshmi pathi Vadlakonda, Abhinandita Dash, Mukesh Pasupuleti, Kotha Anil Kumar, and Pallu Reddanna *Front Oncol.* 2013; 3: 165. doi: 10.3389/fonc.2013.00165
256. Thomas RM., Hotsenpiller G., Peterson DA. Acute psychosocial stress reduces cell survival in adult hippocampal neurogenesis without altering proliferation. *J Neurosci* 2007; 27:2734–43.
257. Thomas RM., Urban JH., Peterson DA. Acute exposure to predator odor elicits a robust increase in corticosterone and a decrease in activity without altering proliferation in the adult rat hippocampus. *Exp Neurol* 2006;201:308–15.
258. Torpy D, Papanicolaou D, Chrousos G. Sexual dimorphism of the human stress response may be due to estradiol-mediated stimulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 982-4.
259. "Toufexis D., Rivarola MA., Lara H., Viau V. Stress and the Reproductive Axis. *J of Neuroendocrinology.* 2014 (9):573-86. doi: 10.1111/jne.12179. Review.
260. "
261. Tuquet C, Dupont J, Mesneau A, Roussaux J. Effects of tamoxifen on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Cell Biol Toxicol* 2000;16:207–19
262. Uhart M, Chong R, Oswald L, Lin P, Wand G. Gender differences in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 2006; 31: 642-52.
263. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
264. Vasconsuelo A, Milanesi LM, Boland RL. 17 β -Estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Endocrinol* 2008;196:385–97.
265. Vega-Rivera NM, Fernandez-Guasti A, Ramirez-Rodriguez G, Estrada-Camarena E. Acute stress further decreases the effect of ovariectomy on immobility behavior and hippocampal cell survival in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2013;38(8):1407-17.

266. Vega-Rivera NM., Fernández-Guasti A., Ramírez-Rodríguez G. Estrada-Camarena E. Forced swim and chronic variable stress reduced hippocampal cell survival in OVX female rats. *Behav Brain Res* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.033>.
267. Venere M, Han YG, Bell R, Song JS, Alvarez-Buylla A, Belloch R. Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus. *Development* 2012 Nov;139(21):3938-49.
268. Viau V, Meaney J. Basal and stress hypothalamic-adrenal activity in cycling and ovariectomised-steroid treated rats. *Endocrinology* 1991;129: 2503–2511 *Curr*
269. Vic P, Vignon F, Derocq D, Rochefort H. Effect of estradiol on the ultrastructure of the MCF7 human breast cancer cells in culture. *Cancer Res* 1982;2:667–73.
270. Volker Korz and Julietta U. Frey Stress-Related Modulation of Hippocampal Long-Term Potentiation in Rats: Involvement of Adrenal Steroid Receptors *Journal of Neuroscience* August 2003, 23 (19) 7281-7287
271. Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Jan;33(1):19-32.
272. Walworth NC. Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Dec;12(6):697-704.
273. Wang J, Korczykowski M, Rao H, Fan Y, Pluta J, Gur R. Gender difference in neural response to psychological stress. *Soc Cogn Affect Neurosci* 2007;2: 227-39.
274. Willner Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* (1997) 134:319–329.
275. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology* 1987;93:358-364.
276. Willner P., Mitchell J. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural Pharmacology* 2002; 13:169–188.
277. Willner P., Scheel-Krüger J., Belzung C. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience and Biobehavioral* 2013;37: 2331–2371
278. Wu H, Lu D, Jiang H, Xiong Y, Qu C, Li B, Mahmood A, Zhou D, Chopp M. 2008. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 25:130–139.
279. Young EA, Haskett RF, Murphy-Weinberg V, Watson SJ, Akil H. Loss of glucocorticoid fast feedback in depression. *Arch Gen Psychiatry* 1991 Aug; 48(8):693-9.
280. Zhao Z., Taylor WD., Styner M., Steffens DC., Krishnan KRR., MacFall JR. Hippocampus Shape Analysis and Late-Life Depression. Baune B, ed. *PLoS ONE*. 2008; 3(3):e1837.
281. ZiadKronfol D, Remick G. Cytokines and the Brain: Implications for Clinical Psychiatry. *Am J Psychiatry* 2000;157:683–694.
282. Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Carvalho LA, Pariante CM. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression *Progress. Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2011;35:722–729.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00178

Matrícula: 2133802090

IMPACTO DEL ESTRÉS AGUDO EN LA PROLIFERACIÓN, SOBREVIVENCIA Y APOPTOSIS HIPOCÁMPICA EN RATAS HEMBRAS CON DIFERENTES CONDICIONES ENDÓCRINAS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 30 del mes de agosto del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
- DRA. HERLINDA BONILLA JAIME
- DR. GERARDO RAMIREZ RODRIGUEZ
- DR. CAROLINA LOPEZ RUVALCABA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: AIDA ELIZABETH SOTO MEDINA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

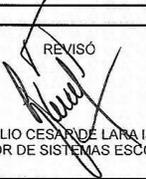
Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Soto Medina

AIDA ELIZABETH SOTO MEDINA
ALUMNA

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



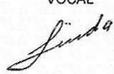
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA



DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL



DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

VOCAL



DR. GERARDO RAMIREZ RODRIGUEZ

SECRETARIO



DR. CAROLINA LOPEZ RUVALCABA