

## **Receptores de corticosteroides**

Las acciones genómicas de los corticoides sobre el SNC son mediadas por las dos clases de receptores ya mencionadas, GR y MR (59, 60), que difieren entre sí por su especificidad y afinidad por los ligandos, por su localización y por su función (ver más adelante).

Los GR no activados tienen una localización predominantemente citoplasmática. El receptor libre forma un complejo con un sistema de proteínas chaperonas, las *heat shock protein* o hsp90, hsp70, hsp40, con las inmunofilinas FKBP52 (83, 217, 221). Estas proteínas confieren a los receptores una alta afinidad por la hormona y se disocian del receptor tras la unión de la misma. No obstante, estas proteínas parecen estar también implicadas en el movimiento del GR desde el citoplasma hacia el núcleo, a lo largo de los microtúbulos (83, 217).

Una vez la hormona se ha unido al receptor se produce un cambio conformacional y el complejo ligando-receptor se torna activo lo que le permitiría unirse a secuencias específicas de DNA en zonas reguladoras o promotoras de los genes denominados CRE (elementos de respuesta a los glucocorticoides). De esta manera los glucocorticoides controlan la expresión génica activando o inhibiendo determinados genes.

Los receptores MR se unen principalmente a un glucocorticoide como la corticosterona y a mineralocorticoides como la ALDO. Los MR tienen una afinidad elevada por la ALDO y la corticosterona, con una constante de disociación (Kd) de 0.5 nM. En cambio los receptores GR presentan una afinidad relativamente baja por la corticosterona y mayor afinidad por el cortisol y por diversos glucocorticoides sintéticos como la dexametasona (DEX), (también pueden unirse a la ALDO, aunque con menor afinidad). La afinidad de los GR por la corticosterona es un orden de magnitud menor (2,5 a 5 nM) que la de los MR (59).

Los MR están presente en órganos blancos para los mineralocorticoides como es el riñón, intestino y glándulas salivales, regulando el equilibrio osmótico y el consumo de sal (244). A nivel central, los MR se expresan particularmente en hipocampo, septum, amígdala, bulbo olfatorio y regiones de la corteza cerebral (59). Dentro de la formación hipocámpal, abundan en las áreas CA1, CA3 y en el giro dentado. También se ha encontrado en menor cantidad en el núcleo del tracto solitario (NTS). Los GR en cambio, tienen una distribución más generalizada, ya que pueden encontrarse en todo los tipos de tejido. Dentro del SNC se encuentra en gran abundancia en el sistema límbico (hipocampo, septum), en el PVN y en áreas monoaminérgicas del tronco encefálico. Niveles moderados se han detectado en muchos núcleos talámicos, estriado, amígdala central y corteza (115, 180, 242).

La diferente afinidad de ambos receptores por la corticosterona determina que muestren un grado de ocupación distinto entre ellos, en función de los niveles circulantes de corticoides. Así, cuando los glucocorticoides están elevados, como ocurre durante la noche (en ratas) o tras situaciones de estrés, los receptores que se van ocupando son los GR, razón por la cual tienen tanta importancia en el bloqueo de la repuesta del eje HPA al estrés. En cambio, los MR cumplen un papel modulador de los niveles basales del eje HPA en la fase diurna (60) por ser estos receptores los primeros en ser ocupados.

A nivel periférico casi todos los tejidos poseen GR y en menor cantidad los MR (189). La distribución diferencial de estos receptores en los tejidos permite a los glucocorticoides actuar en diferentes procesos metabólicos indispensable para el mantenimiento del organismo.

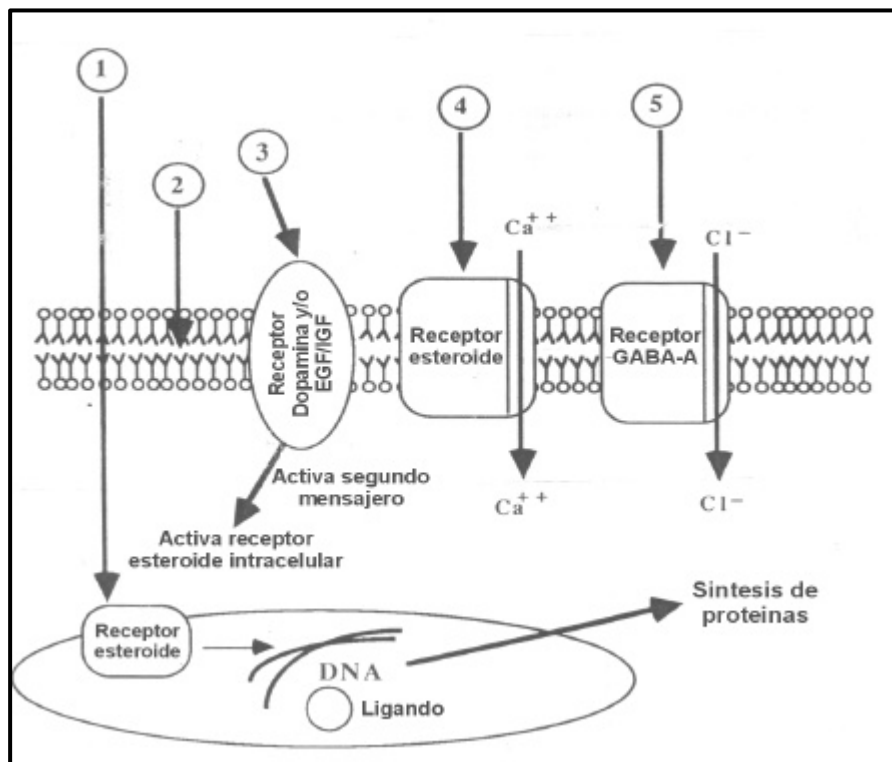
### **Mecanismos no-genómicos de los esteroides**

Al parecer, los efectos rápido de los glucocorticoides son mediados por receptores no genómicos que se encuentran en la membrana plasmática y que no estarían asociadas con la entrada de los glucocorticoides al interior de la célula. Los posibles mecanismo que podrían explicar esta acción no genómica de los corticoides serían (Figura 8):

- a) Cambios en la fluidez de la membrana celular.
- b) Una actuación a través de receptores en la membrana plasmática.
- c) Interacción con receptores de membrana para neurotransmisores, como los receptores GABA-A.

El rápido efecto de las hormonas esteroideas (segundos o minutos) parece ejercerse a nivel de membrana plasmática, dado que puede tener lugar incluso si la hormona está conjugada covalentemente a un polímero de gran tamaño que no le permite su entrada al interior de la célula. Aunque los esteroides pueden alterar la fluidez de la membrana, no está claro en qué grado y si este efecto podría contribuir realmente a la acción biológica del esteroide. La presencia de receptores para hormonas esteroideas en la membrana plasmática fue descrita hace ya 20 años (273). Sin embargo, no podemos afirmar que los efectos no genómicos de los glucocorticoides estén mediados por receptores “específicos” de membrana dado que receptores de este tipo se ha caracterizado en anfibios (199), pero no existen evidencias directas sobre su funcionalidad en mamíferos. Más evidencias existen de que los esteroides son potentes reguladores de los receptores GABA-A en el SNC. El significado fisiológico de los esteroides en la regulación de receptores GABA-A podría ser muy importante en situaciones de estrés, en la ansiedad durante el síndrome pre-menstrual y en la depresión (160). Los glucocorticoides afectan a diversos aspectos de la función GABAérgica, a través de mecanismos genómicos y no genómicos. Existen pruebas de que los glucocorticoides pueden modular la función del complejo GABA-A por interacción directa con dicho complejo (25, 159). Las primeras evidencias que demostraban que los esteroides podían regular al receptor GABA-A se obtuvieron con derivados de la progesterona y de la deoxicorticosterona que son utilizados como anestésicos de tipo esteroideo, observándose una potenciación de la eficacia del GABA para abrir el canal de Cl<sup>-</sup> y un incremento de la unión del flunitrazepam (158).

**Figura 9:** Esquema de los modos de acción genómico y no-genómico de las hormonas esteroideas; (1) representa el modelo clásico de acción genómica y (2, 3, 4 y 5) representan el mecanismo de acción no-genómico. Esquema adaptado de Brann et al. (1995).



### 1.3. ESTRÉS CRÓNICO Y ADAPTACIÓN

La exposición a un estímulo estresante puede durar desde pocos segundos hasta días o semanas y los efectos del estrés sobre el sistema endocrino son dependientes del tiempo de exposición. Si la situación estresante es repetida y se prolonga por cierto tiempo es considerada como estrés crónico, y se ha relacionado con importantes patologías psicológicas y fisiológicas en humanos. Se ha sido sugerido que el estrés es un factor importante en el desarrollo de enfermedades gastrointestinales, hipertensión arterial, supresión del sistema inmunitario, disfunciones reproductoras y depresión (43, 266).

Según la modalidad de presentación del estrés crónico podemos distinguir entre dos tipos: crónico continuo y crónico intermitente. En el estrés crónico continuo el animal puede ser sometido de manera ininterrumpida a estrés durante días o semanas, mientras que en el crónico intermitente los animales son diariamente expuestos durante semanas a una situación estresante con un tiempo de exposición diario que va desde minutos hasta horas. Como ejemplo de un modelo de estrés continuo podríamos mencionar el estrés social, observado tanto en monos como en roedores. El estrés social es particularmente notable cuando se potencia el comportamiento agresivo de los machos por la presencia de hembras (22).

El modelo de estrés más usado experimentalmente es el crónico intermitente, en el cual los animales son expuestos diariamente a una situación estresante. Es un modelo muy bien caracterizado en nuestro laboratorio (11, 15, 16). En la literatura, los modelos más utilizados han sido la exposición al frío, la restricción de movimientos en tubo (*restraint*), la inmovilización en tabla (IMO), el nado forzado o el choque eléctrico en las patas, entre otros (10, 12, 122, 228). Podríamos mencionar el estrés crónico variable, como otro modelo de estrés crónico que comparte características con las dos clases de situaciones crónicas mencionadas anteriormente. En este caso, los animales son expuestos diariamente a diferentes clases de estímulos estresantes de forma aleatoria, dificultando la posibilidad de predecir la llegada de un estímulo en particular y la adaptación (19, 122).

La exposición a situaciones de estrés crónico, tanto continuos como intermitentes, produce numerosos cambios fisiológicos y neuroendocrinos. Los cambios observados dependen de la clase de estímulo estresante aplicado, de la intensidad y de la duración. Por ejemplo, si la intensidad del estímulo aplicado es elevada, como en el caso de la IMO, causa importantes cambios a varios niveles del eje HPA, pero los estímulos más suaves no. Los principales cambios observados con sistemas de estrés crónico de intensidad elevada pueden generalizarse como sigue (170):

- Reducción de la ingesta
- Disminución en la ganancia del peso corporal
- Involución del timo
- Hipertrofia adrenal y aumento de la respuesta adrenocortical a la ACTH
- Incremento de los niveles basales de corticosterona con niveles normales de ACTH
- Aumento en la expresión del gen de la POMC en la hipófisis anterior
- *Down-regulation* de los receptores de CRH
- Incremento en la respuesta al CRH exógeno
- Aumento en la expresión de los genes del CRH y AVP en el PVN
- *Down-regulation* de los receptores de glucocorticoides tipo II en el hipocampo

Con la exposición repetida a un estrés crónico intermitente de cierta intensidad se observa en la rata una disminución de la ingesta sólida que provoca como consecuencia una disminución del peso corporal (172). Se observa también un incremento en el tamaño de las glándulas adrenales, más evidente en el peso relativo debido a la pérdida de peso corporal. Este aumento podría atribuirse al efecto trófico de liberación diaria de ACTH, aunque no se descartan otros factores (13). Aunque los niveles basales de ACTH suelen ser normales, los de corticosterona están incrementados, pero sólo en la fase diurna del ritmo circadiano, que es cuando los niveles plasmáticos de glucocorticoides están en su nivel más bajo en el caso de la rata (174).

Aunque los niveles de ACTH son normales al día siguiente de la última exposición al estrés crónico intermitente, esto no es indicativo de la ausencia de cambios bioquímicos en el eje a nivel de hipófisis o a nivel suprahipofisario. A nivel hipofisario se ha podido observar un incremento en la expresión del gen para la POMC y en el contenido de ACTH (101), junto a una mayor respuesta de la administración exógena de CRH (173, 277). La mayor respuesta al CRH coincide con un descenso del número de receptores en la hipófisis (97). Finalmente, a nivel hipotalámico, el estrés crónico produce un incremento de los niveles de mRNA de CRH en el PVN y en el número de

células CRHérgicas capaces de coexpresar AVP (57, 164, 165). No se ha observado que el estrés crónico cambie el número de receptores de glucocorticoides en la hipófisis o en el hipotálamo, aunque sí se observa una disminución en la formación hipocampal (89, 173, 243).

Tomados en conjunto, todos estos datos parecen demostrar que después de la exposición a estímulos estresantes crónico la capacidad potencial de respuesta del eje HPA está notablemente incrementada, aunque no se refleja en la actividad basal del eje (tónica). Esta mayor capacidad potencial de respuesta sería necesaria para asegurar en el futuro una respuesta adecuada del eje HPA frente a nuevas demandas, representadas por nuevos estímulos estresantes de característica y duración imprevisibles (170).

La respuesta hormonal a las situaciones estresantes son claramente dependiente de la variable estudiada y de la experiencia previa con la situación. Cuando exponemos los animales de forma intermitente y diaria a una situación estresante, la respuesta del eje HPA tiende a reducirse. Esta reducción en la respuesta inicial después de la exposición repetida al mismo estrés podría ser explicada como resultado de la contribución de dos mecanismos diferentes:

- a) Una reducción del impacto emocional producido por la familiarización del animal con el estímulo repetido.
- b) Consecuencias de cambios bioquímicos desencadenados por la exposición a la situación estresante. Por ejemplo, una regulación a la baja de los receptores (*down regulation*), un descenso de liberación de hormonas por agotamiento glandular o un incremento de la potencia de los mecanismos de retroinhibición.

Para distinguir entre estas dos posibilidades, una aproximación adecuada es el cambio de estímulo estresante. Si la reducción progresiva de la respuesta del eje HPA a una situación estresante fuera sobre todo consecuencia de la reducción de la reacción emocional frente a la situación y las capacidades de respuesta del sistema estuvieran intactas, cabría esperar una respuesta más o menos normal del eje HPA al nuevo estímulo estresante (heterotípico). Si por el contrario, la respuesta del eje HPA al nuevo estímulo fuera deficitaria o nula, probablemente se trate de cambios bioquímicos que están reduciendo claramente la capacidad de respuesta del sistema. Los resultados sugieren que la respuesta a un nuevo estímulo estresante suele mantenerse aproximadamente normal, lo que indica que la primera hipótesis parece más correcta.

Diversos autores consideran que la adaptación de los animales a un estímulo estresante repetido sigue básicamente las leyes de la habituación propuestas por Groves y Thompson (90), que son las siguientes:

- (i) la habituación es producida por la repetición del estímulo y, si éste deja de aplicarse, la respuesta se recupera a lo largo del tiempo.
- (ii) si se proporcionan series repetidas de habituación y recuperación espontánea, la habituación se produce cada vez de forma más rápida.
- (iii) cuanto más rápida sea la frecuencia de estimulación, más rápida y/o pronunciada es la habituación.

- (iv) cuanto más débil sea el estímulo, más rápida es la habituación.
- (v) aunque la habituación de la respuesta a un estímulo determinado puede también ser generalizada a otros estímulos, dependiendo del grado de similitud entre los estímulos, la habituación es básicamente específica para un estímulo particular.

Por todo ello, se ha sugerido el nombre de habituación en vez del de adaptación para explicar este descenso de la respuesta fisiológica como consecuencia de la exposición repetida a un mismo estímulo estresante. No obstante, aún es prematuro considerar la adaptación al estrés crónico repetido como un simple proceso de habituación.

La reducción progresiva de la respuesta al mismo estímulo repetido es observada sólo en algunas variables fisiológicas como la ACTH, las catecolaminas (adrenalina), la prolactina y la glucosa (13, 14, 17, 51, 132). La corticosterona no parece ser en muchos casos sensible a la repetición del estímulo. En este sentido, la reducción de la respuesta de la corticosterona al estrés repetido es claramente observada con estímulos de intensidad baja o media como el nado forzado (48), siendo más difícil encontrarla con estímulos más intensos (122, 211), incluso en aquellos casos en los que se ha observado una reducción de la ACTH (13). Esta diferencia en la adaptación entre la ACTH y la corticosterona podría deberse a dos razones: 1) la saturación de la secreción de la adrenal con niveles relativamente bajos de ACTH, de tal manera que una reducción en la liberación de ACTH no tiene porqué reflejarse en una reducción de la secreción de corticosterona (13, 75, 193) y 2) al aumento de la respuesta adrenocortical a la circulación de ACTH en ratas estresadas crónicamente (13). Por lo tanto, a la hora de estudiar la adaptación del eje HPA en respuesta a un estímulo estresante de elevada intensidad, la ACTH es un mejor marcador de adaptación que la corticosterona (170).

Algunas veces se ha observado ausencia de adaptación de los niveles ACTH en respuesta a al choque eléctrico, al nado forzado (308, 309), a la hipoglucemia inducida por la administración de insulina (54) o a la inyección de salino hipertónico (124). Las razones esgrimidas para explicar la ausencia de adaptación hacen referencia a la naturaleza de los estímulos estresantes. Parece que los estímulos principalmente físicos como la insulina o el salino hipertónico son más resistentes a la adaptación del eje HPA que otros como la inmovilización en tabla (IMO), que es un estímulo predominantemente emocional. Otras razones para explicar las discrepancias podrían ser la existencia de diferencias individuales en la capacidad de adaptación de los animales (191) o la introducción de pequeños cambios en los procedimientos experimentales, como la hora de exposición (169), las características del contexto (228) o al cambio en la persona que manipula los animales (66).

Un factor potencialmente importante para poder observar adaptación es el tiempo en el que se estudia la respuesta del eje HPA. En los estudios mencionamos anteriormente se ha estudiado la respuesta en el período de exposición al estrés y no en el período posterior a la finalización de la exposición al estímulo estresante. Nuestro laboratorio ha demostrado que la experiencia previa con un estímulo estresante acelera la recuperación de los niveles pre-estrés de ACTH y corticosterona, y, por lo tanto, la velocidad de recuperación del eje HPA después de finalizado el estrés, es un índice de adaptación más sensible que la respuesta inicial (85).

#### 1.4. EFFECTOS A LARGO PLAZO DEL ESTRÉS

Los estudios acerca del impacto de las situaciones estresantes se ha centrado principalmente en situaciones de estrés crónico, en las cuales se han demostrado importantes cambios a nivel comportamental, neuroquímico y neuroendocrino (10, 11, 15, 48, 120, 169, 172, 174, 210). Sin embargo, los efectos de un estrés agudo se han estudiado normalmente durante unas pocas horas después de finalizada la situación o a lo sumo hasta las 24-48 horas posteriores a la exposición (17, 122).

Los períodos prenatal y postnatal son etapas particularmente susceptibles a manipulaciones ambientales como la exposición a diferentes clases de estímulos estresantes o la separación maternal. En animales, la exposición a estímulos estresantes, tanto en la etapa prenatal (in útero) como postnatal, induce cambios a nivel del SNC que puede persistir en la etapa adulta, demostrando así la existencia de efectos a largo plazo (183, 280). Entre los cambios observados pueden resaltarse modificaciones en los niveles de ansiedad que están correlacionados con cambios en la actividad del eje HPA. Por ejemplo el estrés que sufren las madres durante la gestación puede facilitar que su descendencia presente una mayor reactividad emocional (280), una reducción en la actividad sexual, y una mayor tendencia a la autoadministración de drogas (156). A nivel neuroendocrino, el estrés prenatal reduce la capacidad de habituación de las hormonas del eje HPA ante la exposición repetida a un mismo estrés en la edad adulta (82).

En el período postnatal, los animales expuestos a cortos períodos de estimulación infantil o *handling* muestran una menor respuesta del eje al estrés en la etapa adulta (183), lo que también sucede con animales no manipulados si han recibido una mejor atención maternal (148). Entre los principales cambios en el eje HPA causados por el *handling* podemos mencionar (183):

- 1- reducción de la respuesta al estrés.
- 2- una reducción de los niveles basales del mRNA para CRH en el PVN y de los niveles de CRH y AVP en la eminencia media
- 3- una regulación al alta (*up regulation*) de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo y corteza prefrontal.

Este modelo de manipulación postnatal produce efectos protectores que persisten a lo largo de la vida del animal e influyen en el envejecimiento (182). Así, ciertas alteraciones asociadas al envejecimiento, como el aumento en los niveles de las hormonas del eje HPA, el deterioro neural en el hipocampo y el deterioro cognitivo se ven reducidas en las ratas que han sido expuestas previamente a *handling* (183).

Al contrario de los cambios observados con el *handling*, la separación maternal prolongada, o la administración de endotoxina aumenta la respuesta del eje HPA al estrés (214). Los animales adultos expuestos a la separación maternal o a la endotoxina mostraron en respuesta al estrés: un incremento de la secreción de ACTH y corticosterona después de finalizado el estrés, altos niveles de mRNA CRH hipotalámico y altos niveles de CRH y AVP en la eminencia media, cuando se compararon con los animales control no separados o animales no expuestos a la endotoxina.

Los efectos a largo plazo del estrés no parecen restringirse a las etapas tempranas del desarrollo. Las experiencias estresantes de gran magnitud puede tener en humanos y en animales importante consecuencias emocionales y fisiológicas a largo plazo (227). Un caso extremo de estas consecuencias a largo plazo es el síndrome de estrés post-traumático (PTSD) en humanos (300). Actualmente se han desarrollado numerosos modelos animales en los que una sola experiencia con un estímulo estresante intenso (choque eléctrico, confrontación social) producen alteraciones a largo plazo en respuestas comportamentales, autonómicas y hormonales cuando son enfrentados nuevamente a la misma o una nueva experiencia estresante días o semanas más tarde. Estos cambios en animales mimetizan algunos de los cambios observados en el PTSD (ver revisión de Rianne) (227).

En animales, las evidencias experimentales de efectos a largo plazo de la exposición a situaciones estresantes han sido siempre relacionadas con efectos negativos de la exposición al estrés. Las primeras pruebas acerca de efectos relativamente persistentes sobre el comportamiento de una sola exposición al estrés se obtuvieron tras la exposición de los animales (originariamente perros) a choque eléctricos incontrolables. Una sola sesión de estrés incontrolable era capaz de causar déficits asociativos y motivacionales que se agruparon bajo el nombre de indefensión aprendida (157) y se traducían en una menor capacidad de aprendizaje en una tarea de evitación activa. Posteriormente, Antelman y col. observaron que una sola exposición al estrés, tanto físico como psicológico, podía modificar a largo plazo (desde semanas hasta meses) los efectos de diversos fármacos (v.g. cocaína, anfetamina, haloperidol, diazepam) sobre el organismo, habiéndose sugerido que la intensidad del estímulo estresante era muy importante para determinar la dirección de los cambios (aumento o disminución de los efectos) (6, 7). Sin embargo, los resultados de Antelman et al. siguen siendo confusos y difíciles de interpretar a nivel teórico.

Utilizando el modelo de derrota social, Koolhaas et al. (1990) observaron en ratas que una sola sesión de estrés causaba, a largo plazo, un incremento de la inmovilidad en la prueba de natación de Porsolt, efecto que se redujo por la administración de antidepresivos (126). Más recientemente, se han observado efectos a largo plazo sobre la respuesta del eje HPA. El laboratorio de Tilders demostró que una sola exposición al choque eléctrico produjo cambios a largo plazo en el SNC, resultando en un aumento de la ansiedad y un aumento de la respuesta del eje HPA a un nuevo estímulo estresante (282, 283). Más tarde demostraron un incremento de la respuesta del eje HPA al choque eléctrico en animales que recibieron una inyección de interleukina-1 $\beta$  11 días antes (250). Además, la exposición a diferentes estímulos estresantes, incluyendo el choque eléctrico y la administración de interleukina-1 $\beta$ , indujo un incremento a largo plazo de la vasopresina en la capa externa de la eminencia media (248), un cambio usualmente asociado a una mayor capacidad de respuesta del eje HPA. En conjunto, todos estos datos sugieren que la exposición puntual a una situación de estrés causaría un incremento a largo plazo en la capacidad del eje HPA para responder a nuevos estímulos estresantes y cambios de comportamiento caracterizados básicamente por un incremento en la ansiedad.



## **Síndrome de estrés post-traumático: Disfunciones del eje HPA**

En el año 1980, el PTSD fue introducido en la tercera edición del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-III). A partir de ese momento ha ido creciendo exponencialmente el interés en este trastorno, materializado en cientos de publicaciones científicas, investigaciones, creación de asociaciones y desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos. El PTSD es definido como un trastorno neuropsiquiátrico en el que la vivencia de un suceso “traumático” como las guerras, las catástrofes naturales, o una violación, causan en el individuo un impacto de tal magnitud que su funcionamiento cognitivo se verá afectado de forma drástica. El efecto de estas situaciones se pueden manifestar meses o incluso años después de la experiencia traumática (304).

Las personas que como consecuencia de una situación traumática desarrollan el PTSD pueden experimentar tres clases de síntomas (DSM-IV): 1) repetición de las vivencias asociadas al del hecho traumático, 2) evitación de estímulos asociados con el trauma e 3) hiperactivación.

1- Síntomas provocados al revivir la experiencia traumática. Es de destacar que cada vez que se revive el hecho traumático se provoca en el individuo una sensación parecida a la situación original, dando lugar así a una retraumatización.

- La irrupción recurrente de pensamientos, sentimientos o imágenes relacionados con el hecho traumático
- sueños y pesadillas recurrentes que producen malestar
- la sensación de estar viviendo nuevamente el hecho traumático, que puede darse bajo la forma de *flashbacks*, episodios disociativos, ilusiones o alucinaciones
- reacciones fisiológicas o psicológicas intensas de malestar al exponerse a estímulos que recuerdan o simbolizan el hecho traumático

2- Síntomas de Evitación: Bajo esta categorría se han agrupado dos tipos de síntomas:

- los de evitación en sentido estricto, que incluyen el esfuerzo por evitar pensamientos, sensaciones, personas, lugares, actividades y hechos que recuerden el suceso traumático
- los de carácter disociativo, como la incapacidad para recordar aspectos significativos del hecho traumático.

3- Síntomas de Hiperactivación: trastornos del sueño, trastornos en la concentración, irritación, hipervigilancia o respuesta de sobresalto exagerada.

Muchos de estos síntomas dan lugar a confusión con otras patologías como la depresión, somatización, déficit de atención, e incluso hasta con algún tipo de trastorno psicótico . (80, 301).

### **Prevalencia**

Los estudios basados en la población general, revelan que la prevalencia global del PTSD oscila entre el 1 y el 14%, explicándose esta variabilidad por los criterios diagnósticos empleados y el tipo de población objeto de estudio. En estudios sobre individuos de riesgo (v.g. veteranos de guerra, víctimas de erupciones volcánicas o atentados terroristas) pueden encontrarse cifras de prevalencia que van del 3 al 58%. Estas observaciones a llevado a los investigadores a sugerir que las diferencias de personalidad podrían jugar un papel importante, existiendo personas mucho más sensibles a desarrollar el PTSD (301).

### **Eje HPA**

Si comparamos la disfunción del eje HPA en la depresión y el PTSD, debemos recordar que en la depresión se describió inicialmente hipercortisolemia y resistencia a la inhibición negativa provocada por la DEX (prueba de supresión a la DEX). Posteriormente, se ha demostrado un aumento del CRH en el líquido céfalo raquídeo en depresivos (192) y una menor densidad de receptores a CRH en corteza frontal (301), un aumento en el tamaño de la hipófisis anterior y una menor respuesta de la ACTH al CRH, y un mayor tamaño de la glándula adrenal (130, 240). Estos efectos son muy parecidos a los del estrés crónico (187).

Por el contrario, en pacientes con PTSD se observa hipocortisolemia y una normal supresión tras la DEX, lo cual difiere sustancialmente de lo descrito en la depresión (304). Existen evidencia de que los receptores de glucocorticoides están disminuidos en linfocitos de pacientes depresivos y aumentados en pacientes con PTSD (152, 304). Estos datos coinciden con lo observado con el cortisol plasmático, elevado en la depresión y disminuido en el PTSD (304). Se ha sugerido que esta hipoactividad del eje HPA en el PTSD podría ser debido a una mayor capacidad del cortisol para suprimir la actividad del eje HPA en estos pacientes (300) lo que indica una hiposensibilidad a los mecanismos de retroinhibición del eje HPA en la depresión y una hipersensibilidad en el PTSD (300). Sin embargo queda aún mucho por cortejar acerca de la relación entre el eje HPA y el PTSD.

## **1.5. LOS GLUCOCORTICOIDES: SU RELACIÓN CON LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE.**

El aprendizaje y la memoria, al igual que el estrés, son conceptos difícil de definir, pero generalmente se admite que el aprendizaje es el proceso por el cuál se adquiere nueva información y la memoria el proceso mediante el cual aquella información es almacenada (181, 234). Se considera que existen 3 etapas en el proceso de formación de la memoria: adquisición, consolidación y evocación o recuerdo (181, 190).

La memoria es inicialmente un estado transitorio mediante el cual se retiene temporalmente la información recientemente adquirida. Posteriormente, con el paso del tiempo, es convertida en memoria a largo plazo, lo que permite retener información durante períodos de tiempo prolongados que pueden extenderse desde varios meses hasta un número variable de años o incluso a toda la vida. La conversión de memorias

lábil en memorias permanentes y estables es lo que se conoce como consolidación. Así, la formación almacenada en la memoria sigue una progresión desde una forma breve e inestable, *memoria a corto plazo*, que tiene lugar inmediatamente después del aprendizaje (memoria para acontecimientos sensoriales) que podrá consolidarse o no como *memoria a largo plazo*; siendo ésta relativamente estable y duradera (181). La información así almacenada puede ser recordada en condiciones apropiadas.

Es evidente que el aprendizaje y el recuerdo de una situación aversiva o de un estímulo ambiental permite al individuo prepararse para responder ante una nueva situación y favorece su supervivencia. El ejemplo mejor conocido de aprendizaje es el condicionamiento clásico, caracterizado por Pavlov en 1927, en el que los animales aprenden a predecir las consecuencias de la aparición de un nuevo estímulo por su asociación con un estímulo familiar. Una variante de este modelo animal es el condicionamiento del miedo. Este aprendizaje es inducido en la rata por la asociación repetida de choques eléctricos (estímulo incondicionado, EI) con un estímulo condicionado, (EC) que es un estímulo sensorial específico (tono o luz). Después del entrenamiento en el que se asocian los EI y EC, se establecen cambios de larga duración en el SNC, de tal manera que la sola presentación del EC produce en la rata respuestas comportamentales características de las situaciones de peligro (166). El miedo generado se suele medir en la rata mediante la conducta de paralización (*freezing*). A nivel fisiológico, las respuestas características son las propias de las situaciones de estrés, es decir, la activación del eje HPA y SMA (233). Los animales no sólo establecen un condicionamiento a las señales específicas asociadas al castigo, sino que también pueden establecer un condicionamiento al lugar donde recibieron el castigo, que se conoce como condicionamiento al contexto (conjunto de características del lugar donde recibió el castigo), siendo especialmente interesante por la aparente disociación entre las vías que causan el condicionamiento específico y el condicionamiento al contexto. Otro modelo de aprendizaje asociativo es la evitación pasiva, en la que se castiga con choque eléctrico la entrada espontánea del animal en un compartimento pequeño y oscuro desde otro mayor y más iluminado, de tal manera que, en una segunda exposición horas o días más tarde, el animal no entra (o tarda más en hacerlo) en el compartimento en el que recibió el choque eléctrico.

Se considera actualmente que existen distintos tipos de memoria, siendo la clasificación más aceptada la división entre memoria declarativa o explícita y no declarativa. La primera implica en humanos, elaboración consciente, mientras que la segunda no tiene por qué involucrar procesos conscientes. La no declarativa incluye la asociada a los aprendizajes asociativos (v.g. condicionamiento clásico) y no asociativos (habitación, sensibilización). Parece bien establecido el papel fundamental de la formación hipocampal en la memoria declarativa en humanos (262). En animales este tipo de memoria podría estar implicada en el aprendizaje espacial y en la memoria del contexto. Por su parte, la amígdala sería fundamental para la adquisición y el condicionamiento al miedo (45, 46, 142).

El efecto de los esteroides adrenales sobre las bases neurobiológicas de la memoria y el aprendizaje se han centrado en tres modelos. El primero es el de la potenciación a largo plazo ("long-term potentiation, LTP) y otros fenómenos de plasticidad sináptica, especialmente en la formación hipocampal. La estimulación eléctrica de los axones de la corteza entorrinal al giro dentado causa un aumento a largo plazo en la magnitud de los potenciales postsinápticos conocido como LTP. Se considera que esto es un ejemplo de plasticidad sináptica, muy probablemente relacionado con el aprendizaje (73). El

segundo está constituido por los aprendizajes de tipo asociativo, entre los cuales destaca el condicionamiento del miedo y la evitación pasiva (181). El tercero es la memoria espacial, que es especialmente sensible a las lesiones de la formación hipocampal (149, 194). La memoria espacial se estudia en varios tipos de pruebas, entre las que destacan el laberinto acuático y el laberinto radial.

Existe una amplia literatura acerca del posible papel de los glucocorticoides sobre la memoria y el aprendizaje, sin embargo, los resultados son difíciles de interpretar y no hay todavía un marco teórico apropiado para explicar su papel. Por consiguiente, es difícil predecir el posible efecto de la manipulación experimental de los niveles de glucocorticoides. No obstante, algunas consideraciones teóricas pueden ayudar a la interpretación de los resultados experimentales.

En primer lugar, la existencia de dos tipos de receptores, MR y GR, que tienen distinta afinidad por los glucocorticoides circulantes (cortisol o corticosterona, según la especie) complica enormemente la interpretación de los resultados, puesto que el nivel circulante de glucocorticoides determina que sólo se ocupen substancialmente los MR o estén ocupados ambos tipos al mismo tiempo. En este sentido, es evidente que sólo en los animales ADX cabe asumir que una gran parte de los MR estén desocupados y que sólo en aquellas situaciones en las que los niveles circulantes de corticosterona (en la rata) se elevan por encima de unos 10 µg/dl, los GR empiezan a ocuparse de forma significativa biológicamente. Cuando se administra corticosterona en el agua de bebida a animales ADX (grupos ADX+B) el nivel de corticosterona en el agua de bebida es muy importante para saber si estamos simulando realmente la actividad basal del eje HPA o estamos por debajo o por encima, con el cambio consiguiente en la ocupación de los receptores.

En segundo lugar, algunos de los efectos de la manipulación de los niveles de glucocorticoides aparecen tardíamente, es decir al cabo de varios días, razón por la cual es importante distinguir entre la administración de glucocorticoides en el agua de bebida a animales ADX y la administración mediante una inyección en un determinado momento del período experimental. Cabe asumir que los efectos de ambos tratamientos experimentales pueden ser diferentes en muchos casos y ello no representa una contradicción real.

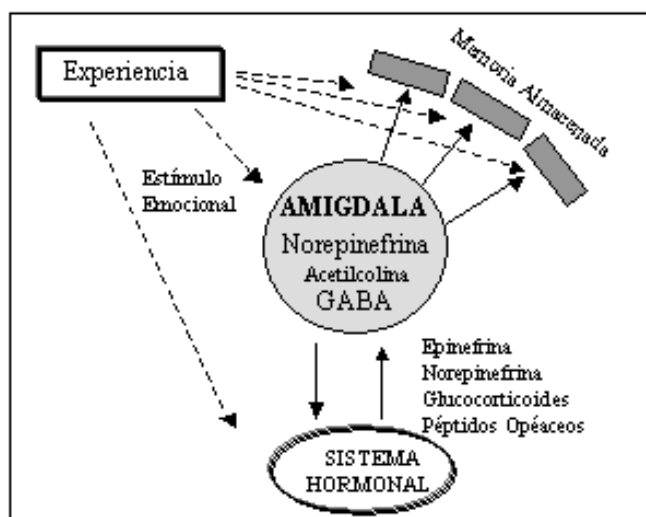
En tercer lugar, existe una importante controversia acerca del grado de penetración intracerebral de la administración sistémica de DEX. Si bien algunos estudios han demostrado una pobre penetración, debida a la existencia de un sistema que la expulsa activamente del SNC, también es cierto que existen muchos datos en la literatura que sugieren un efecto central de la DEX administrada periféricamente (ver revisión (234). Hasta el momento presente, no existe ninguna teoría acerca del mecanismo de acción de la DEX que explique esta discrepancia. No obstante, la dosis de DEX es un elemento fundamental a tener en cuenta, dado que la utilización de dosis muy altas hace más probable que la DEX alcance áreas críticas del SNC.

Centrándonos en los efectos de los glucocorticoides sobre el aprendizaje, es importante tener en cuenta que prácticamente todas las situaciones de aprendizaje conllevan algún grado de novedad o de situación aversiva, razón por la cual se presenta una activación del eje HPA y la consiguiente liberación de glucocorticoides. No es por ello sorprendente, que se considere que esta liberación de glucocorticoides podría de alguna manera estar implicada en el proceso de adquisición, consolidación o expresión

de la memoria y el aprendizaje. En general, se asume que los efectos de los glucocorticoides sobre la memoria y el aprendizaje siguen una U invertida (234), de tal manera que la ausencia de glucocorticoides o su bloqueo total empeora el aprendizaje y unos niveles muy elevados también. Esto parece ser así en tipos de aprendizaje de naturaleza muy diversa (39, 218, 235). Este hecho es de gran importancia para la interpretación de los datos experimentales en animales intactos, dado que el nivel de glucocorticoides en sangre sería la suma de la elevación causada por la propia situación estresante y de la administración exógena. En la mayoría de los artículos los niveles reales de glucocorticoides en sangre no se han estudiado, razón por la cuál es imposible saber en qué fase de la relación en U invertida estamos, aunque existe notables excepciones (219, 241). Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente comentados, comentaremos el posible papel de los glucocorticoides centrándonos en aquellos estudios que permiten una más adecuada interpretación de los resultados experimentales.

Una de las situaciones en la que más intensamente se ha estudiado el papel de los glucocorticoides es la memoria espacial, especialmente en la prueba del laberinto acuático. Se considera que la memoria espacial es un tipo de memoria declarativa y por lo tanto está especialmente relacionada con la formación hipocampal (88). No es por ello sorprendente que muchos experimentos utilizan como aproximación experimental la administración de antagonistas de los MR o GR a nivel de hipocampo. Los resultados indican que la ADX consistentemente empeora el aprendizaje espacial y que el bloqueo de los MR y el de los GR tienen efectos distintos sobre el aprendizaje (196). La importancia de los GR en este tipo de aprendizajes se ha puesto de manifiesto en ratones KO para el GR (197, 239) y en aquellos en los cuales una mutación del receptor impide la transcripción ligada a los GR (195). Datos recientes plantean la posibilidad de que el efecto positivo de los GR estaría localizado en una estructura diferente del hipocampo, dado que se ha observado que el bloqueo local de los GR en el hipocampo facilita más que inhibir el aprendizaje espacial (194). Tanto el papel positivo de los GR como la interacción sinérgica con los MR parecen confirmarse utilizando el aprendizaje en el laberinto acuático y en el laberinto en Y (40, 299).

Otra tarea donde está implicado el aprendizaje, aunque no es probable que el aprendizaje espacial sea el elemento más relevante es la prueba de la natación forzada. Aunque algunos resultados son difíciles de interpretar, parece haber coincidencia en que los animales ADX muestran un defecto en el recuerdo de una experiencia previa con el nado (110, 186, 287). El problema está en interpretar cuáles son los factores responsables de este defecto. Mientras que algunos resultados sugieren una implicación de los GR (287), otros resultados sugieren que el factor fundamental sería la dificultad de los animales ADX para mantener niveles adecuados de glucosa en una situación de nado forzado (111). Esta hipótesis podría explicar por qué bastan niveles basales de glucocorticoides (ADX+B) para que no haya ninguna deficiencia en el recuerdo de una exposición anterior (nuestros propios resultados y los de Mitchell) (186). Estos últimos autores observaron también que eran necesarios niveles adecuados de corticosterona tanto durante la primera exposición como durante la segunda.



**Figura 10:** Representación esquemática de la interacción entre los sistemas hormonales y la amígdala y su efecto sobre la modulación del almacenamiento en la memoria de estímulos emocionales. (Modificado de McGaugh).

La amígdala, que contiene GR y MR (29, 237), particularmente en los núcleos central y medial es una estructura muy implicada en el procesamiento de las emociones y en el control de las respuestas conductuales y fisiológicas que las acompañan. Parece por lo tanto, que los glucocorticoides podrían estar implicados en el procesamiento y la memoria acerca de las situaciones emocionales. El núcleo basolateral de la amígdala parece jugar un papel clave en la modulación de la adquisición y la consolidación de la memoria, especialmente en relación al papel de los glucocorticoides (237). La información procedente de un estímulo emocional converge en el núcleo lateral de la amígdala por vía tálamo-cortical o tálamo-amigdalar y éste, a su vez, mediante las conexiones intra-amigdalares, la trasmite al núcleo central, el cual controla varios sistemas efectores involucrados en la expresión de la respuesta emocional. Los axones procedentes de la amígdala central establece sinapsis con neuronas del núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), que a su vez proyecta al PVN, mediando algunas de las respuestas fisiológicas al miedo y la ansiedad (141, 233).

Existen dos teorías que discrepan acerca del papel concreto de la amígdala en la memoria emocional. Mientras que una de ellas sostiene que la amígdala no participaría en los procesos de aprendizaje directamente sino modulando la consolidación de la memoria en otras zonas del SNC (237), la otra teoría sostiene que es la propia amígdala el principal locus de la memoria emocional (140).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La caracterización de los efectos a largo plazo de una sola exposición a la IMO sobre la respuesta del eje HPA al mismo estímulo, que son cualitativamente similares a los observados tras la exposición repetida, plantea la posibilidad de que una parte de la adaptación observada podría ser consecuencia del tiempo transcurrido entre la primera y la última exposición al estrés y no de la exposición repetida al estímulo estresante. Para demostrar esta hipótesis, se han comparado los efectos de la exposición única o repetida a dos estímulos estresante de diferente intensidad: el nado forzado y la IMO.

Los glucocorticoides parecen claramente implicados en los procesos de memoria y aprendizaje y, particularmente en la consolidación de la memoria de situaciones emocionales. Es por lo tanto posible que los glucocorticoides liberados durante la primera exposición a la IMO jueguen un papel relevante en la inducción de los efectos a largo plazo del estrés sobre el eje HPA. Para demostrarlo, hemos utilizado diversas aproximaciones experimentales que manipulan los niveles circulantes de glucocorticoides durante la primera exposición a la IMO.

Datos previos de otros laboratorios indican que la exposición a algunas situaciones de estrés induce cambios conductuales a largo plazo que reflejan un incremento en los niveles de ansiedad. En algunos casos, estos efectos son revertidos por la administración de ansiolíticos antes de la exposición al estrés. Planteamos por tanto la hipótesis de que el miedo/ansiedad generado durante la primera exposición al estrés podría ser fundamental para la inducción de los efectos a largo plazo. Para demostrar esta hipótesis manipulamos los niveles de ansiedad mediante la administración de fármacos ansiogénicos o ansiolíticos antes de la primera exposición al estrés.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales utilizados en esta tesis han sido previamente aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona.

#### Animales

En el presente trabajo se emplearon como animales de experimentación ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley de 50-70 días (y pesos entre 250 y 300 g) al inicio de los experimentos. Los animales procedían del Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de luz (fotoperíodo de 7:00 h hasta la 19:00 h) y temperatura ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante al menos una semana previa al proceso experimental, al objeto de minimizar cualquier efecto residual a causa del transporte y facilitar además la habituación de los animales a las condiciones de estabulación de nuestro laboratorio. Todos los animales tuvieron libre acceso a comida (pienso para el mantenimiento de rata-ratón. A.04. Panlab) y agua de bebida.

Los animales fueron estabulados en cajas de polipropileno de 50 x 25 x 15 cm con un lecho de serrín (Interfauna Ibérica) en grupos de 2 ratas por caja. Las ratas se distribuyeron homogéneamente entre las cajas y entre los diferentes grupos experimentales en función de su peso corporal el mismo día de estabulación y de su fecha de nacimiento. Periódicamente se cambió el serrín y se controló, en función del diseño de cada experimento, la ingesta de sólidos y en algunos casos también la ingesta de bebida. Para obtener los valores de ingesta durante todo el período experimental se utilizó el siguiente protocolo: se midió la ingesta dos días antes de comenzar el tratamiento el día 1 para obtener los valores normales de referencia (se utilizó el valor medio) y los siguientes tres días para estudiar el efecto residual del tratamiento. Los valores obtenidos entre el día 7 y 8 fueron usados como valor de referencia antes del segundo estrés, en el que se estudiaron los 3 días posteriores. El mismo procedimiento se siguió para el control de la ingesta líquida. La ingesta fue siempre referida a g/rata/día (sólido o de bebida), considerando cada caja o cada botella como una unidad experimental para el análisis estadístico. El control de las variables mencionadas tuvo lugar siempre por la mañana aproximadamente a la misma hora (11 h -12 h) y se llevó a cabo tras la primera y tras la segunda exposición al estrés.

Los experimentos se realizaron siempre entre las 8:00 h y la 14:00 h para minimizar cualquier influencia circadiana. Si en algún caso se comenzó algunas horas antes de la fase de luz fue sólo para la administración de fármacos y el procedimiento se realizó en oscuridad y con luz roja. Las muestras de sangre siempre se obtuvieron a partir de las 8:30 h.

#### **Estímulos estresantes**

Los agentes estresantes fueron aplicados siempre en el laboratorio contiguo a los estabularios y a la sala de sacrificio, manteniendo toda la zona aislada del resto de laboratorios para no perturbar el desarrollo de los experimentos.

#### **Obtención de muestra de sangre por incisión en la cola (*tail nick*)**

Consistió en efectuar con el bisturí una pequeña incisión a 1-2 cm de distancia desde el extremo de la cola. La incisión fue de unos 2-3 mm de largo y una profundidad suficiente para seccionar la vena caudal y permitir la extracción de muestra de sangre. Está comprobado que el estímulo estresante provocado por el corte no altera los niveles basales de corticosterona siempre y cuando este procedimiento se realice en menos de 2 min. Este procedimiento puede considerarse un estímulo de carácter suave y componente mixta.

#### **Inmovilización en tabla (IMO)**

La IMO consistió en la restricción de los movimientos de la rata atando con una cinta adhesiva las cuatro extremidades a piezas metálicas adosadas a una tabla de madera. Los movimientos de la cabeza fueron restringidos mediante dos anillos metálicos alrededor del cuello. El procedimiento fue similar al descrito por Kventnansky and Mikulaj (133) y es un estímulo estresante considerado de gran intensidad y una componente fundamentalmente emocional (14, 204).

#### **Natación forzada (Prueba de Porsolt)**

El test de natación forzada fue utilizado como un agente estresante de intensidad media que tiene componentes físicas y emocionales y nos permite registrar la conducta de los animales (216) y también otras variables fisiológicas relevantes, como es el grado de hipotermia causado por el nado.

Las ratas se introducían en un tanque cilíndrico de metacrilato de 40 cm de altura y 20 cm de diámetro conteniendo agua a 25° C hasta un nivel de 22 cm. Cada animal fue expuesto al nado durante 20 min. Se utilizaron cuatro tanques idénticos y la conducta fue registrada simultáneamente en dos tanques mientras que los otros dos tanques eran limpiados y el agua cambiada. Los animales de cada tanque estaban separados entre sí por un separador de color negro. Cuando se registró la conducta se hizo durante los primeros 5 min de exposición al nado y mediante una videocámara. Se midieron con un cronómetro dos tipos de comportamiento: (1) el escape, que ocurre cuando el animal nada vigorosamente con sus cuatro miembros, las dos patas anteriores rompiendo la superficie del agua o golpeando el tanque o bien cuando el animal se introduce totalmente dentro del agua en actitud de buceo; (2) la inmovilidad, definida como el tiempo que el animal flota y permanece inmóvil en el agua, con la salvedad de leves movimientos para mantener la cabeza fuera del agua.

### **Fármacos**

El fármaco ansiogénico FG7142 (Research Biochemical Inc.) se administró a la dosis de 10 mg/kg, intraperitonealmente (*ip*) en un volumen de inyección de 2 ml/kg. El ansiolítico diazepam (generosamente donado por Laboratorios Almirall Prodes Farma) fue inyectado a la dosis de 2 mg/kg *ip* en el mismo volumen de inyección que el FG. Ambos fármacos fueron preparados por sonicación en vehículo (salino 0.9% + agar al 0.2%).

La síntesis de glucocorticoides se bloqueó mediante la administración de Metirapona (2-metil-1.2-di-3-piridil-1-propanona), un inhibidor enzimático que bloquea la enzima 11 $\beta$ -hidroxilasa por combinación con el cP450 en la mitocondria (298). El fármaco fue generosamente donado por Ciba-Geigy (Barcelona, España). La metirapona fue administrada subcutáneamente (*sc*) a la dosis de 200 mg/kg en un volumen de inyección de 1 ml/kg. El bloqueo funcional de los receptores de glucocorticoides se llevó a cabo mediante el antiglucocorticoide RU38486 (mifepristona Roussel-Uclaf, Francia), que se une a los receptores tipo II de glucocorticoides. Las dosis utilizadas fue de 100 mg /kg *sc* en el mismo volumen de inyección que el fármaco anterior. El vehículo utilizado para ambos fue propilenglicol al 40% en solución salina al 0.9%.

Se utilizó una preparación de ACTH de larga duración (Nuvacthén Dept, Novartis, Spain) administrada a la dosis de 100  $\mu$ g/kg intraperitonealmente (*ip*) en un volumen de inyección de 1 ml/kg.

### **Procedimientos quirúrgicos**

#### **Adrenalectomía (ADX)**

Los animales fueron anestesiados previamente a la intervención quirúrgica con el cóctel anestésico equitesina que contiene en su composición: hidrato cloral al 4.6%, pentobarbital sódico al 6%, MgSO<sub>4</sub> al 2.1%, propilenglicol al 42.8% y etanol al 10.8% diluido en solución salina. El volumen de inyección fue de 3.3 ml/kg *ip*. La intervención se llevo a cabo por aproximación dorsal bilateral (ADX). Primero se extrajo el pelo del animal en la zona a cortar, se realizó una incisión cutánea y muscular, se procedió a la remoción del paquete de grasa suprarrenal (dentro del cual las glándulas se encuentran inmersas) y a la extirpación de las mismas. Una vez extraídas se procedió a desinfectar y suturar la herida mediante cuatro grapas del N° 3. A los animales control se les simuló la ADX siguiendo el mismo procedimiento, exceptuando la extirpación de las glándulas (SHAM). Los animales fueron devueltos al estabulario y controlados diariamente durante una semana hasta su total recuperación. A los animales ADX les fue suministrada como bebida solución salina (NaCl 0,9 %) suplementada con corticosterona (ADX+B) para compensar la pérdida de electrolitos debida a la falta de mineralocorticoides y mantener niveles basales diurnos de corticosterona en sangre y mantener su ritmicidad circadiana. La solución de corticosterona (Sigma) se preparó diariamente para evitar su posible degradación, a la dosis de 25 mg/l en solución salina conteniendo 0.2% de etanol absoluto (Panreac).

#### **Obtención de muestras**

##### **Plasma**

La toma de muestra de sangre se llevó a cabo en los tiempos indicados en el protocolo de cada experimento. Se tomaron muestras de sangre por el procedimiento de incisión en la cola (*tail-nick*) descrito anteriormente. Se tomaron 300 µl de sangre en tubos capilares que contenían EDTA (Sarstedt, España) y eran mantenidos a 4° C hasta la finalización del experimento. Posteriormente, la sangre era centrifugada a 7000 rpm durante 20 min (4° C) para la obtención del plasma, que se distribuía en alícuotas para la determinación de corticosterona y ACTH. Todas las muestras fueron conservadas a -20° C hasta el momento del análisis.

##### **Determinación de la temperatura rectal**

A los animales que fueron sometidos a la prueba de natación forzada se les determinó la temperatura rectal mediante una sonda (Ellab Instruments, Copenhagen) al tiempo 0 (justo antes de introducirlos en los tanques) y al tiempo 20 min (justo al ser retirados de los mismos). El aparato fue calibrado a dos temperaturas y posteriormente introducida la sonda en el recto del animal en menos de 1 min. Para reducir el posible efecto del estrés asociado a la manipulación, la medida de la temperatura duraba 10 segundos. La sonda se limpiaba cada vez que se introducía en el animal y era calibrada cada dos mediciones.

#### **Análisis de Hormonas**

##### **Radioinmunoanálisis de ACTH**

Para la cuantificación de la ACTH de las muestras problemas se utilizó el protocolo descrito por England et al. con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio para la puesta a punto de la técnica.

Se utilizó tampón base (fosfato sódico 50 mM, EDTA disódico 25mM, Tritón X-100 al 0.1%) pH 7.4 preparado en agua MilliQ, al que se le añadió posteriormente BSA al 0.25%. El tampón de RIA estaba constituido por el tampón base (fosfato y EDTA) con BSA y se preparaba en el momento de su uso desechando todo el remanente sobrante después del análisis. El tampón de precipitación utilizado para separar la fracción libre de la ligada, era el tampón fosfato base al cual se añadió, el mismo día de la precipitación, segundo anticuerpo (Donkey anti-rabbit IgG, Chemicon) diluido 1/24 y suero normal de conejo al 1.2 %.

Para la preparación de la curva patrón se utilizó ACTH<sub>1-39</sub> de rata (Sigma) preparando un banco de diluciones a partir de un estándar de concentración conocida. Se utilizó como trazador <sup>125</sup>I-ACTH<sub>1-39</sub> (Amersham), con una actividad específica de 2000 µCi/mmol. A su llegada al laboratorio se reconstituyó con agua destilada y se distribuyó en alícuotas conservadas a -20° C. La dilución de trabajo se preparó diluyendo una alícuota de la hormona marcada con 10 ml de tampón de RIA, para obtener unas 2500 cpm en cada 100 µl de ACTH. La ACTH marcada se preparó siempre el mismo día del análisis, descartando toda la hormona sobrante. El primer

anticuerpo obtenido en conejo contra ACTH de rata (Rb-7) fue generosamente cedido por el Dr. W.C. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, USA). La dilución de trabajo utilizada del anticuerpo es 1:40.000 (10  $\mu$ l de la primera dilución en 8 ml de tampón de RIA).

El RIA de ACTH usa el método de incubación en no equilibrio, es decir el anticuerpo y la hormona marcada se añaden en días diferentes. El primer día del análisis se pipetearon 10, 20 o 40  $\mu$ l de muestra, en función de la concentración de ACTH esperada, y se colocaron en tubos de poliestileno de 3 ml. El volumen de muestra se completó con tampón de RIA hasta alcanzar un volumen de 100  $\mu$ l. La curva estándar (entre 20 y 2560 pg/ml) se preparó añadiendo 100  $\mu$ l de las distintas concentraciones. Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ l de tampón a los tubos 0, uniones inespecíficas (NSB, blanco de la muestra) y 200  $\mu$ l a los NBS de la curva. A continuación se agregaron 100  $\mu$ l de la dilución del anticuerpo a todos los tubos excepto a los NSB, a los cuales se le añadió 100  $\mu$ l del tampón. Todo el análisis se realizó manteniendo los tubos en baño de agua y hielo para evitar así la degradación de la ACTH. El primer período de incubación fue de 24 h en la cámara fría a 4° C. El segundo día se añadieron a todos los tubos 100  $\mu$ l de la ACTH marcada y se continuó la incubación por 24 h más en las mismas condiciones. Al día siguiente se añadieron 100  $\mu$ l del tampón de precipitado a todos los tubos excepto el total (que solo contenía hormona marcada) y se incubaron durante 4 h más. Finalizado el tiempo de incubación los tubos fueron centrifugados durante 40 min a 4000 rpm y 4° C para separar las fracciones libre y ligada. Tras eliminar el sobrenadante por aspiración, los tubos fueron colocados en el contador de radiaciones  $\gamma$  donde se contabilizaron las emisiones  $\gamma$  de cada tubo durante 5 min.

La representación gráfica y los cálculos de las concentraciones de las muestras problemas se realizó mediante el método del logit-log. La sensibilidad del RIA fue de 1 pg/tubo y el coeficiente de variación de la técnica fue aproximadamente de un 8 %.

### **Radioinmunoanálisis de corticosterona**

Los niveles de corticosterona plasmática fueron determinados según el procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio (135). El material de vidrio a utilizar fue lavado con ácido nítrico diluido al 10% (Merck) al menos durante 24 h y después enjuagado con abundante agua corriente, seguido con agua destilada y finalmente con agua MilliQ.

El tampón utilizado fue un tampón fosfato 0.01 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck), conteniendo NaCl al 0.9% (Panreac) y gelatina (Merck) al 0.1%, preparado en agua MilliQ a un pH final de 8.2. La gelatina permite incrementar la precisión del análisis, minimizando el efecto del blanco, aumentando la solubilidad de los esteroides y disminuyendo las interferencias. Este tampón puede ser utilizado al menos durante tres semanas siempre conservado a 4° C y protegido de la luz para evitar el crecimiento de microorganismos.

La corticosterona no marcada (fría) fue obtenida comercialmente (Merck) y diluida en etanol absoluto hasta obtener una dilución de 10  $\mu$ g/ml. Los estándares de mayor concentración, 1600 pg/ml fueron preparados en tampón de RIA a partir de la dilución

de 10 µg/ml y mantenidos a -20° C hasta el momento del RIA, cuando se preparó la curva estándar mediante un banco de diluciones en tampón de RIA.

La corticosterona marcada preparada fue (1,2,6,7)<sup>3</sup>H-corticosterona con una actividad específica de 72-93 Ci/mmol (Amersham) preparada en forma de disolución de 250 µCi/250 µl en tolueno:etanol absoluto 1/9 (v/v). A partir de la solución original se preparó una primera dilución de la hormona marcada con 25 µl más 0.5 ml de etanol absoluto que se conservaba a -20° C (primera hija). Para preparar la dilución de trabajo se diluyeron 20 µl de la primera hija con 10 ml de tampón para obtener unas 7000-8000 cpm en cada 100 µl de corticosterona colocada en el tubo de RIA.

El anticuerpo fue obtenido en conejo contra corticosterona 3-OCMO-tiroglobulina (Chemicon Internacional Inc.). Este anticuerpo no presenta reacciones cruzadas significativas con otros esteroides. La dilución de trabajo utilizada es 1:60.000 (100µl de la segunda dilución en 6 ml de tampón de RIA).

El RIA de corticosterona utiliza el método de incubación en equilibrio. En función de la concentración esperada se prepararon diluciones 1/2, 1/5 o 1/11. Se añadieron 10 µl de la dilución de las muestras problema y de los estándares en tubos de 5 ml de polipropileno. Se agregaron a todos los tubos (total (T), cero (0), uniones inespecíficas (NSB, NSB de la muestra y estándares) 200 µl de tampón, se agitaron en el vórtex y se incubaron a 70° C durante 30 min para desnaturalizar la transcortina presente en la muestra y que puede interferir con el análisis. Posteriormente se enfriaron en un baño de agua y hielo durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se añadían a todos los tubos 100 µl de corticosterona tritiada e inmediatamente 100 µl del anticuerpo excepto a los totales (T) y a los NBS a los que se le agregó 100 µl de tampón. Se agitaban todos los tubos y se incubaban siguiendo uno de los dos métodos: a) incubación corta, 30 min a 37° C seguido de 1 h a 4° C; b) incubación larga, 18-24 h a 4° C

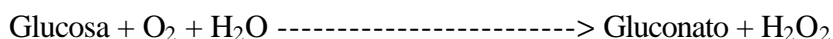
A partir de este paso todos los tubos fueron siempre mantenidos a 4° C en un baño de agua y hielo, procediéndose a separar la fracción de corticosterona unida de la libre, utilizando carbón activado (Merck). El carbón activado adsorbe moléculas de tamaño pequeño que puedan penetrar por sus poros y puede así captar la fracción libre de hormona. La suspensión de carbón activado se preparó a una concentración de 1 g/100 ml de tampón RIA y se mantuvo a 4° C en agitación previa (como mínimo 10 minutos antes de utilizarlo). Es una etapa muy crítica, ya que el tiempo máximo en el cual se debe poner el carbón a todos los tubos no debe superar los 2 min. Se añadieron a cada tubo 0.5 ml de la suspensión de carbón excepto al T (al cual se le agregó 0.5 ml de tampón) y se agitaron. Desde el momento que se agregó carbón al primer tubo hasta que se inició la centrifugación transcurrieron 11 min. Se centrifugó a 4000 rpm (1500 g) durante 15 min a 4° C. Finalizada la centrifugación se procedió rápidamente a decantar el contenido de los tubos y recoger el sobrenadante en viales de centelleo a los cuales se agregaron 3 ml de líquido de centelleo (Opti-phase Hi-safe, Wallac). Finalmente todos los tubos fueron agitados por inversión y contadas las emisiones β de cada vial en un contador β (Wallac) durante 5 min.

La representación gráfica y los cálculos de las concentraciones de las muestras problema se realizó mediante el método del logit-log. La sensibilidad del RIA fue de 10 pg/tubo y el coeficiente de variación de la técnica fue de aproximadamente del 8%.

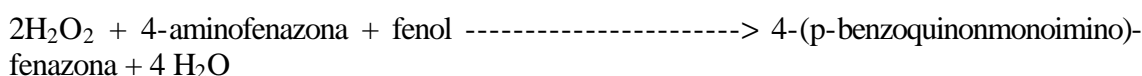
### **Determinación de glucosa plasmática**

La determinación de glucosa se realizó por el método colorimétrico en microplaca usando un kit comercial (Boehringer Mannheim). La técnica se basa en dos reacciones catalizadas enzimáticamente, de manera que se libera peróxido de hidrógeno de la reacción de oxidación de la glucosa y este peróxido reacciona con compuestos que dan una sustancia coloreada (cromógenos) en proporción a la cantidad de glucosa presente en la muestra.

#### **Glucosa oxidasa**



#### **Peroxidasa**



El procedimiento consistió en descongelar las muestras y el estándar de glucosa de concentración 800 mg/dl para la preparación de la recta patrón de rangos de concentraciones 50, 100, 200, 250 y 300 mg/dl en agua destilada. Se pipetearon 2 µl de las muestras y de los respectivos estándares en cada pocillo y se añadieron 125 µl del reactivo de glucosa con pipeta de repetición. La placa se agitó durante 5 seg y se incubó durante 15 min a 37° C y 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se leyeron las absorbancias en el lector de microplacas (Labsystems Multiskan Bichromatic) a 492 nm.

### **Análisis estadístico**

La estrategia de análisis utilizada fue la de aplicar pruebas paramétricas, dada su robustez, siempre y cuando los datos originales o los transformados logarítmicamente cumplieran los supuestos necesarios para la aplicación de dichas pruebas: especialmente el de la homogeneidad de varianzas. Cuando los datos no cumplieron con la homogeneidad de varianzas aún después de aplicar logaritmos se utilizó una prueba no paramétrica.

Al objeto de simplificar los análisis estadísticos del día 8, en algunos experimentos utilizamos como estrategia de análisis tanto para la ACTH como la corticosterona:

- a) No incluir los niveles basales de las hormonas en el análisis global, dado que en nuestros experimentos los niveles basales no cambian como consecuencia de la experiencia previa.
- b) En los experimentos con animales ADX se analizaron por separados los grupos SHAM y ADX+B debido a las grandes diferencias en la respuesta de la ACTH al estrés entre estos dos grupos y, en el caso de la corticosterona, la eliminación de la liberación de corticosterona en ratas ADX+B.
- c) Se analizaron por separados los grupos control y los estresados previamente para excluir algún posible efecto no específico del tratamiento farmacológico el día 1



sobre la respuesta a la IMO el día 8 que no estuviese relacionado con la experiencia previa de los animales con la IMO.

Todos los datos fueron analizados estadísticamente con el programa SPSS para Windows versión 9.0. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  SEM. La significación estadística de los efectos observados se analizó mediante el ANOVA de uno, dos y tres factores con medidas repetidas para el factor tiempo (niveles de la hormona). Las comparaciones *a posteriori* entre dos medias se llevaron a cabo usando la prueba t de Student y las comparaciones entre más de dos medias mediante la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK,  $p < 0.05$ ) si eran datos independientes o con la t de datos apareados en el caso de medidas repetidas. Las pruebas no paramétricas aplicadas fueron el ANOVA de un factor de Kruskal-Wallis (KW) seguida por comparaciones *a posteriori* con la prueba U de Mann-Whitney (U).

## **4. DISEÑOS EXPERIMENTALES Y RESULTADOS**

## **CAPITULO I**

**Características de los efectos a largo plazo de una sola exposición al estrés: comparación con los efectos del estrés crónico.**

## I a. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La exposición a estímulos estresantes agudos produce diferentes cambios comportamentales y fisiológicos, entre los cuales podemos destacar principalmente la activación del eje HPA. Las consecuencias de tales exposiciones han sido generalmente evaluadas en los animales adultos inmediatamente después de finalizada la exposición al estrés o a lo sumo durante unos pocos días posteriores a la exposición. Sin embargo, hay evidencias de que una única exposición a un estímulo estresante puede producir cambios a más largo plazo en el eje HPA. Hace unos años, Van Dijken et al (282) demostraron que una sola exposición al choque eléctrico causaba en ratas un incremento del miedo/ansiedad y una mayor respuesta del eje HPA frente a nuevos estímulos estresantes. Además, este efecto se acentuaba con el paso de los días (dos semanas). Otros estudios han demostrado una similar sensibilización del eje HPA después de la administración de interleukina-1 $\beta$  (250) o de la administración de anfetaminas (251). Además, estos y otros estímulos estresantes produjeron un incremento en el contenido de AVP en la capa externa de la eminencia media (248, 250, 282), cambios que generalmente habían sido observados después de la activación crónica del eje HPA (54, 57).

Sin embargo, algunos estímulos estresantes no parecen incrementar el contenido de AVP en la eminencia media (28, 248), y la respuesta del eje HPA a otros estímulos no han sido estudiado sistemáticamente. Por lo tanto, parece que los efectos a largo plazo del estrés sobre el eje HPA son dependiente de la naturaleza del estímulo particular utilizado. Cabe destacar que algunos estímulos estresantes utilizados en el laboratorio como la inmovilización en tubo (restraint) o el choque eléctrico, son situaciones que difícilmente los animales puedan encontrar en la naturaleza. Por lo tanto, es posible que los efectos a largo plazo de una exposición previa al estrés se restrinjan a una determinada clase de estímulos y no sea extensible a otras situaciones estresantes más naturales.

Dada la importancia de los efectos a largo plazo de una sola exposición al estrés, decidimos investigar este fenómeno en nuestro laboratorio. Sorprendentemente, observamos que una sola exposición a un estímulo estresante intenso como la inmovilización en plancha (IMO) reducía la respuesta central y periférica del eje HPA al mismo estrés días o semanas más tarde (171). Además, observamos que: (a) el efecto de una única exposición a la IMO era más evidente en la dinámica de recuperación del eje HPA que en la respuesta inicial al estrés; (b) el efecto de la exposición previa a la IMO era mayor cuanto mayor el tiempo transcurrido (días/semanas) entre las dos exposiciones; (c) los efectos a largo plazo de la inmovilización en tubo que es de menor intensidad que la IMO, eran menores que los de la IMO; (d) el efecto era específico para el estímulo aplicado previamente, dado que la respuesta del eje HPA al nado forzado (estímulo heterotípico) no se redujo.

La existencia de una cierta desensibilización del eje HPA tras una sola exposición a un estímulo estresante tiene implicaciones importantes respecto a la adaptación al estrés crónico, puesto que se asume que la reducción de las respuestas comportamentales y fisiológicas a un estrés particular cuando los animales son diariamente expuestos a la misma situación es consecuencia de la exposición repetida a la misma situación (13, 66, 134, 169, 170, 193, 270, 272), siguiendo las leyes de la habituación (48, 90, 191). En

base a nuestros resultados, cabía la posibilidad de que alguna de las consecuencias de la exposición repetida al estrés, incluyendo la reducción de la respuesta del eje HPA a la situación, pudiera deberse al paso del tiempo y no a la repetición de la situación. Por otro lado, las características de los efectos a largo plazo contradicen todas las leyes de la habituación (90), puesto que se ha observado que cuanto más intenso es el estímulo y mayor el intervalo entre las dos exposiciones, menor es la respuesta del eje HPA.

Por lo tanto, el objetivo del siguiente experimento ha sido comparar los efectos a largo plazo de una sola exposición al estrés (1 o 14 días antes de la última exposición) con la exposición crónica. Elegimos inicialmente el nado como estímulo estresante por varias razones: (i) es una situación estresante que las ratas pueden encontrar en la naturaleza; (ii) representa una combinación de estímulo emocional (la novedad, el agua) y fisiológico (ejercicio, temperatura); (iii) nos permite medir varias variables simultáneamente: el comportamiento, la actividad del eje HPA y otra variable fisiológica muy relevante como la temperatura rectal (TR).

## **I b. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS**

### **Experimento 1: Influencia de la exposición única o repetida al nado forzado sobre las respuestas comportamentales y fisiológicas al estrés.**

Se utilizaron 40 ratas que fueron asignadas al azar en 4 grupos experimentales (n=10): 1/ grupo control, que permaneció sin manipulación experimental hasta el día 15 del experimento, 2/ grupo sometido a estrés el día 1, 3/ grupo sometido a estrés el día 14 y 4/ grupo sometido a nado crónico. Los animales sometidos a estrés el día 1 fueron expuestos al siguiente protocolo experimental: toma de muestra de sangre en condiciones basales, medición de temperatura rectal (TR), 20 min de nado, nueva medición de la TR y toma de la segunda muestra de sangre. Los animales fueron devueltos al estabulario y se obtuvieron posteriormente muestras de sangre a los 30, 60 y 90 min después de haber finalizado el estrés (niveles post-estrés, o período de recuperación). El grupo sometido a estrés el día 14 fue expuesto al mismo protocolo experimental descrito anteriormente y el grupo de nado crónico fue expuesto diariamente al mismo protocolo durante 14 días consecutivos; pero en este caso, el procedimiento de toma de muestra de sangre fue simulado diariamente desde el día 2 al 14.

El día 15, todos los grupos, incluido el control, fueron expuestos al mismo protocolo de estrés y toma de muestras ya indicado para el día 1. Durante todo el período experimental la conducta de los animales fue registrada con una video cámara durante los primeros 5 min de exposición al nado.

### **Resultados**

La exposición crónica al nado no redujo ni la ingesta ni la ganancia de peso corporal (datos no mostrados), sugiriendo que en las condiciones usadas el nado no es

un estrés muy severo. La exposición de los animales a 20 min de nado en agua (25°C) provocó hipotermia. El grado de hipotermia causado por el nado fue seguido durante todo el período experimental en el grupo sometido a nado crónico (Figura 1A). Se observó que ésta se fue reduciendo progresivamente (desde  $-5.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$  hasta  $-1.1 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ) como reveló el ANOVA de un factor ( $p < 0.001$ ). Esta protección causada por la exposición repetida al nado no fue total, dado que el día 15 todavía se observó una hipotermia estadísticamente significativa (prueba-t student,  $p < 0.01$ ).

En la exposición aguda al nado de todos los grupos en el día 15, se observó un efecto significativo de la experiencia previa con el nado sobre el grado de hipotermia, revelado por el ANOVA de un factor ( $p < 0.001$ ). Comparaciones a posteriori (prueba SNK) revelaron que el grado de hipotermia de los animales expuestos el día 1 ó el 14 fue menor que en los controles, pero aún menor fue el observado en las ratas expuestas a nado crónico (Figura 1B).

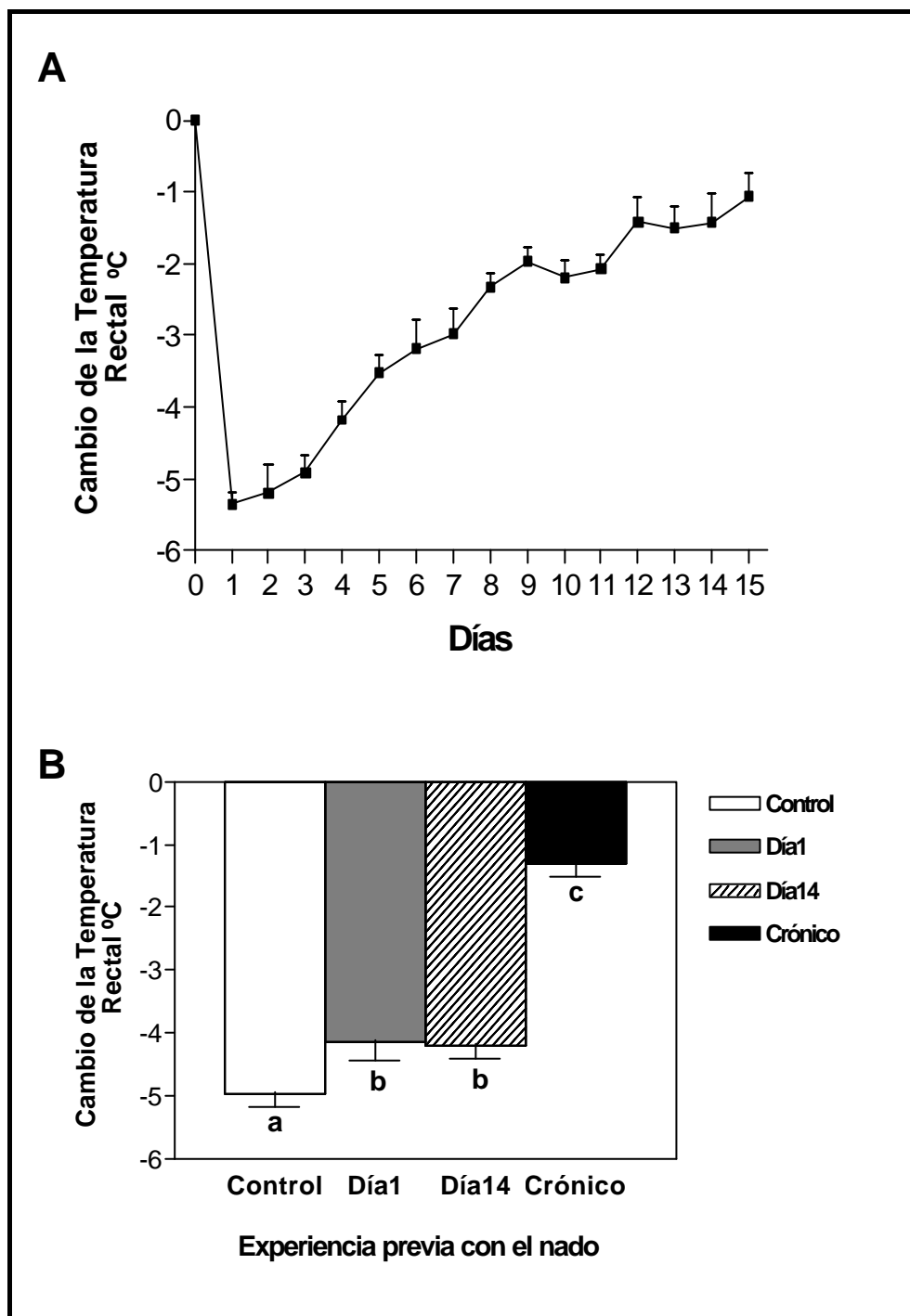
Como muestran las Figuras 2A y 2B, la exposición previa al nado alteró significativamente la conducta de los animales en el día 15. El ANOVA de un factor reveló un efecto significativo del factor experiencia previa sobre la inmovilidad ( $p < 0.001$ ) y el escape (Kruskal-Wallis,  $p < 0.001$ ). Comparaciones a posteriori revelaron que los efectos de la experiencia previa sobre el patrón de inmovilidad fueron similar a los observados con la hipotermia, con la diferencia de que los animales expuestos al nado el día 1 mostraron diferencias significativas respecto al control, pero no respecto al grupo nado crónico (prueba SNK). En cambio, la conducta de escape fue mayor en los animales control que en los otros tres grupos y más bajo aún en el grupo crónico (prueba U).

Los niveles basales de ACTH y corticosterona fueron analizados separadamente de la respuesta al estrés, debido a que los altos niveles de estas hormonas alcanzados tras el estrés podrían enmascarar posibles diferencias en condiciones basales. Los ANOVAs de un factor no revelan efectos significativos de la exposición previa al nado sobre los niveles de ACTH o de corticosterona.

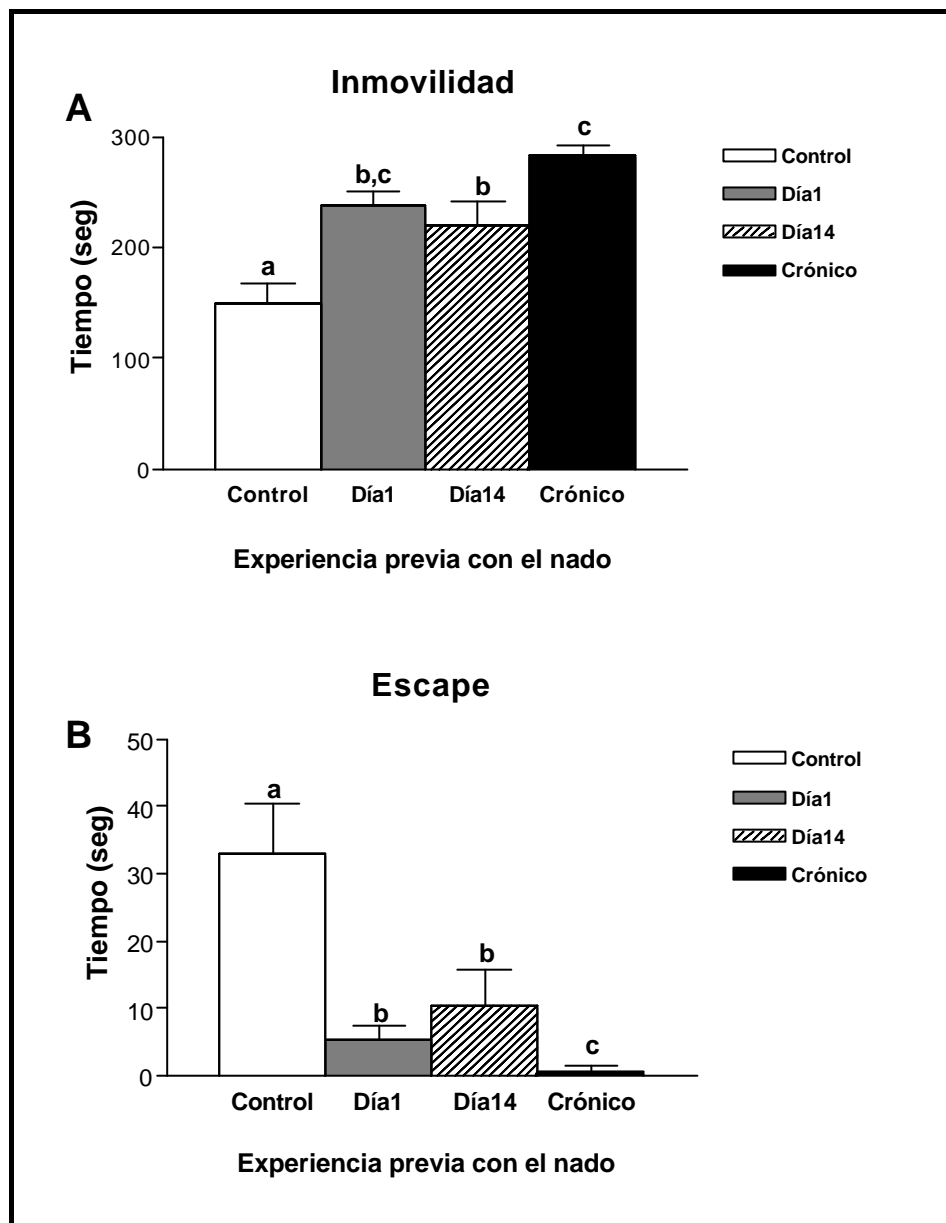
El efecto de la experiencia previa con el nado sobre la dinámica de respuesta de la ACTH, corticosterona y glucosa (incluyendo en este último caso los niveles basales) al nado en el día 15, se estudió mediante el ANOVA de dos factores. El factor experiencia previa con el nado (E) como el factor entre-sujeto y el factor tiempo de toma de muestra (T) como el factor intra-sujeto de medidas repetidas. El efecto de los factores y sus interacciones se muestran en la Tabla 1 para todas las variables.

Tabla 1: Respuesta al nado agudo del día 15: Resultado del ANOVA de dos factores.

<b>FACTOR</b>	<b>ACTH</b>	<b>CORTICOSTERONA</b>	<b>GLUCOSA</b>
Experiencia previa (E)	NS	$P < 0.02$	$P < 0.005$
Tiempo toma muestra (T)	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
E x T	NS	$P < 0.002$	$P < 0.001$



**FIGURA 1:** Efecto de la exposición crónica al nado durante 15 días (A) y de distintos protocolos de exposición previa al nado sobre los cambios en la TR en respuesta al nado del día 15. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM (n=10 por grupo). Los grupos marcados con letras diferentes son estadísticamente diferentes prueba (SNK).



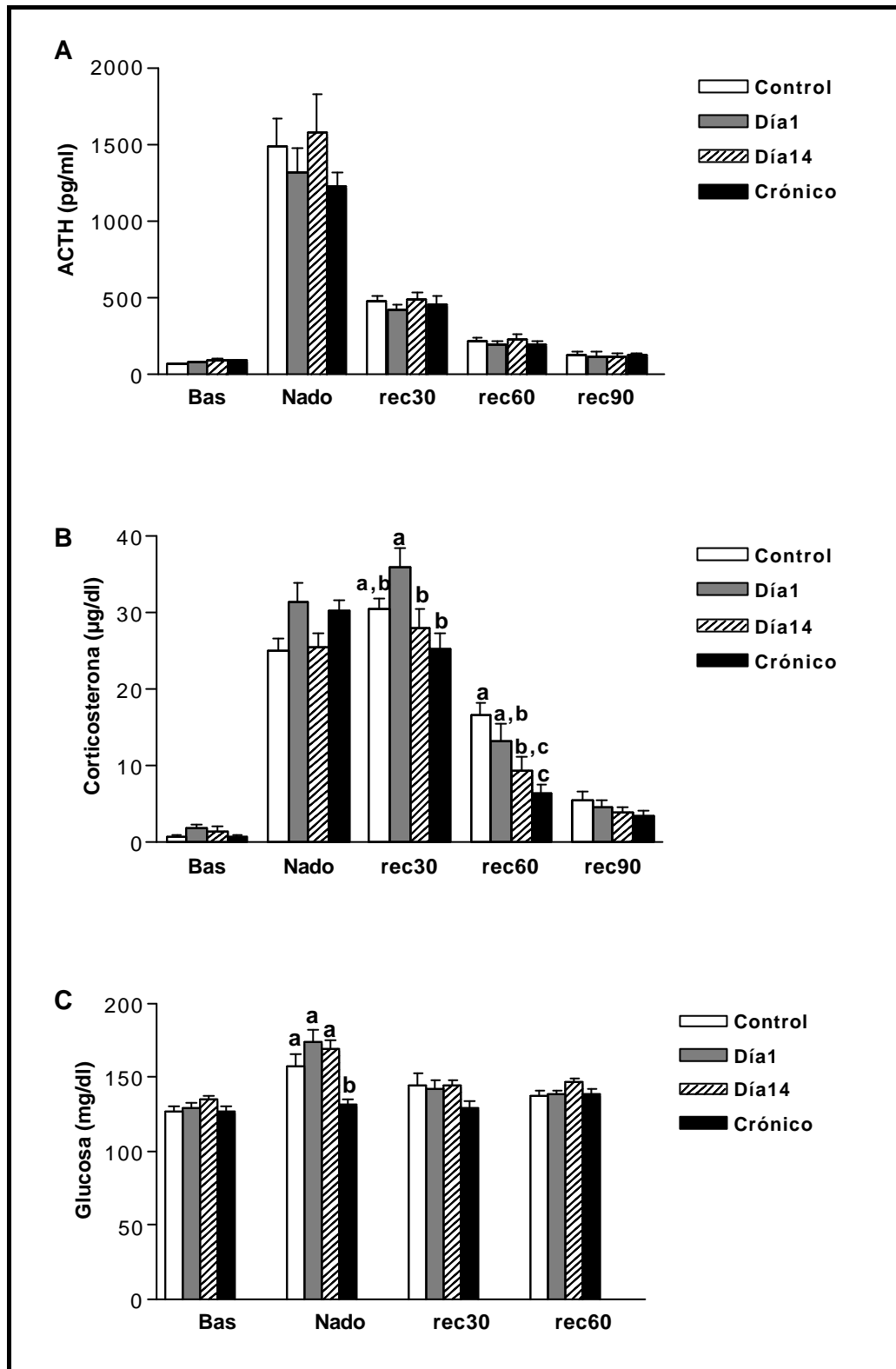
**FIGURA 2: Efecto de la experiencia previa con el nado sobre las conductas de inmovilidad (A) y escape (B) en respuesta al nado del día 15.** Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM (n=10 por grupo). Los grupos marcados con letras diferentes son estadísticamente diferentes (prueba SNK, inmovilidad o *U de Mann-Whitney*, escape).

En todos los casos se observó, como era de esperar, un efecto significativo del tiempo de toma de muestra que no comentaremos posteriormente. El ANOVA no reveló efecto alguno de la experiencia previa con el nado sobre los niveles de ACTH (Figura 3A). Puesto que el análisis de los datos de corticosterona reveló una interacción E x T, se estudió el efecto del factor experiencia previa sobre la respuesta de la corticosterona a cada uno de los tiempos de toma de muestra mediante el ANOVA de un factor, seguido a posteriori de la prueba SNK. Se observaron diferencias significativas entre los grupos en función de la experiencia previa justo después del nado ( $p < 0.05$ ), a los 30 min ( $p < 0.01$ ) y a los 60 min ( $p < 0.001$ ) post-nado (Figura 3B). Las comparaciones a



posteriori no alcanzaron significación estadística justo después del nado, pero a los 30 min post-nado los animales expuesto el día anterior mostraron mayores niveles de corticosterona que los expuestos 14 días antes o que el grupo de nado crónico (el grupo control mostró niveles intermedios de corticosterona). En el tiempo de 60 min post-nado, los animales estresados crónicamente mostraron niveles más bajos de corticosterona que el control o que los animales expuestos el día 1, mientras que los expuestos el día 14 al nado mostraron niveles intermedios.

En cuanto a los niveles circulantes de glucosa, no se analizó el tiempo de recuperación 90 min post-nado debido a la falta de muestra (Figura 3C). Los resultados del ANOVA de dos factores revelaron un efecto significativo de la experiencia previa con el nado y de la interacción E x T. Debido a la interacción E x T se compararon los grupos experimentales durante cada tiempo de toma de muestra mediante los ANOVAs de un factor, que revelaron un efecto significativo del factor experiencia previa justo después del nado ( $p < 0.001$ ) pero no a otros tiempos. La prueba SNK posterior reveló que el grupo de nado crónico mostraba niveles de glucosa más bajo que los otros tres grupos. De hecho, todos los grupos mostraron una respuesta significativa de la glucosa a la exposición aguda al nado excepto el grupo de nado crónico.



**FIGURA 3: Efecto de la experiencia previa con el nado sobre los niveles plasmático de ACTH (A), corticosterona (B) y glucosa (C) en respuesta al nado del día 15.** Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM (n=10 por grupo). Las muestras fueron tomadas antes de la exposición al nado (basal), al final del nado y a los 30, 60 y 90 min de finalizada la exposición. Dentro de cada período de toma de muestra, los grupos marcados con diferentes letras son estadísticamente diferentes (prueba SNK).

**Experimento 2: ¿Es la exposición repetida a la IMO necesaria para inducir adaptación del eje HPA? Influencias de factores adrenales.**

Puesto que el nado no causó efectos a largo plazo, decidimos utilizar la IMO y comparar los efectos de una sola exposición con la exposición repetida. Por otro lado, decidimos también estudiar el papel de los glucocorticoides liberados durante el estrés en la posible desensibilización del eje HPA causada por una exposición única o repetida a la IMO. Para ello, utilizamos animales adrenalectomizados y suplementados con corticosterona (ADX+B) en el agua de bebida al objeto de obtener un ritmo circadiano de corticosterona lo más parecido posible a la de los animales intactos.

Se utilizaron 32 ratas, de las cuales 18 fueron ADX y a 14 se les simuló la adrenalectomía (SHAM). Los animales fueron operados una semana antes de comenzar el experimento y mantenidos bajo control durante la etapa de recuperación. La mitad de los animales SHAM y ADX+B fueron expuestos diariamente a 20 min IMO durante 9 días y la otra mitad expuestos a 20 min de IMO solo los días 1 y 9 (efecto a largo plazo, grupo agudo), por lo que quedaron constituidos 4 grupos experimentales: 1/ SHAM crónico, 2/ SHAM agudo, 3/ ADX+B crónico y 4/ ADX+B agudo. Se tomaron muestra de sangre antes, justo después de la IMO y 90 min después de finalizada la IMO, los días 1, 2 y 9 en las ratas estresadas crónicamente y los días 1 y 9 en el resto de los animales. Por problemas en el estabulario, el estrés que correspondía al día 8 se realizó el día 9.

Los datos de la literatura indican que la ADX+B induce alteraciones en la memoria espacial medida con la prueba de Morris (196) o en la consolidación de la memoria en la prueba de natación forzada (205). Por lo tanto, la falta de liberación de glucocorticoides inducida por la IMO en ratas ADX+B podrían estar empeorando la memoria sobre la situación estresante en estos animales, impidiendo su recuerdo. Para descartar esta posibilidad, animales SHAM y ADX+B operados 24 días antes, fueron expuestos por primera vez a 20 min de nado y 8 días más tarde expuestos nuevamente a la misma situación durante 5 min. Se midió la conducta de escape, que es muy sensible a la experiencia previa con el nado (172).

## **Resultados**

La respuesta de la ACTH y la corticosterona a la IMO se analizó mediante el ANOVA de dos factores: días de exposición a la IMO (D) y tiempo de toma de muestra (T). Teniendo en cuenta la magnitud de los cambios inducidos por el estrés en los niveles de ACTH y de corticosterona, los niveles basales de estas hormonas no fueron incluidas en el análisis estadístico de los efectos de la experiencia previa con el estrés. Por la misma razón, los análisis de los niveles de ACTH fueron segmentados para el factor adrenalectomía, analizando por separado los dos grupos: SHAM y ADX+B.

Efecto de la exposición crónica a la IMONiveles basales

En los dos grupos expuestos crónicamente a la IMO, el efecto de los días de exposición sobre los niveles basales de las hormonas se estudió mediante el ANOVA de un factor para medidas repetidas. Los resultados revelaron un efecto significativo de la IMO crónica sobre los niveles de ACTH tanto en el grupo SHAM ( $p < 0.012$ ) como en el ADX+B ( $p < 0.002$ ). Respecto a los niveles de corticosterona del grupo SHAM también se observó un efecto significativo ( $p < 0.034$ ). Para conocer en que días concretos aparecían las diferencias, se hicieron comparaciones a posteriori mediante una *t* de datos apareados y los análisis revelaron que en ratas SHAM, la exposición repetida a la IMO dio lugar a niveles basales más altos de ACTH y corticosterona los días 2 y 9 comparados con el día 1 ( $p$  al menos  $< 0.05$ ); los niveles basales fueron:  $106 \pm 5$ ,  $190 \pm 23$  y  $188 \pm 23$  pg/ml para la ACTH;  $1.4 \pm 0.2$ ,  $3.0 \pm 0.5$  y  $3.8 \pm 1.4$   $\mu\text{g/dl}$  para la corticosterona. En animales ADX+B los niveles basales de ACTH fueron más altos que en las ratas SHAM, probablemente debido a la ausencia de liberación de corticosterona y por lo tanto, a la ausencia de la retroinhibición ejercida por los glucocorticoides. La *t* de datos apareados reveló que en ADX+B los niveles basales de ACTH el día 2 fueron mayores que los del día 1 ( $p < 0.001$ ), no observándose diferencias significativas entre el día 1 y el día 9; los niveles basales los días 1, 2 y 9 fueron  $424 \pm 126$ ,  $830 \pm 141$  y  $619 \pm 157$ , respectivamente.

Respuesta al estrés

Respecto a los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona en respuesta al estrés, (recuérdese que se han segmentado los análisis estadísticos de ratas SHAM y ADX+B), el resultado de los ANOVAs de dos factores se muestran en la tabla 2. El efecto del tiempo de toma de muestra fue siempre altamente significativo ( $p < 0.001$ ) y por lo tanto no será indicado ya en el texto.

Tabla 2: Efectos de la exposición crónica a la IMO: Resultado del ANOVA de dos factores, segmentado para los grupos SHAM y ADX+B.

FACTOR	ACTH		CORTICOSTERONA
	SHAM CRÓNICO	ADX+B CRÓNICO	SHAM CRÓNICO
Experiencia repetida con la IMO (D)	$p < 0.005$	$P < 0.005$	$p < 0.001$
Tiempo de toma de muestra (T)	$p < 0.001$	$P < 0.001$	$p < 0.001$
D x T	$p < 0.002$	NS	$p < 0.04$

En ratas SHAM, el ANOVA de los niveles de ACTH reveló un efecto significativo de la experiencia previa con la IMO y de la interacción D x T (Figura 4A). Los análisis a posteriori de la interacción D x T mostraron que el efecto de la experiencia repetida con la IMO sobre los niveles de ACTH se tradujo en una menor respuesta de la ACTH a la última IMO, siendo el efecto mayor durante la exposición al estrés ( $p < 0.003$ ) que en la fase de recuperación ( $p < 0.05$ ). El efecto se observó el día 9 cuando lo comparamos con el día 1

( $p < 0.025$ ), pero no el día 2. Respecto a los niveles de corticosterona, el ANOVA reveló un efecto significativo de la experiencia repetida con la IMO y de la interacción D x T (Figura 4B). Los análisis a posteriori de la interacción D x T mostraron que el efecto de la exposición repetida a la IMO se restringió a la fase de recuperación ( $p < 0.001$ ) y dio como resultado una progresiva disminución de la corticosterona en función al grado de experiencia previa que los animales tenían con la IMO: niveles más bajos el día 2 comparado con el día 1 ( $p = 0.054$ ) y en el día 9 comparado con los días 2 y 1 ( $p < 0.004$  y  $p < 0.002$ , respectivamente).

En ratas ADX+B, el ANOVA de los niveles de ACTH reveló un efecto de la experiencia previa pero no de la interacción D x T, debido a que los animales expuestos repetidamente a la IMO mostraron niveles de ACTH más bajo con los días de exposición (Figura 4C). El efecto de la experiencia previa fue observado el día 9 en el que se observó una menor respuesta comparada con la del día 1 ( $p < 0.02$ ) y la del día 2 ( $p < 0.003$ ). Respecto a los niveles de corticosterona en estos animales, los valores observados justo después de la IMO estuvieron alrededor de 3  $\mu\text{g/dl}$ , demostrando que la adrenalectomía fue completa y la suplementación con corticosterona fue adecuada.

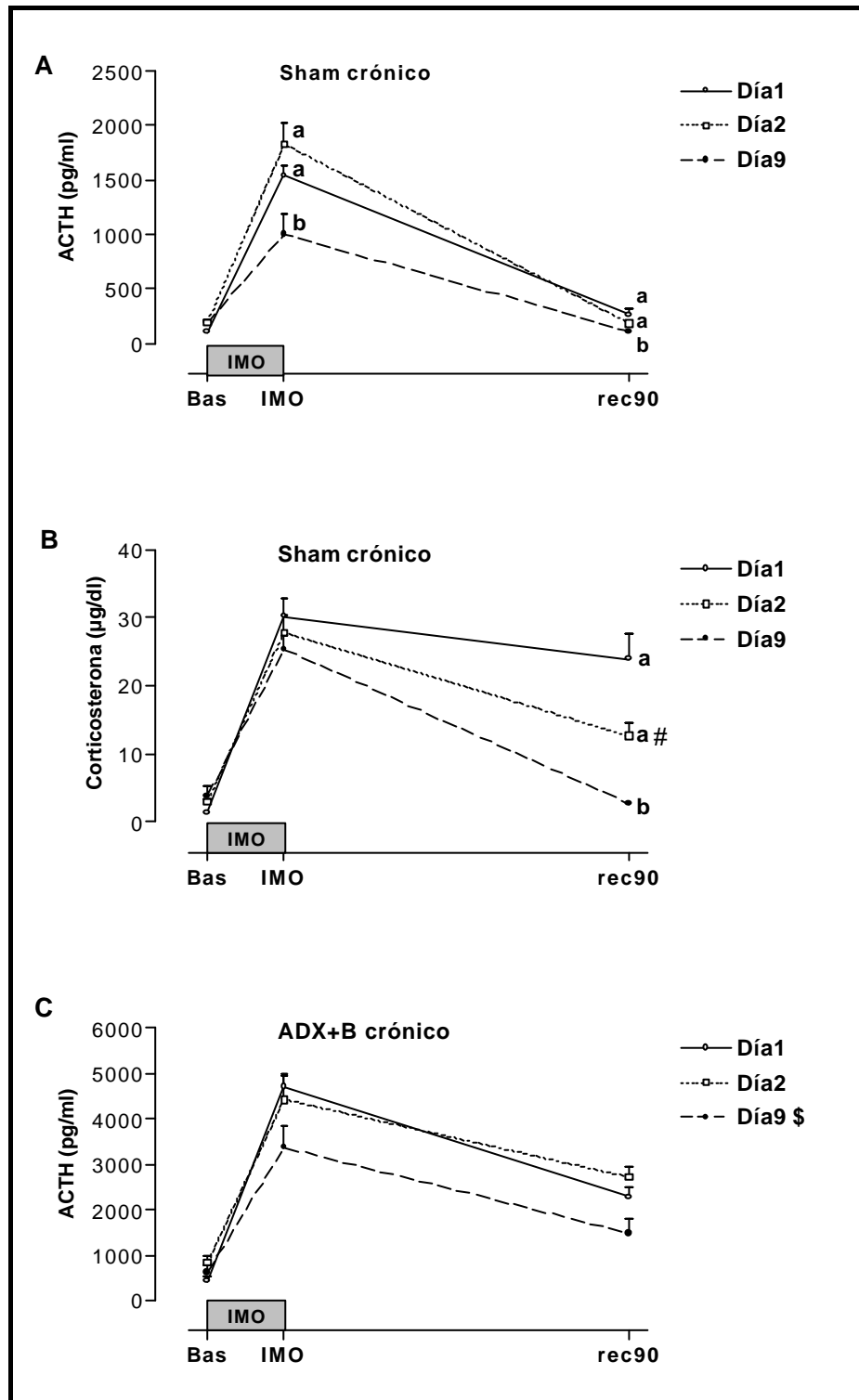
#### Efecto de la exposición aguda a la IMO

Los niveles basales de ACTH y corticosterona no diferían entre el día 1 y 9, ni en animales SHAM ni en ADX+B. Los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona en respuesta al estrés del día 9 en animales con una sola experiencia previa con la IMO fueron analizados con un ANOVA de dos factores. Los resultados del análisis estadístico se muestran en la Tabla 3.

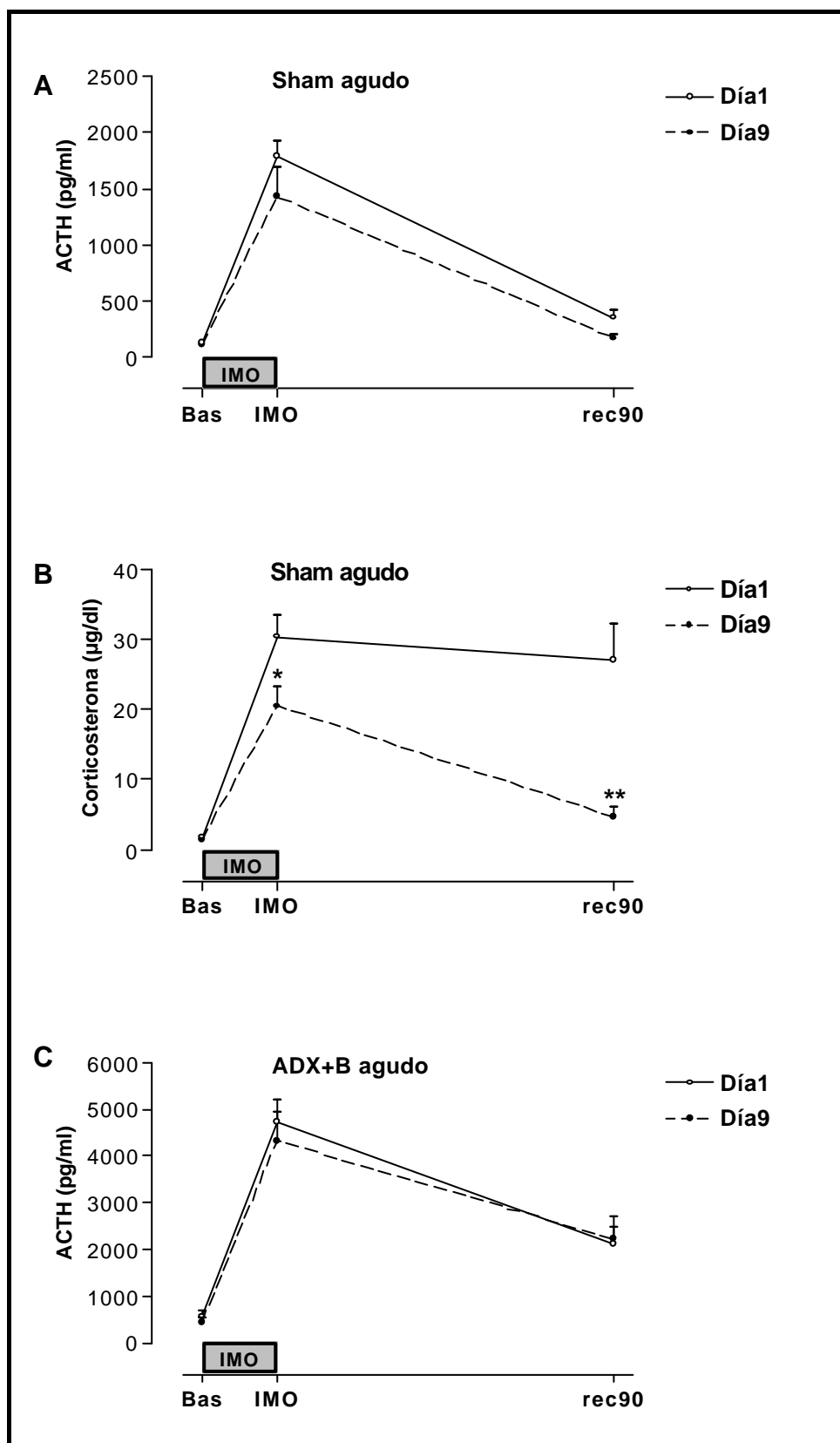
*Tabla 3:* Efecto de una sola exposición a la IMO el día 9 sobre la respuesta al mismo estrés: Resultados del ANOVA de dos factores (segmentado para los grupos SHAM y ADX+B).

<b>FACTOR</b>	<b>ACTH</b>		<b>CORTICOSTERONA</b>
	<b>SHAM</b>	<b>ADX+B</b>	<b>SHAM</b>
Experiencia previa con la IMO (E)	p= 0.051	NS	p< 0.003
Tiempo de toma de muestra (T)	p< 0.001	p<0.001	p<0.001
E x T	NS	NS	p<0.03

En ratas SHAM, el ANOVA de los niveles de ACTH reveló una reducción marginalmente significativa de la respuesta en los que tenían experiencia previa con la IMO, independientemente del tiempo de toma de muestra (Figura 5A). Respecto a los niveles de corticosterona (Figura 5B) el ANOVA de dos factores reveló un efecto significativo de los factores simples y de la interacción entre ambos. La razón de la interacción es que el efecto de la experiencia previa con la IMO fue mayor en la fase de recuperación ( $p < 0.003$ ) que durante la exposición al estrés ( $p < 0.03$ ). En ratas ADX+B no se observó efecto de la experiencia previa con la IMO sobre la respuesta de la ACTH a la segunda IMO (Figura 5C).



**FIGURA 4: Efecto de la exposición repetida a 20 min IMO sobre la respuestas de la ACTH y corticosterona al mismo estrés el día 9.** Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n=7-9$  por grupo). Las ratas fueron diariamente expuestas a 20 min de IMO y las muestras tomadas antes de la IMO, justo después de la IMO y 90 min después de finalizada la exposición al estrés. Dentro del mismo tiempo de toma de muestra los grupos marcados con letras diferentes difieren significativamente ( $p$  al menos 0.05). El símbolo # indica diferencia marginalmente significativa con el día 1; \$ representa el efecto global de la IMO del día 9 respecto a la del día 1 ( $p<0.02$ ) y 2 ( $p<0.003$ ).



**FIGURA 5: Efecto de una sola experiencia previa con la IMO (20 min) sobre la respuestas de la ACTH y corticosterona al mismo estrés el día 9.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=6-7). Las muestras se tomaron antes de la IMO, justo después de la IMO y 90 min después de finalizada la exposición al estrés; \*  $p < 0.03$ , \*\*  $P < 0.003$  vs día 1.

### Comparación del efecto de una sola experiencia previa con la IMO y de la experiencia repetida

Una sola experiencia previa con la IMO o la experiencia repetida afectó a la respuesta del eje HPA al mismo estrés en ratas SHAM. Para conocer si existían diferencias cuantitativas entre ambos tratamientos, la respuesta hormonal el último día del experimento se comparó entre ambos grupos de animales. Para ello, se utilizó un ANOVA de dos factores, con el grado de experiencia previa con la IMO como factor entre-sujeto y el tiempo de toma de muestra como factor intra-sujeto. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

*Tabla4:* Efecto de la experiencia previa *versus* la exposición repetida a la IMO: ANOVA de dos factores segmentado para los grupos SHAM y ADX+B.

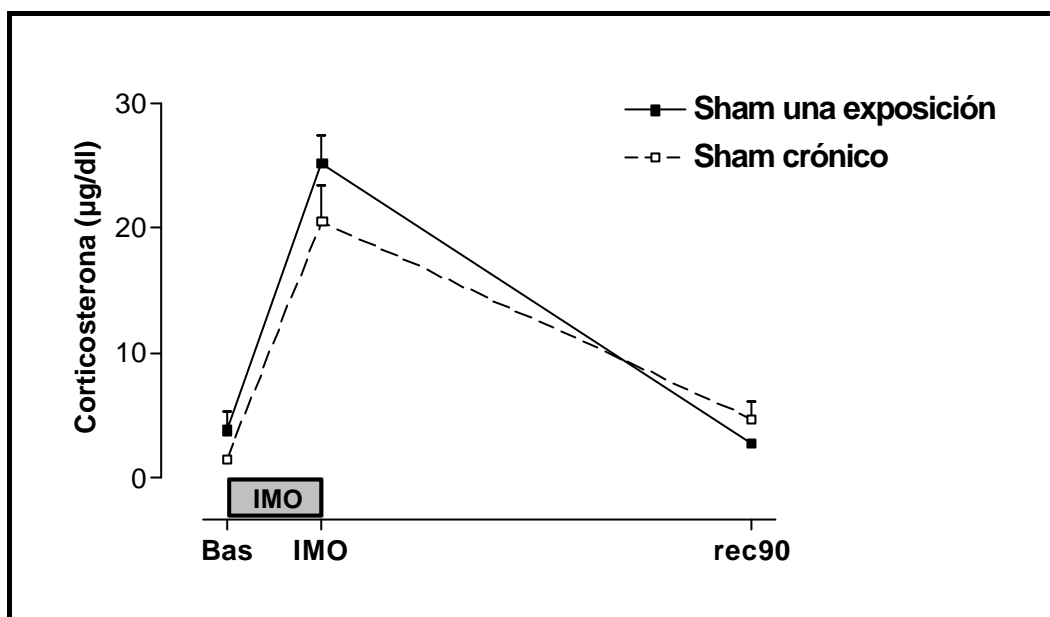
<b>FACTOR</b>	<b>ACTH</b>		<b>CORTICOSTERONA</b>
	<b>SHAM</b>	<b>ADX+B</b>	<b>SHAM</b>
Grado experiencia previa con la IMO (GE)	NS	NS	NS
Tiempo de toma de muestra (T)	p< 0.001	p<0.001	p<0.001
GE x T	NS	NS	p<0.04

En ratas SHAM, no se observaron diferencias significativas en el grado de experiencia con la IMO o en la interacción GE x T para los niveles de ACTH. Si embargo, en el caso de la corticosterona, la interacción entre los dos factores principales alcanzó una significación estadística, probablemente reflejando el hecho de que los niveles de corticosterona plasmática mostraron una más rápida caída desde el final de la IMO hasta los 90 min post-IMO en animales crónicos comparados con aquellos que tuvieron una sola exposición a la IMO (Figura 6). En ratas ADX+B no se observaron diferencias significativas en los niveles de ACTH en función del grado de experiencia con la IMO.

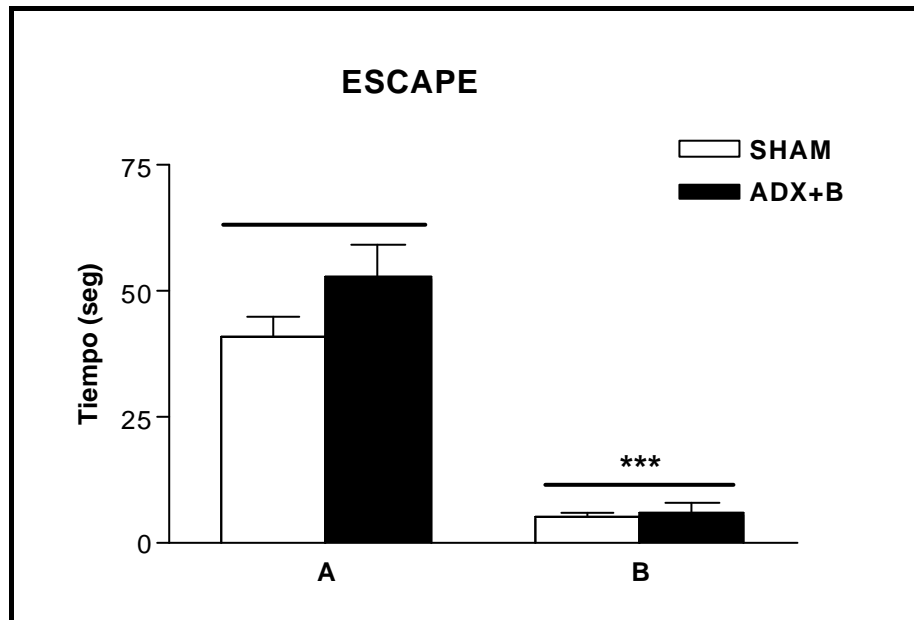
### Comportamiento en la prueba de Natación Forzada

El ANOVA de dos factores reveló un efecto significativo de la experiencia previa con el nado forzado sobre el tiempo de escape (p<0.001), pero no hubo un efecto de la adrenalectomía o de la interacción entre los factores (Figura 7).





**FIGURA 6:** Efecto de una sola experiencia previa con la IMO (20 min, día 1) comparada con la exposición repetida (20 min, diariamente durante 8 días) sobre la respuesta de la corticosterona al mismo estrés el día 9. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=6-7). Las muestras se tomaron antes de la IMO, justo después de la IMO y 90 min después de finalizada la exposición al estrés.



**FIGURA 7:** Efecto de una sola experiencia previa con el nado sobre el tiempo de escape en animales SHAM o ADX+B expuestos de nuevo al nado 8 días más tarde. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=6-7 por grupo). La letra A representa los animales que no fueron previamente expuesto al nado y la letra B representa aquellos previamente expuestos. El ANOVA reveló un efecto de la exposición previa al nado (\*\*\*) p<0.001), pero no de la adrenalectomía.

## I d. DISCUSIÓN

Está bien establecido que la exposición a un estímulo estresante que se repite diariamente provoca una reducción de la respuesta del eje HPA y de otras variables, y a este fenómeno se le conoce como adaptación. Nuestros resultados han demostrado también que una sola exposición a un estímulo estresante provoca una reducción en la respuesta del eje HPA que se acentúa con el tiempo transcurrido entre las dos exposiciones. Ambos hechos hacen difícil discernir entre los efectos a largo plazo de una sola exposición previa al estrés y los efectos de la exposición diaria. Por ello, comparamos los efectos de una sola exposición con los de una exposición crónica al estrés sobre la respuesta del eje HPA y de la de otras variables conductuales y fisiológicas.

### Experimento 1

En el primer experimento utilizamos el nado que permite valorar no sólo el eje HPA sino también otras variables como la hipotermia y la conducta. Los resultados obtenidos en este primer experimento sugieren que una experiencia única o repetida con el nado altera la respuesta de algunas variables comportamentales y fisiológicas al mismo estímulo, pero los efectos observados no poseen las características de los efectos a largo plazo de la IMO.

Nuestro laboratorio ha demostrado recientemente que una exposición previa a la IMO no modifica consistentemente la respuesta inicial del eje HPA al mismo estímulo cuando es aplicado semanas más tarde, pero mejora notablemente la recuperación de los niveles pre-estrés (171). También se ha observado que el efecto se incrementa con el tiempo transcurrido entre las dos exposiciones. Estos resultados sugieren que algunos de los cambios atribuidos a la exposición repetida al mismo estrés podrían ser al menos, en parte, debido al tiempo transcurrido entre la primera y última exposición al estrés. En base a estos resultados, decidimos estudiar esta posibilidad usando el nado, el cuál nos permite estudiar además del eje HPA un amplio rango de variables.

Pudimos observar, que la sensibilidad a la experiencia previa con el nado fue dependiente de la variable estudiada pero, en todos los casos, la exposición crónica al nado ejerció mayor efecto que una sola exposición previa. La exposición de las ratas a 20 min de nado provocó una clara hipotermia, de acuerdo con lo descrito previamente (215, 293). Cuando los animales fueron expuestos repetidamente al nado durante 15 días, se observó una progresiva reducción del grado de hipotermia con los días, sugiriendo que los animales habían desarrollado una adaptación fisiológica a la situación. Una reducción parcial de la hipotermia causada por la exposición diaria al restraint y al estrés por frío ha sido también descrita por Riccio et al.(228). Cuando se estudió la influencia de una sola experiencia previa con la situación, bien el día anterior o bien 14 días antes, se observó también una reducción de la hipotermia inducida por el nado en comparación con el grupo sin experiencia previa; sin embargo, la protección fue mucho menor la que se observó en el grupo crónico. Estos datos sugieren que la repetición del estímulo es necesaria para alcanzar una buena protección contra la hipotermia y que el efecto de la experiencia previa con la situación no se modifica en función del tiempo transcurrido entre las dos exposiciones al nado.

Conclusiones similares pueden alcanzarse cuando se estudia el comportamiento de los animales durante los primeros 5 min de nado. Las ratas expuestas crónicamente al nado mostraron, como era de esperar (125), niveles muy bajos de escape y niveles altos de inmovilidad en el día 15, comparadas con las ratas sin experiencia previa con el nado. Aquellos animales que habían tenido una experiencia con la situación (indistintamente el día 1 o el día 14) mostraron un patrón de respuesta semejante, pero menos acentuado que el grupo crónico. Aparentemente los animales que tuvieron una sola experiencia con el nado forzado 14 días antes retuvieron la información referente a la situación a la que habían sido expuestos en la misma proporción que los que habían sido expuestos 24 horas antes.

La hiperglucemia inducida por el nado no se modificó por una sola exposición previa al nado, pero fue menor en las ratas estresadas crónicamente, sugiriendo que la hiperglucemia es sensible a la exposición repetida al nado, pero no a una sola exposición. La sensibilidad de la glucosa al estrés repetido está en concordancia con datos publicados previamente, usando estímulos estresantes diferentes (17, 48, 169).

A pesar de los efectos de la experiencia previa con el nado sobre el comportamiento y la TR, y la del nado crónico sobre el comportamiento, la TR y la glucosa plasmática, no se observó un efecto significativo de la exposición única o repetida al nado sobre la respuesta de la ACTH. La falta de efecto fue evidente tanto en la respuesta al nado como en el período de recuperación después del estrés. Sin embargo, la respuesta de la corticosterona al nado sí se modificó por la experiencia previa con la situación, aunque sólo en el período de recuperación (post-nado): una sola exposición al nado aceleró la recuperación de los niveles normales de corticosterona plasmática después de finalizado el estrés, pero el efecto de la exposición crónica fue significativamente más rápido. La aparente disociación entre ACTH y corticosterona en ratas estresadas crónicamente será comentada más tarde.

La falta de adaptación de la respuesta de la ACTH al nado crónico no está de acuerdo con la adaptación observada con otros estímulos (13, 66, 87, 134, 193, 270, 272), aunque nuestros resultados concuerdan con los encontrados previamente por Young et al. (309) usando el nado. Teniendo en cuenta que hemos observado adaptación en términos de comportamiento, TR y glucosa plasmática, no son evidentes las razones exactas por las cuales no se ha encontrado adaptación de la ACTH. La respuesta fisiológica al nado tiene varias componentes (actividad muscular, defensa contra la hipotermia y estrés psicológico) y puede ser que la respuesta del eje HPA se mantenga por su papel fundamental en la adaptación fisiológica a algunos de los componentes físicos de este estímulo estresante particular. En cualquier caso, los resultados sugieren que la exposición repetida al mismo estímulo estresante no siempre conduce en una reducción de la respuesta de la ACTH a pesar de la alta sensibilidad de esta hormona a la repetición del estímulo usando otras muchas situaciones estresantes (170). Aunque existen resultados pocos consistentes en la literatura respecto a la adaptación al estrés repetido, algunas de estas inconsistencias sean probablemente debidas al aumento de la respuesta adrenocortical a la ACTH en ratas estresadas crónicamente (17, 211). Sin embargo, otros factores no bien caracterizados podrían estar involucrados en estas inconsistencias, como la naturaleza del estímulo (v.g. emocional versus físico), la existencia de diferencias individuales en la respuesta del eje HPA al estrés (84) y la intensidad de los estímulos (191, 211).

Nuestros resultados parecen mostrar una disociación parcial entre los niveles de ACTH y corticosterona plasmática, con una más rápida recuperación de la corticosterona después de finalizada la exposición al nado en ratas estresadas crónicamente, sin cambios aparentes en los niveles de ACTH. La dinámica de la ACTH y corticosterona plasmática son muy diferentes, habiéndose observado una marcada recuperación de los niveles de ACTH 30 min después de finalizada la exposición al nado. Es posible que la ausencia de diferencias entre las ratas sin experiencia previa y las estresadas crónicamente sea debida a que no se haya tomado muestra en el tiempo más apropiado. Sin embargo, la disociación entre ACTH y corticosterona no es un fenómeno nuevo y ha sido observada después de estímulos agudos prolongados (97, 232), después de estrés crónico (13, 174, 193) y, muy recientemente, en el período de recuperación, después de finalizada la exposición al estrés (85, 171). Tal disociación puede explicarse por la existencia de factores humorales o factores neurales que regulan la sensibilidad de la corteza adrenal a la ACTH (109, 200, 291).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que una sola exposición al nado tanto el día 1 como el día 14 modifica la respuesta comportamental y la hipotermia causada por la misma situación en la misma proporción, pero no modifica la respuesta de la glucosa ni la de la ACTH. La exposición repetida al nado reduce el comportamiento activo, la hipotermia y la glucosa plasmática en respuesta a la misma situación y levemente modifica la respuesta de la corticosterona (aumentando la recuperación en el período post-estrés) por un mecanismo independiente de la ACTH. Por lo tanto, podemos concluir que: (i) los niveles circulantes de ACTH no son siempre un buen índice de adaptación al estrés repetido; (ii) la adaptación al nado repetido puede ser solo parcialmente explicado por una sola exposición al nado; y (iii) una sola exposición al nado forzado no causó efectos a largo plazo en la respuesta del eje HPA a la mismo estrés.

## Experimento 2

Los resultados obtenidos en el experimento anterior indicaron claramente que el nado no es un estímulo capaz de inducir ni adaptación de la ACTH, ni efectos a largo plazo. Por ello, decidimos investigar la relación entre una sola exposición al estrés y la exposición repetida utilizando la IMO, que sabemos que sí produce efectos a largo plazo (171).

Al cambiar de estímulo estresante pudimos confirmar que efectivamente la IMO fue capaz de reducir la respuesta de la corticosterona en animales intactos cuando fueron nuevamente expuestos al mismo estímulo estresante 8 días más tarde. El efecto de la IMO previa sobre la corticosterona fue debido a una reducción parcial de la respuesta de la ACTH. Los efectos a largo plazo de una sola exposición a la IMO no se observaron en ratas a las que se les impidió la posibilidad de liberar corticosterona durante el estrés (ADX+B). Con la exposición repetida a la IMO durante 8 días, las ratas SHAM mostraron una reducción en la respuesta de la ACTH y corticosterona a la IMO aguda, siendo el comportamiento de la ACTH en las ratas ADX+B similar, aunque menos acentuado. Estos datos sugieren que la adaptación del eje HPA a la IMO repetida debe ser el resultado de dos procesos independientes: uno dependiente del tiempo transcurrido entre la primera y la última exposición, en el cual algún factor adrenal está críticamente implicado y otro factor dependiente de la repetición del estrés, pero independiente de la adrenal.

Aunque las ratas ADX+B mostraron niveles de corticosterona plasmática de aproximadamente 3 µg/dl, un poco por encima de los encontrados en las ratas SHAM (1-2 µg/dl), los niveles de ACTH pre-estrés fueron mayores en ratas ADX+B que en ratas SHAM. Es probable que estos altos niveles de ACTH reflejen una mayor respuesta al estrés asociado al procedimiento de toma de muestra, debido a la ausencia de la liberación normal de corticosterona, más que un incremento real en los niveles basales de ACTH. Esta hipótesis parece consecuente con la mayor respuesta de la ACTH a la IMO en ratas ADX+B comparadas con las ratas SHAM. La respuesta del eje HPA al estrés está restringida por la acción concertada de GR y MR (5, 107, 222, 225, 261). La contribución de los MR al freno de la activación del eje HPA por el estrés parece posible teniendo en cuenta que, en contra de lo que se asumía previamente, estos receptores probablemente necesiten niveles circulantes de alrededor a 5-10 µg/dl para ser ocupados completamente (64). Es posible que los mecanismos de retroinhibición rápido dependan de la ocupación total de los MR en el período inicial de exposición al estrés, y por lo tanto, se produzca una mayor respuesta de la ACTH a la IMO en ratas ADX+B. El lento regreso a los niveles pre-estrés de ratas ADX+B es evidentemente debido a la ausencia de ocupación de los MR y GR.

Se observó una reducción de la respuesta de la ACTH a la IMO del día 9 comparada con la respuesta del día 1 en ambos grupos de ratas, SHAM y ADX+B, cuando fueron expuestas diariamente al mismo estímulo estresante. Además, en las ratas SHAM se observó una rápida recuperación de los niveles de corticosterona después de la IMO crónica. Los resultados observados en las ratas SHAM están en concordancia con nuestros resultados previos usando un diseño experimental similar (13, 85) y confirman que la velocidad de recuperación de la corticosterona plasmática después del estrés es un buen marcador del grado de experiencia previa del animal con la situación estresante (85). La exposición de las ratas a la IMO del día 1 causó una reducción de la respuesta de la corticosterona en el día 2, sin cambios en la respuesta de la ACTH. Posiblemente esta disociación se deba parcialmente a la diferente dinámica de la ACTH y la corticosterona y a que solo estudiamos un tiempo de recuperación después de la IMO (90 min). Sin embargo, la disociación parcial entre ACTH y corticosterona fue observada también en el experimento anterior y podría ser atribuida a una influencia directa de la inervación adrenal (ver revisión (170)).

La reducción de los niveles de ACTH de ratas SHAM y ADX+B por efecto de la IMO repetida está en concordancia con los resultados obtenidos después de la administración repetida de LPS (endotoxina) en ratas intactas (34, 91, 184, 270) y también en ratas ADX implantadas con pellets subcutáneo de corticosterona (34). Todos estos resultados sugieren que la reducción de la respuesta del eje HPA al estrés repetido no está necesariamente unida a la liberación diaria de glucocorticoide o a la presencia de elevados niveles de glucocorticoides durante la última exposición. Sin embargo, Pinnock y Herbert (209) han demostrado recientemente que a diferencia de lo que ocurre en ratas intactas, los animales ADX mantenidos con bajas dosis de corticosterona en los *pellets* no mostraron adaptación de la respuesta del mRNA del CRH a la inmovilización en tubos, sugiriendo una participación parcial de los glucocorticoides a la adaptación al estrés repetido, al menos a nivel de expresión génica. En cualquier caso, nuestros resultados son compatibles con la existencia de señales inhibitorias (no ligadas a los glucocorticoides) hacia el PVN (79, 112), origen de factores hipotalámicos estimuladores de la ACTH como el CRH y la AVP. En apoyo de nuestra hipótesis, Feldman et al. (78) han encontrado evidencias de un efecto inhibitorio del hipocampo sobre la liberación de ACTH en ratas ADX.

La IMO y el LPS son estímulos estresantes de diferentes naturaleza y activan el eje HPA siguiendo mecanismos diferentes en el SNC (24, 76, 204, 229). Por lo tanto, la reducción de la respuesta del eje HPA al estrés repetido es una característica de los estímulos estresantes tanto emocionales como sistémicos. Puesto que la exposición repetida al estrés produce una reducción en un amplio rango de respuestas comportamentales y fisiológicas al mismo estímulo estresante (170), nosotros consideramos que esto es el reflejo de un proceso de adaptación de los organismos a la situación y, por tanto, la aceleración en la terminación de la respuesta del eje HPA al estrés podría ser un índice de este proceso de adaptación y el resultado de señales inhibitorias desde diferentes áreas límbicas hacia el PVN.

Cuando las ratas SHAM que tuvieron una sola experiencia previa con la IMO 8 días antes fueron nuevamente expuestas a la IMO (día 9), mostraron una menor respuesta de la ACTH al segundo estrés. El efecto de la experiencia previa con la IMO sobre la corticosterona plasmática fue particularmente evidente en el período de recuperación, pero no durante la exposición al estrés. Estos resultados están en concordancia con nuestros datos previos usando un diseño similar (171). Al contrario de lo observado en ratas intactas, no se observó un efecto de la experiencia previa con la IMO sobre la respuesta de la ACTH al mismo estrés en ratas ADX+B. La falta de efecto de la IMO previa sobre la respuesta al mismo estrés no fue probablemente debido a un defecto en la memoria acerca de la situación estresante en estas ratas, puesto que estos animales recordaron la experiencia previa con el nado igual que las ratas intactas. Así, cuando las ratas intactas y ADX+B fueron expuestas a 20 min de nado y 8 días después fueron nuevamente expuestas a la misma situación durante 5 min, la reducción en el tiempo de escape causado por la experiencia previa con el nado fue muy similar en ratas intactas y ADX+B, sugiriendo que ambos grupos recordaron de manera similar su única exposición al nado.

Nuestros resultados sugieren que las glándulas adrenales son necesarias para la inducción completa y/o la expresión de los efectos a largo plazo de la exposición previa con la IMO sobre el eje HPA. Puesto que las ratas ADX+B son incapaces de responder al estrés con una liberación de adrenalina o de glucocorticoides, algunas de estas hormonas podrían ser necesarias para inducir cambios fisiológicos a largo plazo que permitan a los animales poder enfrentarse mejor a la situación durante una nueva exposición. En apoyo de esta idea, se ha descrito una interacción positiva entre los efectos de la administración sistémica de glucocorticoides y adrenalina sobre la memoria de sucesos emocionales (181, 236). A nivel anatómico, la amígdala basolateral parece ser la estructura clave en la interacción de estas hormonas (220). En nuestro caso, no conviene descartar la posibilidad de que ni la adrenalina ni los glucocorticoides sean necesarios para disparar los cambios a largo plazo en la regulación del eje HPA, sino que se necesite una liberación normal de glucocorticoides durante la segunda exposición a la situación estresante para la expresión de los efectos a largo plazo sobre la recuperación post-estrés del eje HPA. Una tercera posibilidad es que los glucocorticoides puedan estar implicados en ambos procesos, la inducción y la expresión del fenómeno. Hasta el momento, no tenemos suficiente información para decidir entre estas tres posibilidades.

La existencia de efectos a largo plazo con una sola exposición a la IMO plantea la incógnita de si la adaptación observada de la ACTH en respuesta a la IMO crónica no sería consecuencia de una sola exposición a la situación. En ratas ADX+B la exposición repetida a la IMO parece ser necesaria para reducir la respuesta del eje HPA,

pero una exposición repetida no parece necesaria en las SHAM. En estas últimas, la comparación de la respuesta del eje HPA a la última exposición a la IMO en los animales que habían sido expuestos crónicamente y en los expuestos una sola vez no revelaron diferencias significativas en la respuesta de la ACTH y tan solo se observó una pequeña diferencia en la corticosterona. Por lo tanto, en nuestras condiciones, la adaptación de ratas SHAM a la IMO repetida podría ser explicada por el tiempo transcurrido entre la primera y la última exposición al estrés más que por la repetición diaria. El hecho de que, en las condiciones presentes, no parezca haber una contribución adicional de la exposición repetida a la IMO a la adaptación al mismo estímulo, más allá de la contribución de una sola exposición 7 días antes, no quiere decir que no pueda haberla en otras circunstancias. Aunque el efecto de una sola exposición a la IMO en el período de recuperación post-estrés de la ACTH y de la corticosterona se incrementa con el tiempo (171), este efecto alcanza probablemente en pocos días el efecto techo y, por lo tanto, la exposición repetida al estrés durante largos períodos de tiempo podría contribuir adicionalmente, a la adaptación. Además, la ausencia de las glándulas adrenales abolió los efectos a largo plazo de una sola exposición a la IMO, pero mantuvo intacta la adaptación al estrés repetido, lo que sugiere mecanismos diferentes en ambos casos.

La existencia de efectos a largo plazo con una sola exposición al estrés y su contribución a la adaptación del eje HPA cuestiona nuestra visión de los procesos cerebrales subyacentes a la adaptación al estrés crónico, que hasta el momento se consideraban que seguían las leyes de la habituación propuesta por Groves y Thompson (90). Desde este punto de vista, la adaptación debería estar positivamente relacionada con la frecuencia de las exposiciones al estrés y negativamente con el intervalo entre las exposiciones y la intensidad del estrés, lo que no es el caso de nuestros resultados. Para conocer las áreas implicadas en los efectos a largo plazo de una sola exposición al estrés sería necesario el estudio de los posibles cambios a nivel central en el procesamiento de la situación estresante como consecuencia de la experiencia previa. Para ello se podría utilizar la inducción de c-fos, un factor de transcripción considerado como un índice de activación neuronal, estrategia que se está utilizando en los estudios de adaptación al estrés crónico repetido (35, 177, 185).

Podemos concluir que la adaptación del eje HPA a la IMO repetida en ratas intactas podría ser explicada por el tiempo transcurrido entre la primera y la última exposición al estrés. Sin embargo, en ratas que no pueden liberar glucocorticoides durante el estrés (ADX+B), la repetición del estrés es necesaria para inducir adaptación de la respuesta de la ACTH. Los mecanismos y áreas centrales implicadas no están aún caracterizados.

## **CAPITULO II**

**¿Están los glucocorticoides involucrados en la inducción de los efectos a largo plazo de una sola exposición a la IMO sobre la respuesta del eje HPA?**



## II a. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior con animales ADX+B parecen sugerir un papel de los glucocorticoides en la inducción o expresión de los efectos a largo plazo de la IMO sobre el eje HPA. Puesto que asumimos que los efectos a largo plazo pueden ser el reflejo de un nuevo tipo de aprendizaje ligado a estímulos aversivos, el posible papel de los glucocorticoides en los efectos a largo plazo de la IMO podría venir determinado al menos por dos acciones de estas hormonas: su posible efecto ansiogénico y su modulación de la consolidación de la memoria de la situación estresante. Aunque se han descrito funciones independientes de la ACTH o péptidos relacionados y también del CRF y otras moléculas relacionadas con la regulación del eje HPA sobre la memoria y el aprendizaje (42, 63), la actividad central de la POMC o del CRF no parece modulada por los glucocorticoides, especialmente si se mantienen los niveles normales como es el caso de las ADX+B. Por lo tanto, parece que dentro de las hormonas del eje HPA, los glucocorticoides serían las más importantes en relación a la memoria y el aprendizaje, como ya vimos en la introducción general (capítulo 1.5).

Durante años ha existido una controversia acerca del papel ansiolítico o ansiogénico de la corticosterona. Sin embargo resultados recientes apoyan claramente la posibilidad de que los glucocorticoides tengan un efecto ansiogénico. Korte et al (1995) han observado un bloqueo de la ansiedad causada por el miedo condicionado, valorada por el comportamiento de los animales en un laberinto en cruz, mediante la administración intraventricular de antagonistas de los MR y GR (127). Posteriormente, Calvo et al (1998) han demostrado que la exposición a la inmovilización en tubos induce efectos ansiogénicos observables 24 h después de la exposición al estrés, siendo este efecto bloqueado por la inhibición de la síntesis de glucocorticoides con metirapona y mimetizado por la administración sistémica de corticosterona y DEX (31). El posible efecto ansiogénico de los glucocorticoides podría tener como lugar de acción la amígdala central (255).

Puesto que hemos asumido que los efectos a largo plazo de una sola exposición a la IMO pueden constituir un tipo especial de aprendizaje ligada a estímulos aversivos, una participación de los glucocorticoides parece probable. Esta posibilidad viene apoyada por la ausencia de efectos a largo plazo sobre la respuesta de la ACTH a una segunda exposición a la IMO observada en el capítulo I. Sin embargo, la ausencia de la adrenal implica también la ausencia de otros factores (v.g. adrenalina, encefalinas) que podrían explicar el bloqueo de los efectos a largo plazo. Por otro lado, en animales ADX+B no hay liberación de glucocorticoides ni durante la primera ni durante la segunda exposición a la IMO, razón por la cual la ausencia de efecto podría deberse a una participación de los glucocorticoides en la expresión de los efectos a largo plazo sobre el eje HPA. Por todo ello, en este capítulo decimos investigar el posible papel de los glucocorticoides en los efectos a largo plazo de la IMO utilizando diversas aproximaciones experimentales.

## II b. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

### **Experimento 3: Papel de los glucocorticoides en los efectos a largo plazo de una sola exposición a la IMO sobre el eje HPA.**

En este experimento con animales adrenalectomizados quisimos confirmar la ausencia de efectos a largo plazo de una sola exposición al estrés en animales ADX+B. Se utilizaron 44 ratas, 16 de las cuales fueron SHAM y 18 ADX+B. Al igual que en el experimento anterior, se dejó los animales una semana para su recuperación después de la adrenalectomía. Las ratas fueron asignadas, en función de los tratamientos del día 1, a los siguientes grupos,: 1/ SHAM-control, 2/ SHAM-IMO, 3/ ADX+B-control y 4/ ADX+B- IMO. El día 1 se estresaron sólo los grupos 2 y 4, tomándose muestras de sangre justo antes y después de justo de 20 min de IMO y a los 45 y 90 min post-IMO. Los grupos 1 y 3 (controles) permanecieron en el estabulario sin ninguna manipulación experimental. El día 8 todos los animales fueron expuestos a la IMO durante 20 min y a la toma de muestras de sangre siguiendo el protocolo del día 1. Se controló la ingesta de comida y bebida siguiendo el protocolo descrito en material y métodos.

## **Resultados**

### **Respuesta a la primera IMO**

Los cambios en la ingesta de comida y bebida se analizaron mediante un ANOVA de tres factores, con la exposición a la IMO y la ADX+B como factores entre-sujeto y los días después del inicio del tratamiento como factor intra-sujeto (medidas repetidas). Los resultados del análisis estadístico de la ingesta de comida se muestran en la Tabla 5 y los de la ingesta de bebida en la Tabla 6.

En la ingesta de comida, el análisis de los resultados de los efectos de la exposición a la IMO el día 1 (Figura 8) reveló una marcada disminución de la ingesta, sobre todo en las 24 horas siguientes a la exposición al estrés. Este efecto anoréxico fue similar en el grupo SHAM y en las ADX+B, por lo que la adrenalectomía no afectó a los cambios en la ingesta. Dado que se observó un efecto marginalmente significativo de la interacción de segundo orden I x A x D ( $p=0.06$ ), se realizaron análisis a posteriori, descartando las interacciones de primer orden. Los resultados revelaron un efecto significativo de la IMO sobre la ingesta para los grupos SHAM y ADX+B ( $p<0.001$  en ambos casos).

Tabla 5: Efecto de la exposición a la IMO y de la ADX+B sobre los cambios en la ingesta de comida: Resultados del ANOVA de tres factores.

<b>FACTOR</b>	<b>IMO DIA 1</b>	<b>IMO DIA 8</b>
IMO (I)	P<0.001	P<0.015
ADX+B (A)	NS	NS
Días (D)	P<0.001	P<0.001
I x A	NS	NS
I x D	P<0.001	P<0.001
A x D	NS	NS
I x A x D	NS = 0.06	NS

Este descenso fue significativo los 2 días posteriores a la IMO en ambos grupos,  $p < 0.001$ ), aunque con una recuperación progresiva. La interacción es debida a que la recuperación del nivel normal de ingesta fue algo más rápida en ADX+B que en SHAM, de tal manera que estas últimas aún no habían recuperado la ingesta 3 días después de la IMO ( $p = 0.062$  vs SHAM controles), mientras que las ADX+B sí.

Tabla 6: Efecto de la exposición a la IMO y la ADX+B sobre los cambios en la ingesta de bebida: Resultados del ANOVA de tres factores:

<b>FACTOR</b>	<b>IMO DIA 1</b>	<b>IMO DIA 8</b>
IMO (I)	NS	NS
ADX+B (A)	P<0.001	P<0.001
Días (D)	P<0.001	P<0.001
I x A	NS	NS
I x D	P<0.001	NS
A x D	P<0.001	P<0.008
I x A x D	NS = 0.06	NS

Respecto a la ingesta de salino, pudimos observar un efecto muy significativo de la ADX+B que incrementó mucho la ingesta de solución salina (Figura 8). En la ingesta de bebida tras la IMO del día 1 también se observó un efecto marginalmente significativo de la interacción de segundo orden I x A x D ( $p = 0.06$ ) y se realizaron análisis a posteriori de la interacción de los tres factores descartando las interacciones de primer orden. Los análisis revelaron una interacción I x D sólo en el grupo ADX+B ( $p < 0.001$ ), no observándose ningún efecto en los animales SHAM. Esta interacción refleja el hecho de que la IMO redujo el consumo de líquido sólo en el grupo ADX+B pero no en el SHAM. El descenso de ingesta de solución salina en ADX+B fue muy significativo en los días 2 ( $p < 0.001$ ) y 3 ( $p < 0.005$ ), no observándose efecto en el día 4.

La respuesta de la ACTH a la IMO del día 1 en ratas SHAM y ADX+B fue analizada usando un ANOVA de dos factores, con la adrenalectomía (ADX+B) como

factor entre-sujeto y el tiempo de toma de muestra (T) como factor intra-sujeto. Los resultados del ANOVA revelaron un efecto significativo de ADX+B ( $p < 0.001$ ), del tiempo de toma de muestra (T) ( $p < 0.001$ ) y de la interacción T x ADX+B ( $p < 0.001$ ). Comparaciones a posteriori para cada tiempo revelaron que no hubo un incremento significativo de los niveles basales de ACTH en ratas ADX+B comparadas con las ratas SHAM, pero sí se observaron niveles más altos de ACTH después de finalizado el estrés y en los dos tiempos post-IMO en las ADX+B comparadas con las SHAM ( $p < 0.001$  en todos los casos) (Figura 9A).

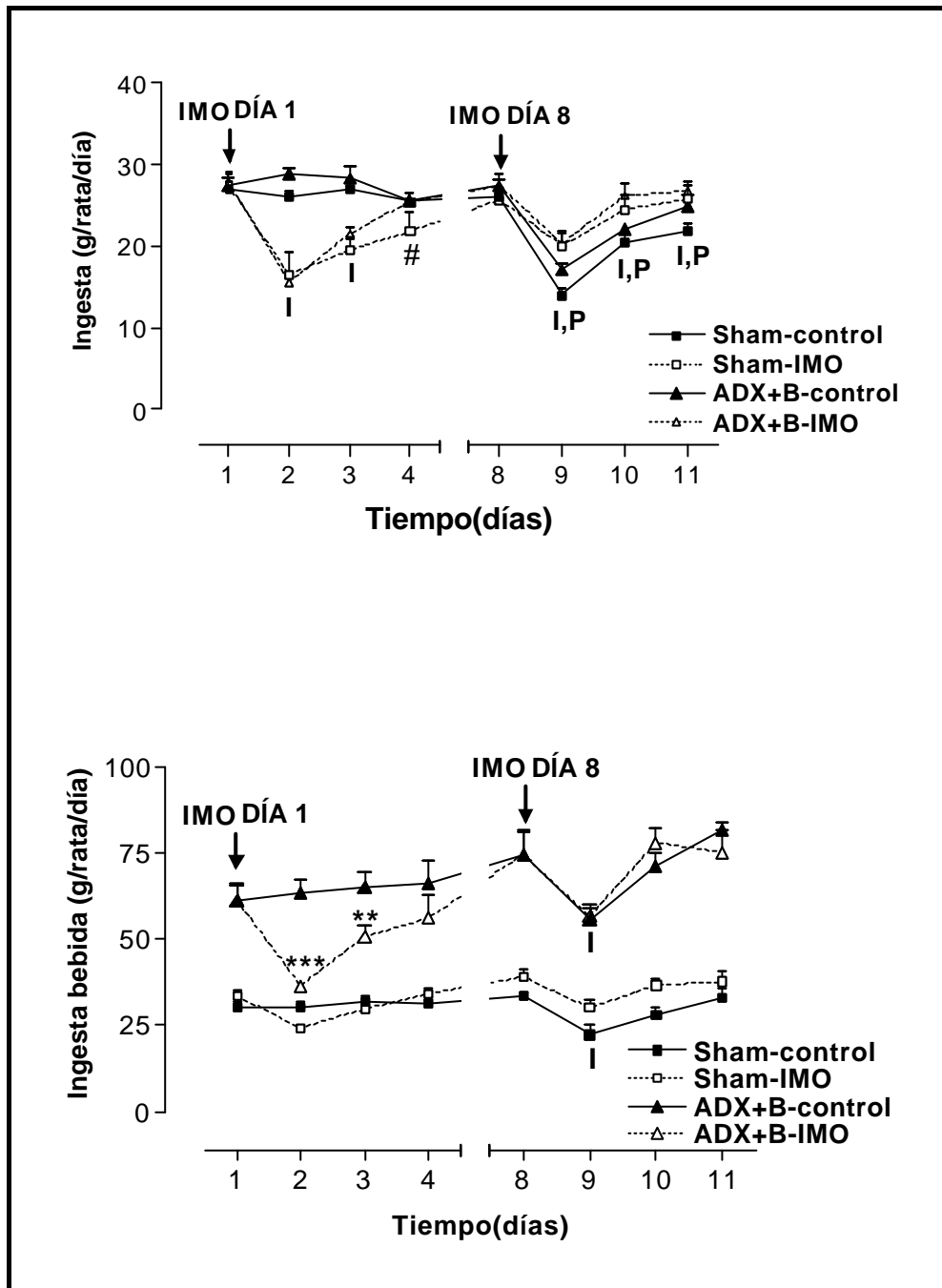
Para los niveles de corticosterona de las ratas SHAM (Figura 9B), el ANOVA de un factor reveló un efecto significativo del tiempo de toma de muestra ( $p < 0.001$ ). Se observaron altos niveles de corticosterona justo después de finalizado el estrés que se mantuvieron incluso 90 min después de finalizada la IMO. En ratas ADX+B los niveles plasmático de corticosterona después de 20 min de IMO fueron  $1.5 \pm 0.2 \mu\text{g/dl}$ , lo que demuestra que mantuvieron sus niveles basales normales de corticosterona y no respondieron al estrés.

#### Respuesta a la segunda IMO (día 8)

Los resultados de la ingesta de comida se analizaron mediante un ANOVA de tres factores cuyos resultados se muestran en la Tabla 5. El análisis no reveló efecto alguno de la adrenalectomía pero sí un efecto significativo de la experiencia previa con la IMO ( $p < 0.015$ ) y de la interacción I x D ( $p < 0.001$ ). Los análisis a posteriori revelaron que los animales que no tenían experiencia previa con la IMO el día 1, mostraron un mayor grado de anorexia (Figura 8). El efecto protector de la experiencia previa con la IMO fue independiente de si eran SHAM o ADX+B y se observó durante los tres días siguientes a la segunda exposición a la IMO ( $p$  al menos  $< 0.05$ ).

Respecto a la ingesta de bebida (Figura 8) no se observó efecto significativo de la experiencia previa con la IMO, pero sí de la adrenalectomía ( $p < 0.001$ ) y de la interacción A x D ( $p < 0.008$ ). Los análisis a posteriori revelaron que tanto los animales ADX+B como los SHAM disminuyeron la ingesta de bebida después de la segunda IMO ( $p < 0.001$  y  $p < 0.006$ , respectivamente), aunque el efecto fue mayor en las ADX+B. El efecto inhibitor sólo se observó en las 24 h siguientes a la segunda IMO.

Para simplificar el análisis estadístico de los resultados de los cambios hormonales el día 8, seguimos la siguiente estrategia de análisis: (a) no fueron incluidos los niveles basales de ACTH y corticosterona en los análisis, dado que nunca cambian como consecuencia de la exposición previa a la IMO; (b) segmentamos los análisis de ratas SHAM y ADX+B debido a las grandes diferencias en la respuesta de la ACTH al estrés entre estos dos grupos y a la ausencia de liberación de corticosterona inducida por el estrés en las ADX+B.



**FIGURA 8: Efecto de la IMO y de la ADX+B sobre la ingesta sólida y líquida.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de g/rata/día. Las cajas y las botellas fueron consideradas como una unidad para el análisis estadístico (n=4-5 por grupo). Las flechas indican los días de exposición a la IMO. El día 1 las ratas de los grupos con IMO previa fueron sujetas a la toma de muestra de sangre y a 20 min de IMO mientras que a las controles no se les hizo nada. El día 8 todos los animales fueron expuestos a 20 min de IMO siguiendo el mismo protocolo de toma de muestra que el día 1. El análisis estadístico reveló un descenso altamente significativo de la ingesta de comida como consecuencia de la IMO del día 1 tanto en SHAM como en ADX+B (I,  $p < 0.001$ ); en el día 4 sólo las SHAM mostraban aún un descenso marginalmente significativo (#). La reducción de la ingesta de salino se observó sólo en las ADX+B durante los dos días posteriores a la primera IMO (\*\* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.005$ , respectivamente). En el día 8 el ANOVA de la ingesta de comida reveló efecto de la IMO previa en el día 1 (P,  $p < 0.001$ ) y de la última IMO (I,  $p < 0.001$ ), sin interacción entre ambos. El efecto de ambos factores se observó en cada uno de los 3 días posteriores a la última IMO. En cuanto a la ingesta de salino, se observó un efecto de la última IMO tanto en ADX+B como en SHAM centrado en las 24 siguientes a la IMO (I,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.006$ , respectivamente).

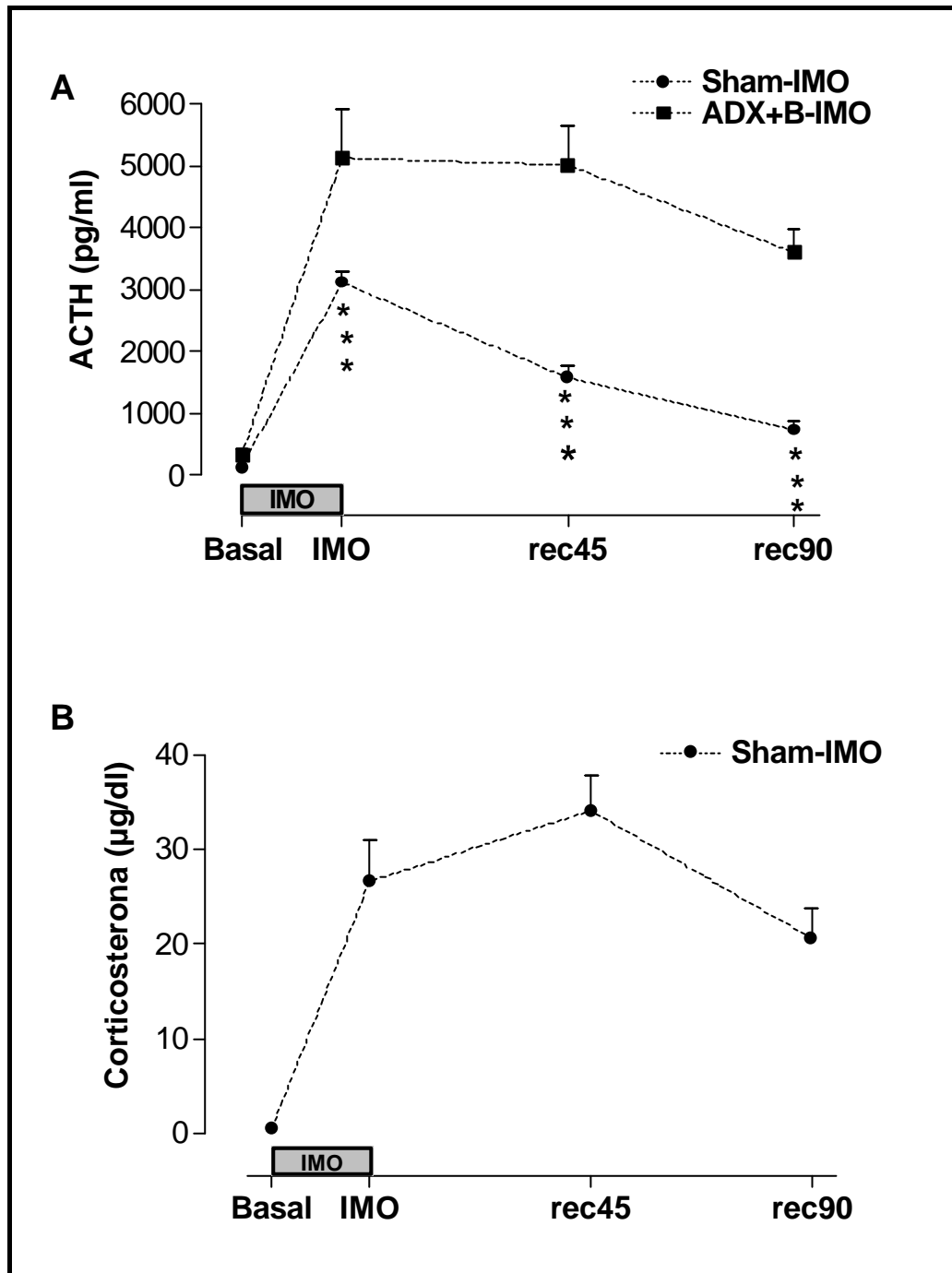
No se observaron diferencias significativas en los niveles basales de ACTH de ratas ADX+B comparadas con las ratas SHAM analizadas con un ANOVA de un factor. La respuesta de la ACTH y la corticosterona a la IMO del día 8 fue analizada mediante un ANOVA de dos factores, con los factores experiencia previa con el estrés y tiempo de toma de muestra como factores principales (ver Tabla 7).

Tabla 7: Efecto de la experiencia previa con la IMO sobre la respuesta a la IMO el día 8: Resultados del ANOVA de dos factores segmentado para los grupos SHAM y ADX+B.

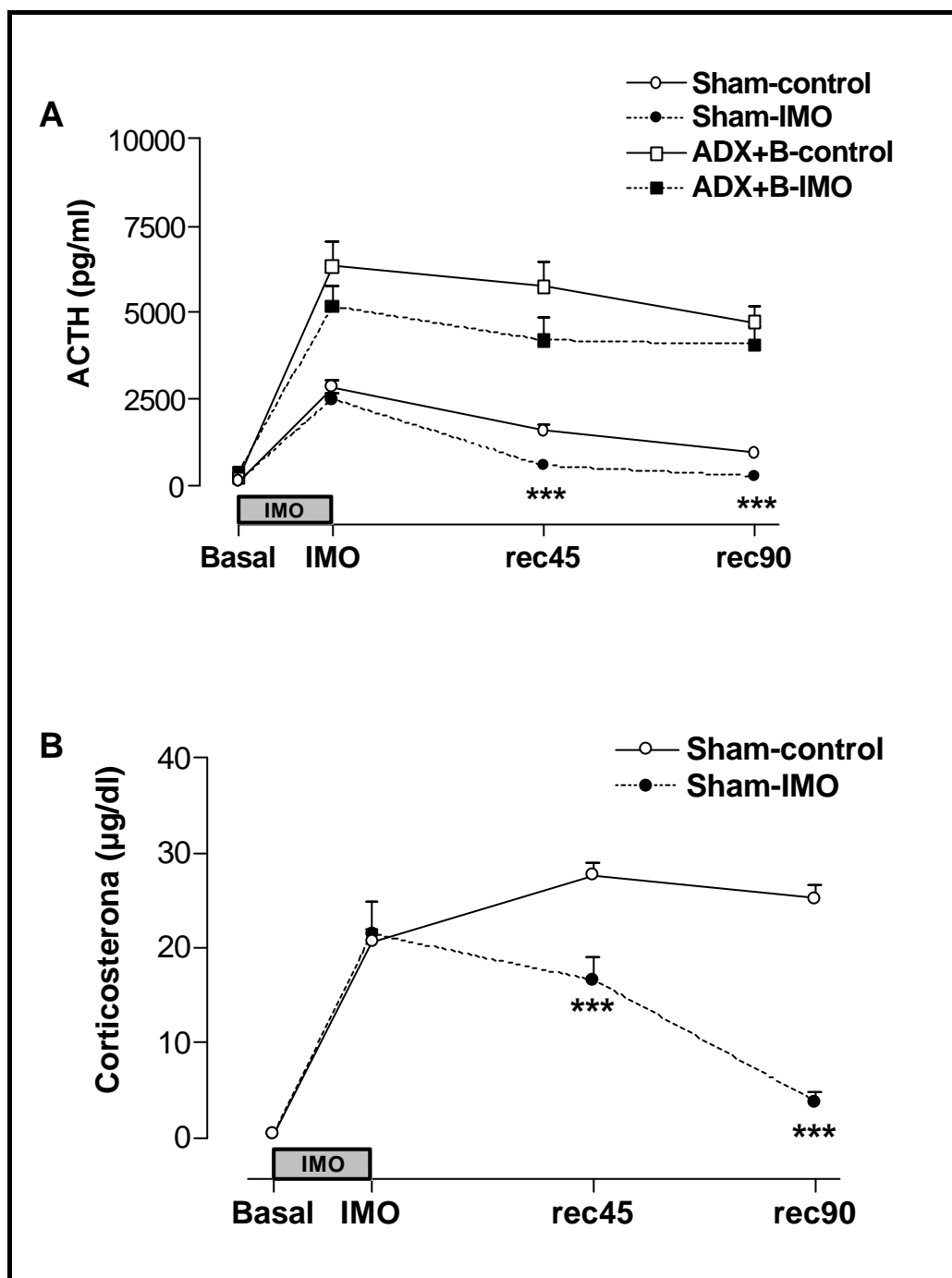
<b>FACTOR</b>	<b>ACTH</b>		<b>CORTICOSTERONA</b>
	<b>SHAM</b>	<b>ADX+B</b>	<b>SHAM</b>
Experiencia previa con la IMO (E)	p< 0.001	NS	p< 0.001
Tiempo de toma de muestra (T)	p< 0.001	p<0.006	p<0.001
E x T	p< 0.001	NS	p<0.001

En ratas SHAM, los niveles de ACTH en respuesta a la segunda IMO revelaron un efecto significativo de la experiencia previa, del tiempo de toma de muestra y de la interacción E x T. Debido a la significación de la interacción E x T, se realizaron los análisis a posteriori correspondientes. Estos revelaron que el efecto de la IMO previa se restringió a los períodos post-estrés (p<0.001, tanto a los 45 min como a los 90 min) (Figura 10A). Resultados similares se observaron con la corticosterona (Figura 10B).

En ratas ADX+B sólo se observó efecto del factor tiempo de toma de muestra sobre la respuesta de la ACTH al mismo estrés, no observándose efecto alguno de la exposición previa a la IMO ni de la interacción E x T.



**FIGURA 9:** Efecto de la adrenalectomía y suplementación con bajos niveles de corticosterona (ADX+B) sobre la respuesta de la ACTH y corticosterona a 20 min de IMO. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=8-9 por grupo). Las muestras fueron tomadas justo antes de la IMO (basal), justo después de la IMO y a los 45 y 90 min de finalizada la exposición al estrés (rec45 y rec90). Los grupos hacen referencia al estatus de los glucocorticoides (SHAM o ADX+B) y a la exposición a la IMO. La respuesta de la corticosterona a la IMO está indicada sólo para el grupo SHAM. \*\*\*  $p < 0.001$  vs ratas ADX+B dentro del mismo tiempo de toma de muestra.



**FIGURA 10: Efecto del estatus de los glucocorticoides y de una sola exposición previa a 20 min de IMO sobre la respuesta de la ACTH y corticosterona al mismo estrés aplicado una semana después.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=8-9 por grupo). Las muestras fueron tomadas justo antes de la IMO (basal), justo después de la IMO (20 min) y a los 45 y 90 min de finalizada la exposición al estrés (rec45 y rec90). Los grupos hacen referencia al estatus de glucocorticoides (SHAM o ADX+B) y al tratamiento el día 1, dado que el día 8 todos los grupos fueron expuestos a la IMO. Sólo se indican las diferencias en función de la experiencia previa con la IMO. \*\*\*  $p < 0.001$  entre ratas SHAM-control y SHAM-IMO, dentro del mismo tiempo de toma de muestra.



#### **Experimento 4: Efecto de la administración aguda de metirapona sobre la inducción de los efectos a largo plazo de la IMO sobre el eje HPA.**

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior indican que los animales ADX+B que tienen bloqueada la capacidad de liberar glucocorticoides durante el estrés no muestran efectos a largo plazo de una sola exposición a la IMO sobre el eje HPA. Por lo tanto, los glucocorticoides liberados durante el estrés podrían ser necesarios para inducir el fenómeno. Sin embargo, la adrenalectomía además de anular la secreción de glucocorticoides tanto durante la primera como durante la segunda exposición al estrés también anula la secreción de catecolaminas por parte de la médula adrenal. Para evitar estos problemas nos planteamos otra alternativa experimental para bloquear sólo la liberación de glucocorticoides y únicamente durante la primera exposición a la IMO. Utilizamos metirapona, fármaco que bloquea la enzima  $11\beta$ -hidroxilasa y por lo tanto la síntesis de un  $11\beta$ -hidroxicorticosteroide como es la corticosterona (128). Además, permite estudiar a los animales en condiciones intactas durante la segunda exposición a la IMO.

Utilizamos 24 ratas distribuidas al azar en 4 grupos experimentales (n=8): 1/ Veh-control, 2/ MET control, 3/ Veh+IMO y 4/ MET+IMO. La dosis de metirapona administrada fue de 200 mg/kg (128). El día 1 se administró metirapona o vehículo y tres horas después la mitad de los animales de cada grupo fueron expuestos a 20 min de IMO y los otros sirvieron como controles. A los expuestos a la IMO se les tomó muestras de sangre justo antes y después de la IMO y a los controles se les tomó muestra siguiendo el mismo esquema. Posteriormente todos los animales permanecieron en el estabulario sin recibir ninguna manipulación experimental hasta el día 8. Este día todos los animales fueron expuestos a la IMO durante 20 min. Las muestra de sangre se tomaron justo antes y después de la IMO y a los 45, 90 y 180 min de finalizado el estrés. Se añadió un tiempo más de toma de muestra para obtener una mejor dinámica temporal del período post-estrés. La ingesta de comida se controló durante todo el período experimental siguiendo el protocolo descrito en material y métodos.

### **Resultados**

#### **Respuesta a la primera IMO**

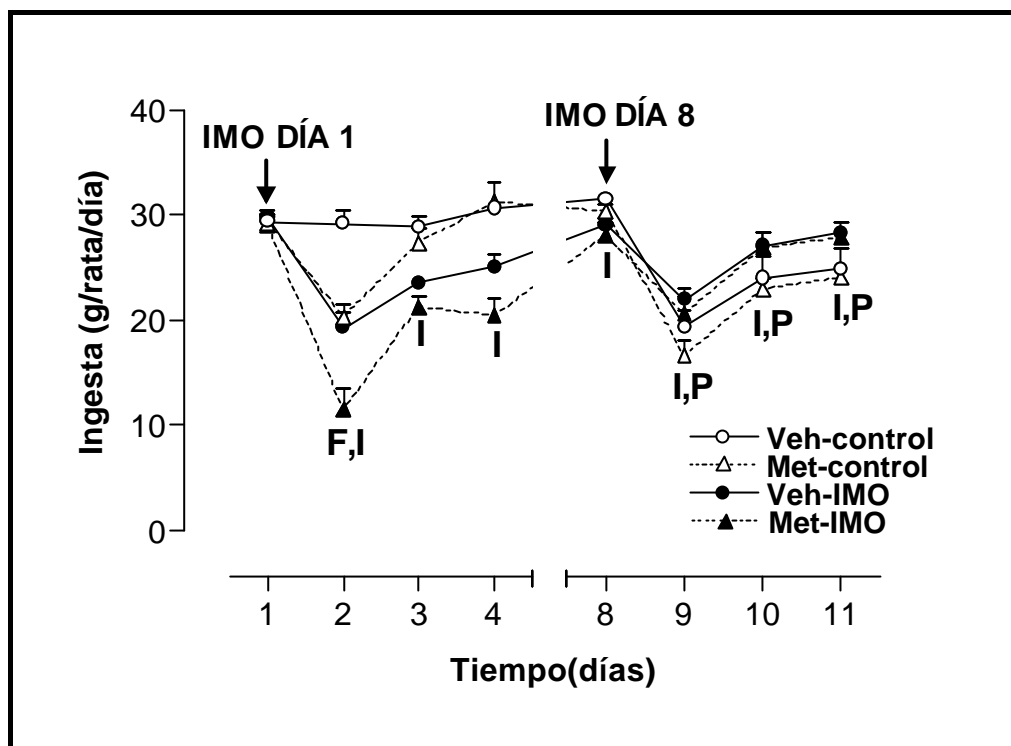
Los cambios en la ingesta se analizaron mediante un ANOVA de tres factores, con la exposición a la IMO y el fármaco como factores entre-sujeto y los días después del inicio del tratamiento como factor intra-sujeto de medidas repetidas. Los resultados estadísticos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Efecto del tratamiento con metirapona y de la exposición a la IMO en el día 1 sobre los cambios en la ingesta: Resultados del ANOVA de tres factores.

<b>FACTOR</b>	<b>IMO DIA 1</b>	<b>IMO DIA 8</b>
IMO (I)	P<0.001	P<0.05
Fármaco (F)	P<0.004	NS
Días (D)	P<0.001	P<0.001
I x F	NS	NS
I x D	P<0.001	P<0.001
F x D	P<0.001	NS
I x F x D	NS	NS

Los resultados del ANOVA revelaron un descenso significativo de la ingesta por la exposición a la IMO y por la administración de metirapona, no habiéndose observado una interacción entre ambos factores (Figura 11). Sí se observó un efecto significativo de la interacción I x D y de F x D, por eso se realizaron comparaciones a posteriori. Independientemente del factor fármaco, la reducción de la ingesta continuó durante todos los días posteriores a la primera IMO (p al menos <0.01), observándose que incluso en los días 7 y 8, previos al segundo estrés, aún no habían recuperado sus niveles normales de partida. Los análisis a posteriori de la interacción F x D, independientemente del factor estrés, revelaron que la metirapona produjo un descenso significativo de la ingesta sólo en las 24 h a su administración (p<0.001).

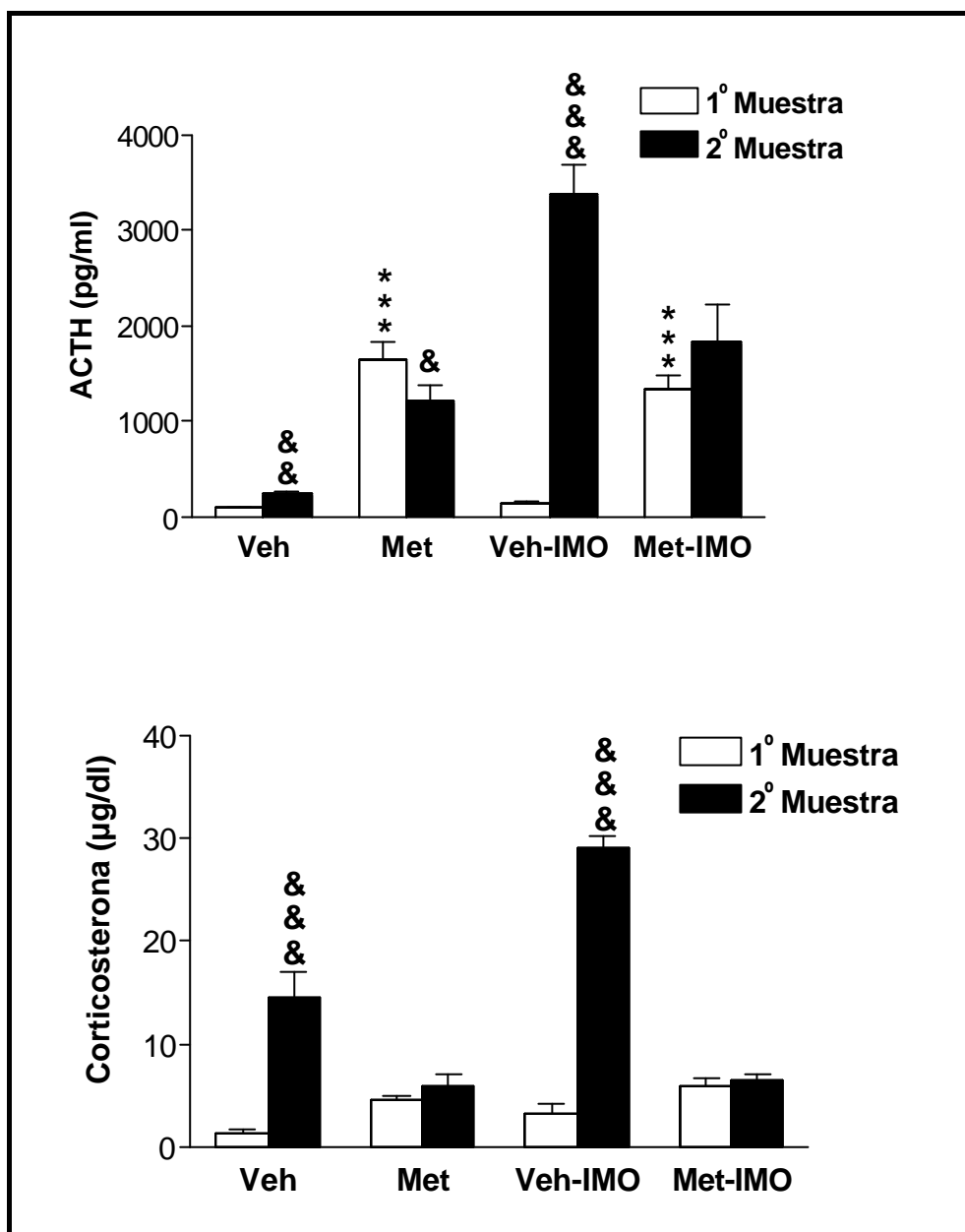
Dada la complejidad de los cambios en la ACTH y la corticosterona causados por el fármaco administrado y la exposición a la primera IMO (Figura 12), los resultados fueron analizados estadísticamente usando las pruebas t (datos apareados o no apareados). En ratas tratadas con vehículo pudimos observar que el procedimiento asociado a la toma de muestra incrementó los niveles de ACTH (p<0.002) y corticosterona (p<0.001) cuando se comparó la segunda muestra con la primera. A pesar de esto, la respuesta de ACTH y corticosterona a la IMO fue mayor (p<0.001 para las dos hormonas). La administración de metirapona *per se* incrementó notablemente los niveles de ACTH (p<0.001 vs ratas inyectadas con vehículo), con una pequeña disminución en la segunda muestra de los animales no estresados (p<0.03) y sin cambios significativos en los animales inyectados con metirapona y luego expuestos a IMO. En ratas tratadas con metirapona, los niveles de corticosterona fueron más altos que en los animales tratados con vehículo en las primera muestra (p<0.001), pero no se observaron cambios como consecuencia de la toma de muestra o de la IMO. La efectividad de la metirapona para bloquear la síntesis de corticosterona bajo situaciones de estrés se vió reflejada en el hecho de que los niveles de corticosterona fueron similares antes y después de 20 min de IMO (aproximadamente 5-6 µg/dl).



**FIGURA 11: Efecto del tratamiento con metirapona (200 mg/kg) (Met) y de 20 min de IMO sobre la ingesta.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de g/rata/día. Las cajas fueron consideradas como una unidad para el análisis estadístico (n=4 por grupo). Las flechas indican los días de exposición a la IMO. El día 1 las ratas de los grupos IMO previa fueron sujetas a la toma de muestra de sangre justo antes de la IMO (basal) y después de la IMO mientras que a las de los grupos control sólo se les tomó muestras de sangre. El día 8 todos los animales fueron expuestos a 20 min de IMO. En los efectos de la IMO del día 1 F representa el efecto global del fármaco e I de la experiencia con la IMO (p al menos < 0.002). En los efectos de la IMO del día 8, I representa efecto de la última IMO y P efecto de la IMO previa del día 1 (p al menos < 0.05).

#### Respuesta a la segunda IMO (día 8)

Los resultados del ANOVA de los valores de ingesta se muestran en la Tabla 8. Se observó que la metirapona administrada el día 1 no modificó el patrón de anorexia inducida por la IMO el día 8 (Figura 11). Sin embargo, la experiencia previa con la IMO sí tuvo efecto (p<0.05), dado que aquellos animales que tuvieron una experiencia con la IMO el día 1 mostraron menor grado de anorexia cuando fueron expuestos al mismo estrés 8 días más tarde. Los resultados del ANOVA también revelaron un efecto significativo de la interacción I x D (p<0.001). Los análisis a posteriori mostraron que el efecto protector de la IMO previa fue independiente de la metirapona y se observó durante los tres días siguientes a la segunda exposición a la IMO (p al menos < 0.04).



**Figura 12: Efecto de la administración de vehículo (Veh) o metirapona (200 mg/kg) (Met) sobre los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona en animales controles y animales expuestos a 20 min de IMO.** Se tomó una primera muestra a todos los animales. La segunda muestra se obtuvo 20 min después de la primera sin estrés adicional para los animales control y tras 20 min de exposición a la IMO en los otros grupos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=7-8 por grupo). Las diferencias significativas se expresan con \*\*\*  $p < 0.001$  vs correspondiente grupo veh, dentro de la primera toma de muestra; &  $p < 0.05$ , &&  $p < 0.01$  y &&&  $p < 0.001$  vs primera muestra.

Para simplificar el análisis estadístico de los resultados hormonales del día 8, seguimos la siguiente estrategia de análisis: (a) no incluimos en el análisis los niveles basales de ACTH y corticosterona; (b) segmentamos los análisis por el factor experiencia previa con la IMO, analizando por separados los grupos control y estresados previamente (IMO), para descubrir algún posible efecto no específico del tratamiento

farmacológico del día 1 que no estuviese relacionado con la experiencia previa de los animales con la IMO. Así pues, el efecto del fármaco administrado el día 1 sobre la dinámica de respuesta de la ACTH y la corticosterona a la nueva IMO del día 8 se estudió mediante el ANOVA de dos factores, con el factor fármaco como factor entre sujeto y el factor tiempo de toma de muestra como el factor intra-sujeto (medidas repetidas). El efecto de los factores y sus interacciones se muestran en la Tabla 9.

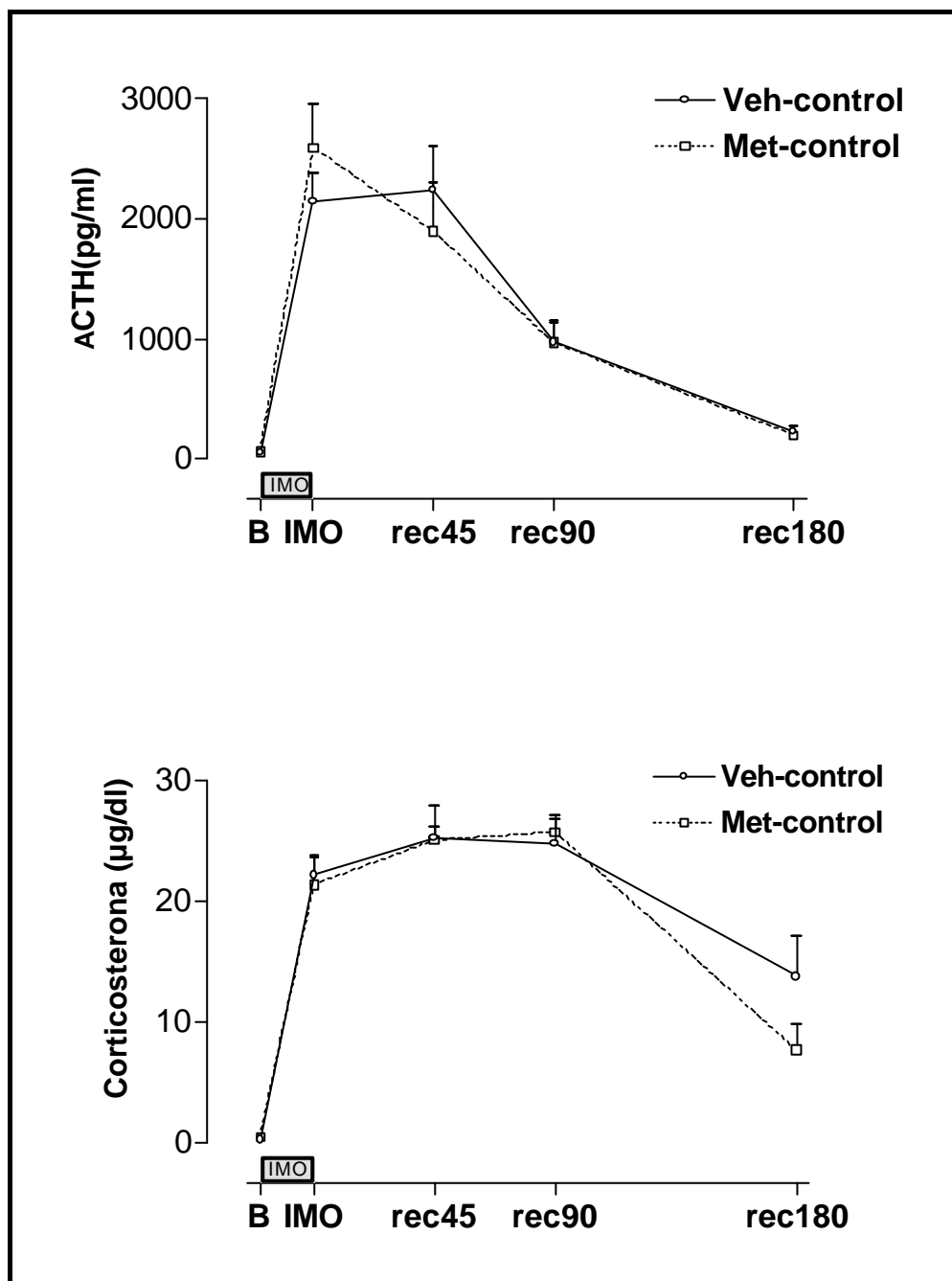
Tabla 9: Efecto de la metirapona y de la experiencia previa con la IMO el día 1 sobre la respuesta de la ACTH y la corticosterona a una nueva IMO el día 8: Resultados del ANOVA de dos factores segmentado para el factor experiencia previa con la IMO.

FACTOR	ACTH		CORTICOSTERONA	
	CONTROL	IMO Previa	CONTROL	IMO Previa
Fármaco (F)	NS	p<0.002	NS	p<0.006
Tiempo de toma muestra (T)	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
F x T	NS	p<0.001	NS	p<0.004

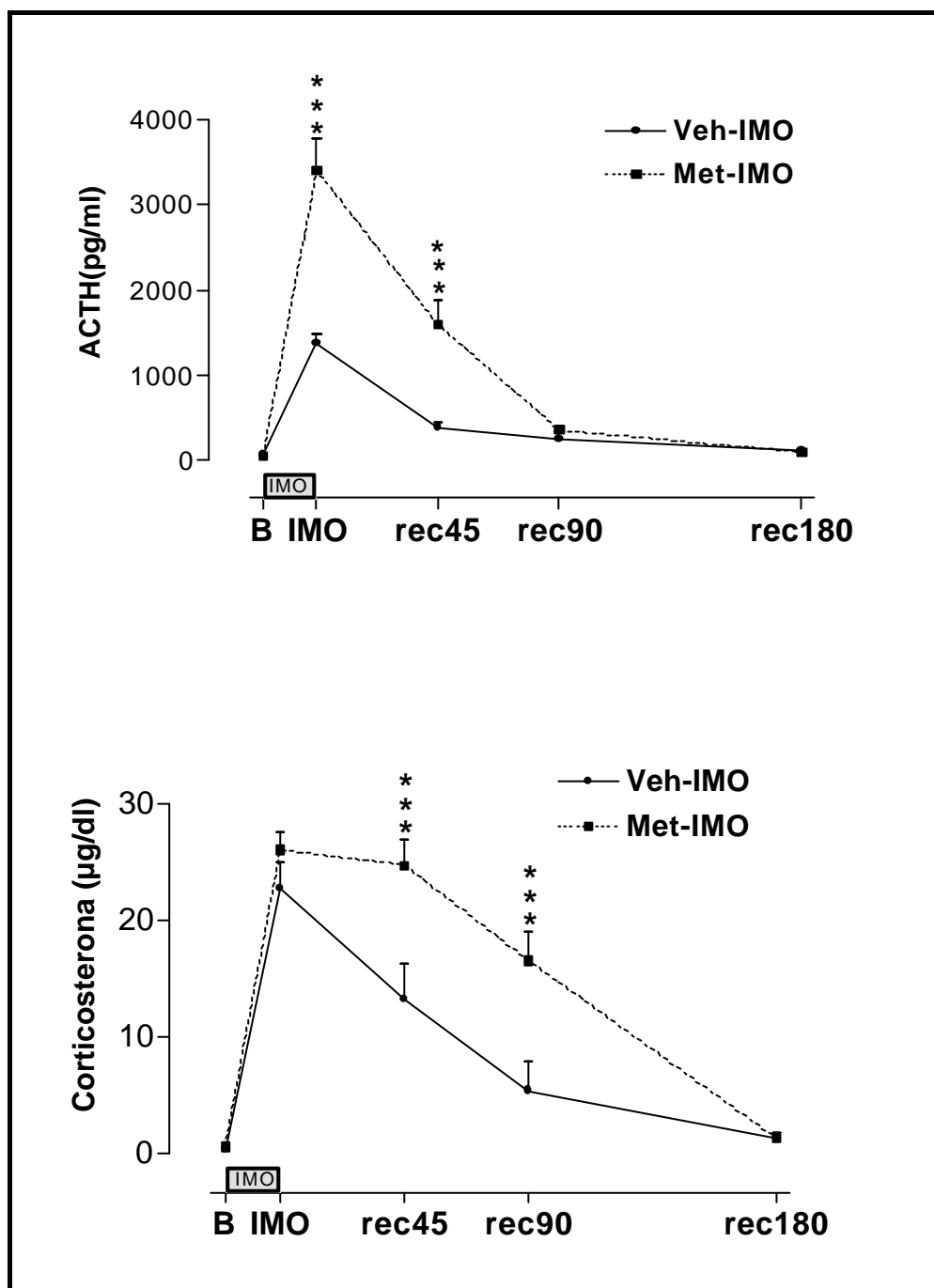
En los animales sin experiencia previa con la IMO (controles) no se observó efecto del fármaco ni tampoco de la interacción del fármaco con el tiempo de toma de muestra sobre los niveles de ACTH y corticosterona (Figura 13). Sin embargo, en los animales estresados previamente apareció efecto de la metirapona e interacción F x T, tanto para la ACTH como para la corticosterona. Los análisis a posteriori demostraron que la administración de metirapona el día 1 provocó una mayor respuesta de la ACTH a la segunda IMO justo después del estrés y a los 45 min de finalizado el mismo, comparada con la de los animales tratados con vehículo (p<0.001 en ambos casos). La corticosterona siguió un patrón de respuesta semejante a la ACTH, pero aquí la administración de metirapona dio lugar a una mayor respuesta a la segunda IMO a los 45 y 90 min de finalizado el estrés (p<0.001 en ambos casos) (Figura 14).

#### **Experimento 5: Efecto de la administración aguda de una dosis alta de RU38486 sobre la inducción de los efectos a largo plazo de la IMO sobre el eje HPA.**

En el experimento anterior, el bloqueo de la liberación de corticosterona durante la primera IMO redujo el efecto a largo plazo de una sola exposición a la IMO sobre la respuesta del eje HPA a la segunda IMO. Esto sugería un papel de los glucocorticoides en la inducción de los efectos a largo plazo sobre el eje HPA. Decidimos estudiar la implicación de los GR bloqueando su efecto biológico mediante el RU38486 un antagonista de los GR (58, 59). Utilizamos una dosis alta de RU38486 (100 mg/kg) ya que resultados anteriores habían demostrado que una dosis más baja (50 mg/kg) no tenía efecto alguno sobre el fenómeno estudiado.



**Figura 13: Efecto del tratamiento previo con metirapona (200 mg/kg) (Met) el día 1 sobre la respuesta hormonal a la IMO 7 días más tarde.** Los grupos se refieren al tratamiento el día 1, dado que el día 8 ambos grupos fueron expuestos a 20 min de IMO. Las muestras fueron tomadas justo antes (B) justo después de la IMO y a los 45, 90 y 180 min de finalizado el estrés (rec45, rec90 y rec180). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=7-8 por grupo).



**Figura 14:** Efecto del pre-tratamiento con metirapona (200 mg/kg) (Met) y la exposición a la IMO el día 1 sobre la respuesta hormonal a una segunda exposición a la IMO 7 días más tarde. Los grupos se refieren al tratamiento del día 1, dado que el día 8 ambos grupos fueron expuestos a 20 min de IMO. Las muestras fueron tomadas justo antes (B) justo después de la IMO y a los 45, 90 y 180 min de finalizado el estrés (rec45, rec90 y rec180). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=7-8 por grupo). \*\*\*  $p < 0.001$  vs grupo veh-IMO, dentro del mismo tiempo de toma de muestra.

Se utilizaron 36 ratas que se distribuyeron al azar en cuatro tratamientos (n=9): 1/ Veh-control, 2/ RU-control, 3/ Veh+IMO y 4/ RU+IMO. El día 1 se inyectó vehículo o RU y a los 45 min se extrajo la primera muestra de sangre. Los grupos control fueron devueltos al estabulario y los grupos 3 y 4 fueron inmovilizados durante 20 min. Las muestras de sangre fueron tomadas antes de la IMO y a los 90 y 180 min de finalizado la exposición al estrés. Se eligió este tiempo más prolongado de toma de muestra para intentar demostrar un efecto del RU38486 sobre la velocidad de recuperación post-estrés del eje HPA. El día 8, todos los animales fueron expuestos a la IMO durante 20 min. Las muestras de sangre fueron tomadas justo antes y justo después de la IMO y a los 45, 90 y 180 min de finalizado el estrés. La ingesta de comida se controló durante todo el período experimental siguiendo el protocolo habitual.

## Resultados

### Respuesta a la primera IMO

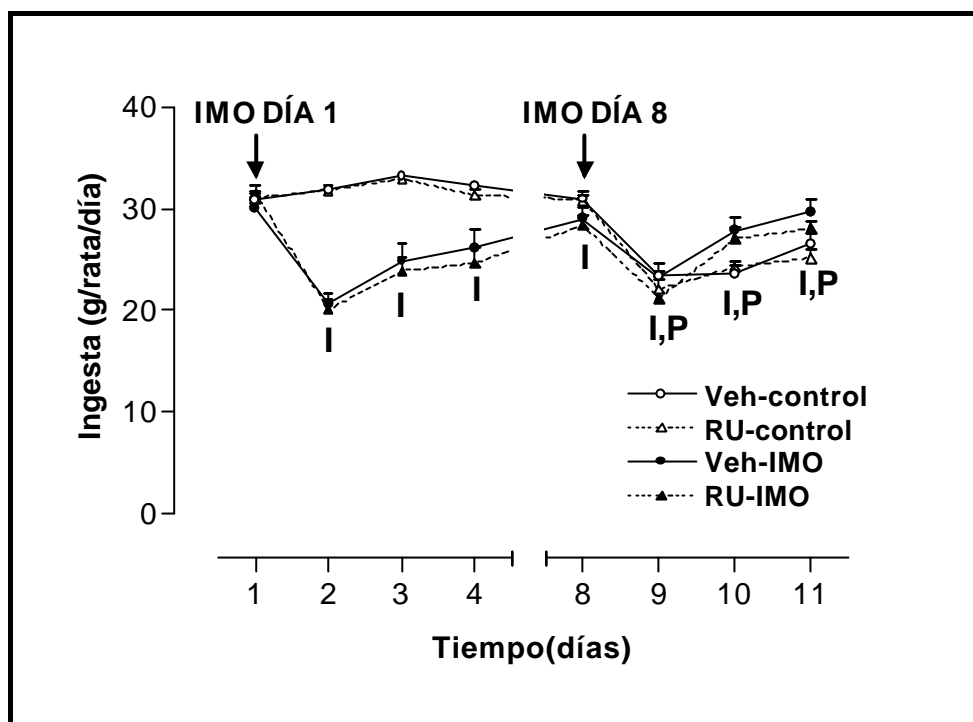
Los cambios en la ingesta se analizaron mediante un ANOVA de tres factores, con la exposición a la IMO (I) y el fármaco (F) como factores entre-sujeto y los días después del inicio del tratamiento (D) como factor intra-sujeto de medidas repetidas. Los resultados de la ingesta se muestran en la Tabla 10.

El ANOVA reveló que no hubo un efecto significativo de la administración del RU38486 sobre la ingesta, aunque sí se observó un descenso significativo en respuesta a la IMO del día 1. Como los resultados revelaron también una interacción significativa I x D, se realizaron comparaciones a posteriori para saber hasta que día era significativo ese descenso. Se observó una reducción de la ingesta en todos los días posteriores a la primera IMO ( $p < 0.001$  en todos los casos), observándose que incluso en los días 7 y 8, previos al segundo estrés, aún no se habían recuperado los niveles normales (Figura 15).

Tabla 10: Efecto del tratamiento con RU38486 y de la exposición a la IMO del día 1 sobre los cambios en la ingesta: Resultados del ANOVA de tres factores.

<b>FACTOR</b>	<b>IMO DIA 1</b>	<b>IMO DIA 8</b>
IMO (I)	P<0.001	P<0.04
Fármaco (F)	NS	NS
Días (D)	P<0.001	P<0.001
I x F	NS	NS
I x D	P<0.001	P<0.001
F x D	NS	NS
I x F x D	NS	NS





**FIGURA 15: Efecto del tratamiento con RU38486 (100 mg/kg) (RU) y de 20 min de IMO sobre la ingesta.** Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM de g/rata/día. Las cajas fueron consideradas como una unidad para el análisis estadístico (n=4 por grupo). Las flechas indican los días de exposición a la IMO. El día 1 las ratas de los grupos con IMO previa fueron sujetas a la toma de muestra de sangre justo antes de la IMO (basal) y justo después de la IMO, mientras que a los grupos control sólo se tomó las muestras de sangre. El día 8 todos los animales fueron expuestos a 20 min de IMO. En los efectos de la IMO del día 1 I representa el efecto de la IMO ( $p$  al menos  $< 0.02$ ). En los efectos de la IMO del día 8, I representa efecto de la última IMO ( $p$  al menos  $< 0.02$ ) y P el efecto de la IMO previa del día 1 ( $p$  al menos  $< 0.02$ ).

La respuesta de la ACTH y la corticosterona a la IMO el día 1 se analizó mediante un ANOVA de tres factores, con los factores IMO (I) y fármaco (F) como factor entre-sujeto y el tiempo de toma de muestra (T) como factor intra-sujeto. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla 11 y los niveles de ACTH y corticosterona en la Figura 16.

Podemos observar que no hubo efecto del RU38486 sobre la respuesta de la ACTH, y que, además de un efecto de los otros factores simples, hubo un efecto significativo de la interacción I x T. Esta interacción significativa se debe a que se incluyeron en el análisis los niveles previos al estrés y lógicamente la exposición a la IMO incrementó los niveles de ACTH sólo en los tiempos post-estrés ( $p < 0.001$  en todos los casos). Respecto a los niveles de corticosterona se observaron dos interacciones significativas: I x F e I x T. La razón de la significación I x T es la misma que la indicada para la ACTH, pero para la interacción I x F podría deberse a que el RU38486 incrementó ligeramente, en todos los tiempos post-estrés, los niveles de corticosterona en los animales estresados ( $p < 0.05$ ) pero no los animales control.

Tabla 11: Efecto de la administración de RU38486 y la exposición a la IMO el día 1 sobre los niveles de ACTH y corticosterona: Resultados del ANOVA de tres factores.

<b>FACTOR</b>	<b>ACTH</b>	<b>CORTICOSTERONA</b>
IMO (I)	p<0.001	p<0.001
Fármaco (F)	NS	p<0.015
Tiempo de toma de muestra (T)	p<0.001	p<0.001
I x F	NS	p<0.05
I x T	p<0.001	p<0.001
F x T	NS	NS
I x F x T	NS	NS

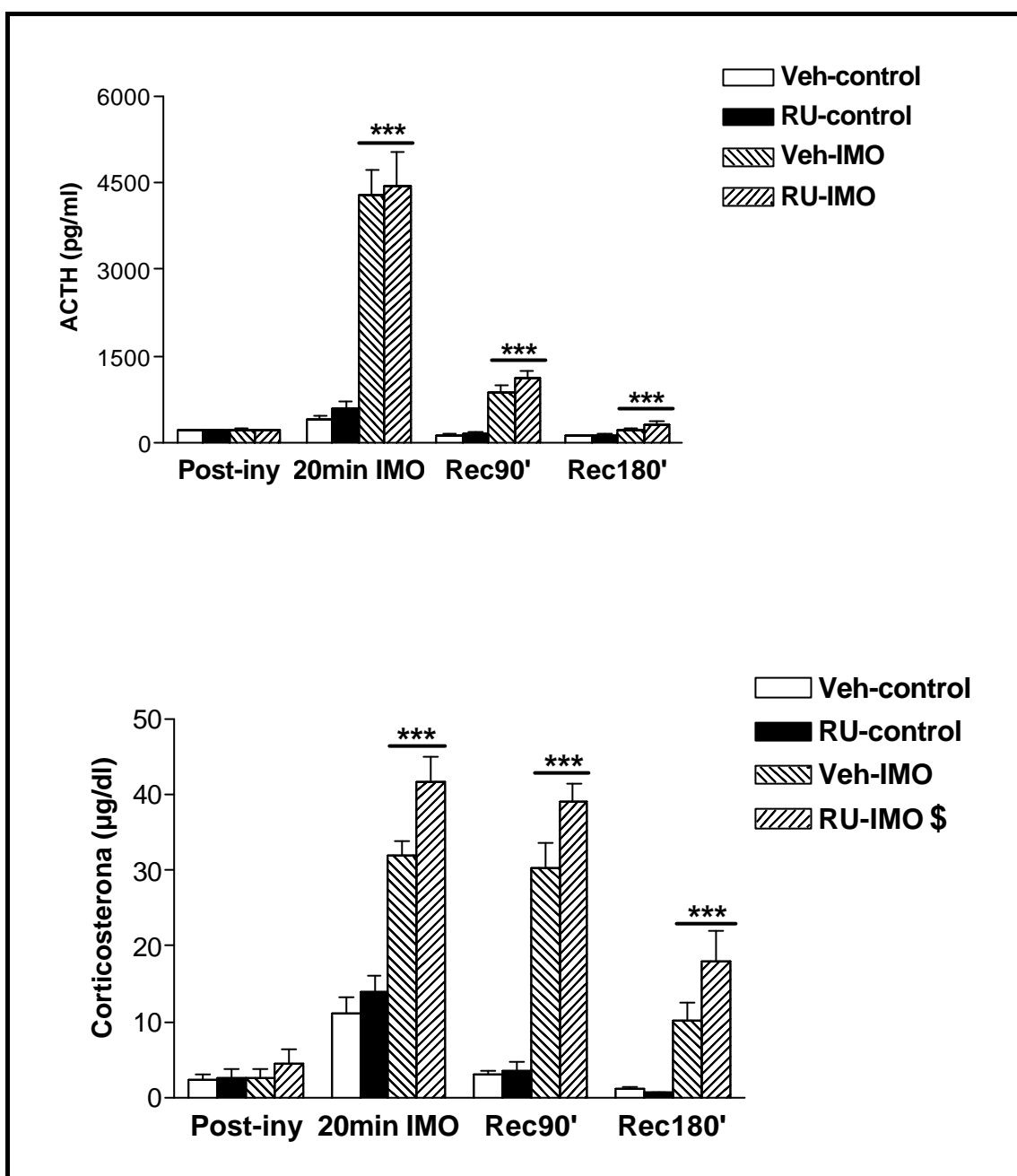
### Respuesta a la segunda IMO

Los resultados del ANOVA de la ingesta se muestran en la Tabla 10. El RU38486 administrado el día 1 no tuvo efecto alguno sobre la reducción de la ingesta causada por la exposición a la IMO del día 8. Sin embargo, la experiencia previa con la IMO sí tuvo efecto y aquellos animales que tuvieron una experiencia con la IMO el día 1 mostraron menor grado de anorexia cuando fueron expuestos al mismo estrés 8 días más tarde (Figura 15). Los resultados del ANOVA también revelaron un efecto significativo de la interacción I x D. Los análisis a posteriori mostraron que el efecto protector de la IMO fue observado en los tres días siguientes a la segunda exposición a la IMO (p al menos <0.01).

Para analizar los resultados de las hormonas obtenidos el día 8 se siguió la misma estrategia que en el experimento anterior, segmentado para el factor experiencia previa con la IMO. En el ANOVA de dos factores el fármaco fue el factor entre sujeto y el tiempo de toma de muestra el factor intra-sujeto. El efecto de los factores y sus interacciones se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Efecto del RU38486 y de la exposición a la IMO el día 1 sobre la respuesta de la ACTH y la corticosterona a la IMO del día 8: Resultados del ANOVA de dos factores segmentado en función del tratamiento de estrés del día 1 (control o IMO).

<b>FACTOR</b>	<b>ACTH</b>		<b>CORTICOSTERONA</b>	
	<b>CONTROL</b>	<b>IMO Previa</b>	<b>CONTROL</b>	<b>IMO Previa</b>
Fármaco (F)	NS	NS	NS	p<0.04
Tiempo de toma de muestra (T)	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
T x F	NS	p<0.03	NS	P=0.082



**Figura 16: Efecto de la administración de vehículo (Veh) o RU38486 (100 mg/kg) (RU) sobre los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona durante la primera exposición a la IMO (día 1).** La primera muestra se tomó 45 min después de la inyección (post-iny), la segunda 20 min después de la primera sin estrés adicional para los animales control y tras 20 min de exposición a la IMO en los otros grupos y las siguientes muestras a los 90 y 180 min de finalizada la exposición a la IMO o los tiempos correspondientes en los grupos control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=9 por grupo). \*\*\* p<0.001 vs grupos control, dentro del mismo tiempo de toma de muestra; \$ indica significación global de la administración de RU en los animales sometidos a IMO (p< 0.05).

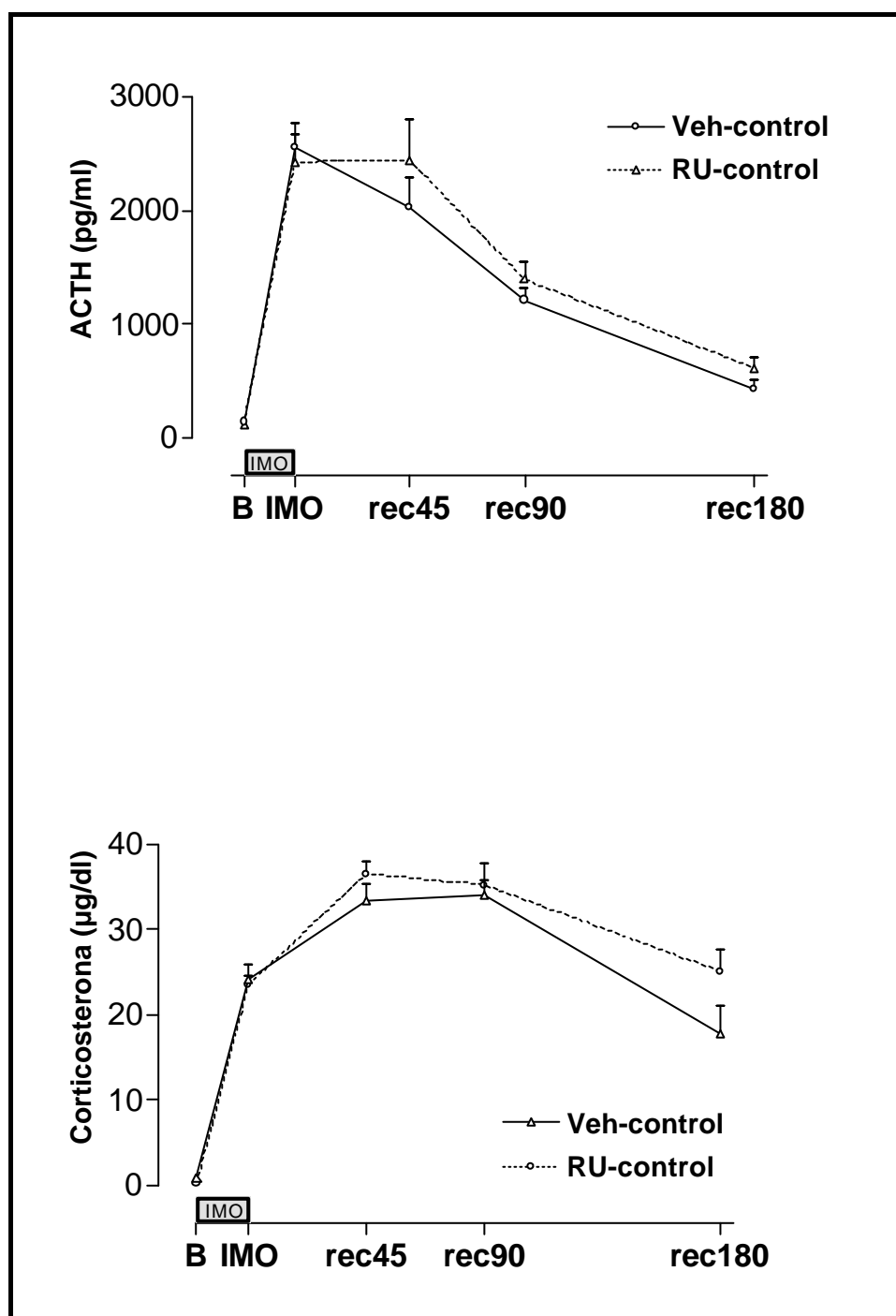
En los animales controles (sin experiencia previa con la IMO) el RU38486 administrado el día 1 no modificó las respuestas de la ACTH y de la corticosterona a la IMO aguda del día 8 (Figura 17). En las ratas previamente expuestas a la IMO, el RU38486 tampoco tuvo efecto global sobre la respuesta de la ACTH a la IMO del día 8 pero, en cambio, sí se observó una interacción significativa del RU38486 con el tiempo toma de muestra ( $p < 0.03$ ). Comparaciones a posteriori para cada tiempo mostraron niveles más altos de ACTH a los 90 min post-IMO ( $p < 0.03$ ) en las ratas tratadas con RU38486 que en las tratadas con vehículo. El ANOVA para la corticosterona, en los animales con IMO previa, reveló un efecto global de la administración de RU38486 indicativo de un incremento global en los niveles de corticosterona. La interacción del RU38486 por el tiempo toma de muestra fue marginalmente significativa ( $p = 0.082$ ), lo que se reflejó en un nivel más alto de corticosterona en los animales tratados con RU38486 sólo a los 90 min post-IMO ( $p < 0.05$ , prueba t student) (Figura 18).

### **Experimento 6: La potenciación de la liberación de glucocorticoides no modifica los efectos largo plazo de una exposición a la IMO.**

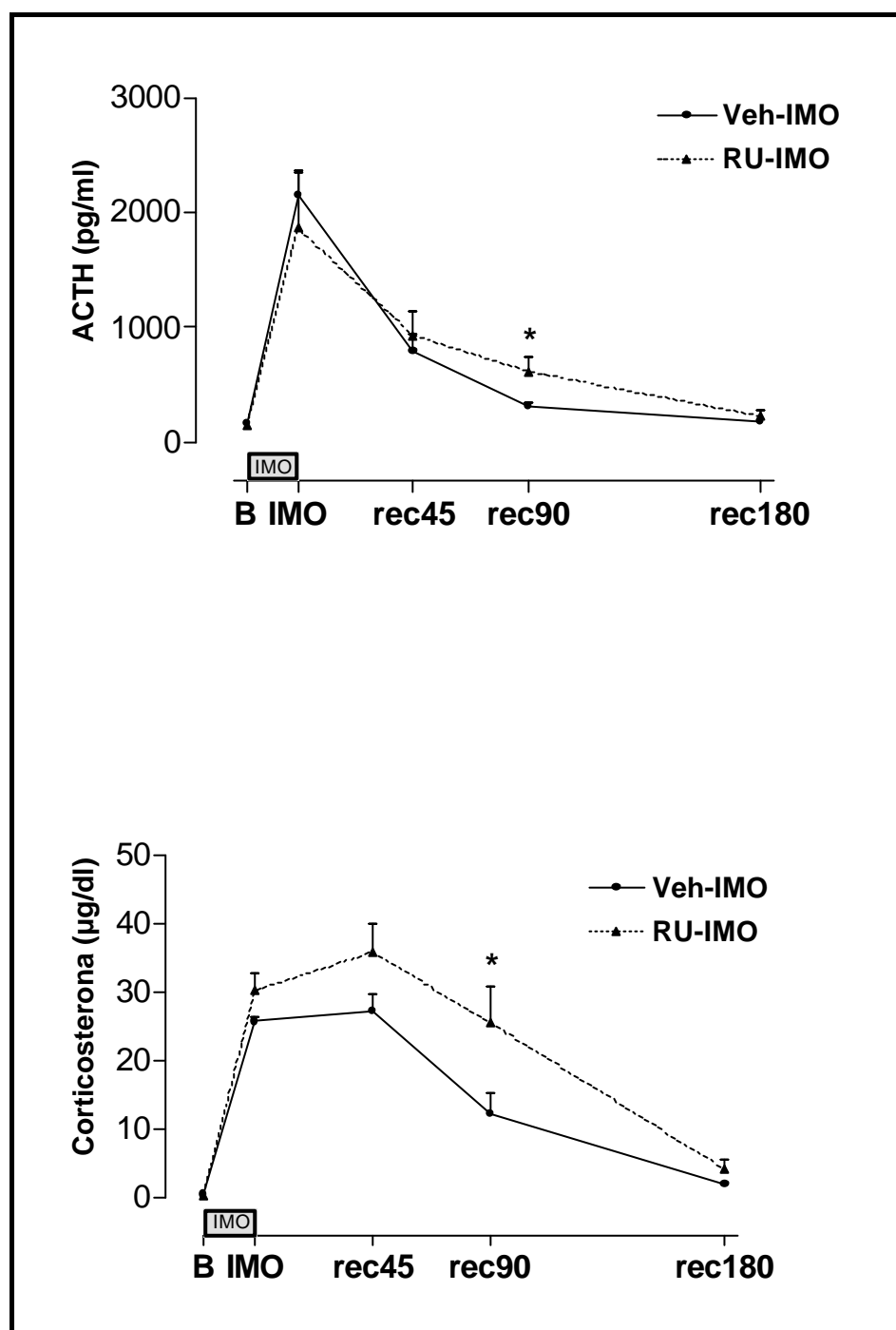
Los resultados obtenidos en estos últimos experimentos parecen demostrar que los glucocorticoides participan, al menos parcialmente, en la inducción de los efectos a largo plazo de la IMO. Sin embargo, el efecto observado en el eje HPA con la metirapona fue sólo parcial y el observado con el RU38486 muy moderado. Cabía la posibilidad de que los glucocorticoides más que ejercer un papel fundamental, estuvieran contribuyendo a potenciar los efectos de la IMO *per se*. De ser así, la administración exógena de glucocorticoides podría potenciar los efectos de la IMO *per se* si elegimos unas condiciones de IMO capaces de inducir efectos a largo plazo de manera moderada. Para comprobar tal hipótesis escogimos dos tiempos de IMO, el estándar (20 min) y uno mucho más corto (1 min) que en nuestro laboratorio habíamos observado previamente que no inducía efectos a largo plazo sobre el eje HPA.

No se administraron glucocorticoides directamente para evitar el que la dosis fuera farmacológica y no fisiológica. En vez de ello, se administró ACTH que, lógicamente, provoca un máximo de liberación de corticosterona determinado por la capacidad de la adrenal, que sabemos es limitada.

Inyectamos s.c. una preparación de ACTH de larga duración (horas) antes de la exposición a 1 o 20 min de IMO y estudiamos la dinámica de respuesta de la liberación concomitante de ACTH, tomando muestras a diferentes tiempos. Se utilizaron 48 ratas distribuidas en 6 grupos experimentales ( $n=8$ ): 1/ control + veh, 2/ control + ACTH, 3/ IMO 1 min + veh, 4/ IMO 1 min + ACTH, 5/ IMO 20 min + veh y 6/ IMO 20 min + ACTH. El día 1 se tomó muestra de sangre basal e inmediatamente se inyectó vehículo o ACTH (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Posteriormente los animales de los grupos 1 y 2 fueron devueltos al estabulario, los de los grupos 3 y 4 se inmovilizaron durante 1 min y los de los grupos 5 y 6 se inmovilizaron durante 20 min. A todos los animales se les tomó nuevamente muestra de sangre a los 20 min, 2 h 20 min y 4 h 20 min después de la inyección. El día 8 todos los animales fueron inmovilizados 20 min, tomándose muestras de sangre justo antes y después de la IMO y 45 y 90 min después de finalizado el estrés. La ingesta de comida se controló durante todo el período experimental siguiendo el protocolo habitual.



**FIGURA 17:** Efecto del tratamiento con RU38486 (100 mg/kg) (RU) el día 1 sobre la respuesta a 20 min de IMO 7 días más tarde. Los grupos hacen referencia al tratamiento del día 1, dado que el día 8 ambos grupos fueron expuestos a 20 min de IMO. Las muestras fueron tomadas justo antes (B) y justo después de la IMO y a los 45, 90 y 180 min de finalizado el estrés (rec45, rec90 y rec180). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=8 por grupo). No se observó efecto significativo del tratamiento con RU.



**FIGURA 18:** Efecto del tratamiento previo con RU38486 (100 mg/kg) (RU) y de la exposición a 20 min de IMO el día 1 sobre la respuesta hormonal a una segunda IMO el día 8. Los grupos se refieren al tratamiento el día 1, dado que el día 8 ambos grupos fueron expuestos a la IMO. Las muestras fueron tomadas justo antes (B) y justo después de la IMO y a los 45, 90 y 180 min de finalizado el estrés (rec45, rec90 y rec180). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=8 por grupo). \* p al menos  $<0.05$  vs grupo veh-IMO, dentro del mismo tiempo de muestra.

## Resultados

### Respuesta endocrina y fisiológica al día 1 de tratamiento

Los cambios en la ingesta se analizaron mediante un ANOVA de tres factores, con la exposición a la IMO y la administración de ACTH como factores entre-sujeto y los días después del inicio del tratamiento como factor intra-sujeto de medidas repetidas. Los resultados de la ingesta se muestran en la Tabla 13.

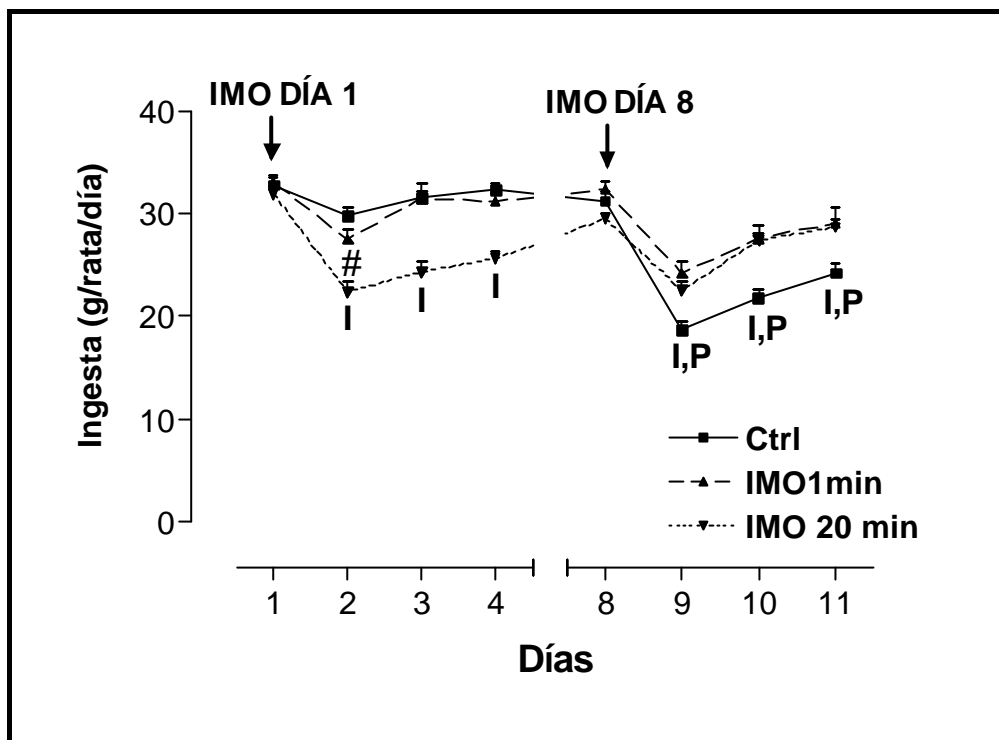
Tabla 13: Efecto del tratamiento con ACTH el día 1 y la experiencia con la IMO sobre los cambios en la ingesta: Resultados del ANOVA de tres factores.

<i>FACTOR</i>	<i>IMO DIA 1</i>	<i>IMO DIA 8</i>
IMO (I)	P<0.001	P<0.008
ACTH (A)	NS	NS
Día (D)	P<0.001	P<0.001
I x A	NS	NS
I x D	P<0.001	P<0.001
A x D	NS	NS
I x F x D	NS	NS

El ANOVA reveló que no hubo efecto significativo de la administración de ACTH sobre la ingesta, aunque sí se observó un descenso significativo en respuesta a la IMO. Como los resultados del ANOVA revelaron también una interacción I x D, se realizaron comparaciones a posteriori, independientemente del factor ACTH. La reducción en la ingesta se observó durante los 3 días posteriores a la primera IMO ( $p<0.001$ ) en todos los días que fueron estudiados, pero no en los días 7 y 8, previos a la segunda IMO (Figura 19). Análisis adicionales revelaron que el efecto de IMO 1 min fue marginalmente significativo y se restringió sólo al día 1 ( $p=0.08$ ), mientras que el efecto de 20 min de IMO fue altamente significativo durante los tres días posteriores al estrés ( $p<0.001$  en todos los casos). No obstante, los animales expuestos a 20 min de IMO fueron recuperando progresivamente sus valores normales de ingesta a lo largo de los días.

Los niveles de ACTH plasmática fueron analizados sólo en los animales tratados con vehículo pero no en los tratados con ACTH. La respuesta de la ACTH a la IMO del día 1 se analizó mediante un ANOVA de dos factores, con los factores experiencia con la IMO y tiempo de toma de muestra como factores intra-sujeto. Los resultados del ANOVA revelaron un efecto significativo de la exposición a la IMO ( $p<0.004$ ), del tiempo de toma de muestra y de la interacción I x T ( $p<0.001$  en ambos casos). Puesto que el ANOVA reveló una interacción significativa de los factores I x T, se realizaron comparaciones a posteriori para cada tiempo y se observó que la IMO incrementó significativamente los niveles de ACTH a los 20 min ( $p<0.001$ ) pero no en los otros tiempos (basal y post-estrés). El efecto de la IMO se restringió a los animales expuestos

a 20 min IMO vs controles ( $p < 0.001$ ), no observándose efecto de 1 min de IMO (Tabla 15).



**FIGURA 19: Efecto de la de la administración de ACTH y de la exposición a la IMO sobre la ingesta.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM en g/rata/días. Las cajas fueron consideradas como la unidad experimental para el análisis estadístico ( $n=4$  por grupo). Las flechas indican los días de exposición a la IMO. El día 1 las ratas fueron expuestas a la inyección de vehículo o ACTH y a la toma de muestra (grupo control) o expuestas también a 1 o 20 min de IMO. El día 8 todos los animales fueron expuestos a 20 min de IMO. En la IMO del día 1, I representa el efecto de 20 min de estrés ( $p < 0.001$ ), mientras que # representa el efecto marginalmente significativo de 1 min de IMO ( $p=0.08$ ), siempre respecto al grupo control. En el día 8, I representa el efecto global de la segunda IMO ( $p$  al menos  $< 0.008$ ), mientras que P representa el efecto significativo de la exposición previa a la IMO respecto al grupo control, efecto que fue similar en las expuestas a 1 y a 20 min de IMO el día 1 ( $p$  al menos  $< 0.01$ ).

La respuesta de la corticosterona, que ahora incluye el factor administración de ACTH, fue analizada usando un ANOVA de tres factores, con los factores experiencia con la IMO y la inyección de ACTH como factores entre-sujeto y el tiempo de toma de muestra como factor intra-sujeto. Los resultados del ANOVA se muestran en Tabla 14.

Debido a la interacción significativa  $I \times T$ , se realizaron comparaciones a posteriori para cada tiempo que mostraron que, independientemente de la inyección de ACTH, la IMO incrementó los niveles de corticosterona plasmática a los 20 min ( $p < 0.002$ ) tanto en las ratas expuestas a 1 min ( $p < 0.007$ ) como a 20 min de IMO ( $p < 0.001$ ). No se observó efecto de la IMO a otros tiempos. Los análisis a posteriori de la interacción  $A \times T$  mostraron que, independientemente de la exposición o no a la IMO, la administración de ACTH provocó altos niveles de corticosterona en los dos tiempos post-IMO (140 y 260 min), pero no justo después de finalizar la IMO (Tabla 15). Estos datos indican que



la administración de ACTH fue realmente eficaz para incrementar los niveles de corticosterona durante algunas horas.

Tabla 14: Efecto de la administración de ACTH y la exposición a la IMO el día 1 sobre los niveles plasmáticos de corticosterona: ANOVA de tres factores.

<b>FACTOR</b>	<b>CORTICOSTERONA</b>
IMO (I)	NS
ACTH (A)	p<0.001
Tiempo de toma de muestra (T)	p<0.001
I x A	NS
I x T	p<0.02
A x T	p<0.001
I x A x T	NS

Tabla 15: Niveles de ACTH y corticosterona en respuesta a la IMO y a la administración de ACTH.

<b>ACTH (pg/ml)</b>	<b>TIEMPO</b>			
	<b>Basal</b>	<b>20 min</b>	<b>140 min</b>	<b>260 min</b>
<b>TRATAMIENTO</b>				
<b>Veh-control</b>	150 ± 30	841 ± 214	212 ± 95	109 ± 42
<b>Veh-IMO 1'</b>	205 ± 89	577 ± 95	155 ± 34	111 ± 21
<b>Veh-IMO 20'</b>	229 ± 115	1981 ± 201&	425 ± 119	138 ± 35

<b>Corticosterona (µg/dl)</b>	<b>TIEMPO</b>			
	<b>Basal</b>	<b>20 min*</b>	<b>140 min #</b>	<b>260 min #</b>
<b>TRATAMIENTO</b>				
<b>Veh-control</b>	0.7 ± 0.3	12.3 ± 1.7	3.7 ± 1.6	3.0 ± 1.3
<b>Veh-IMO 1'</b>	0.5 ± 0.1	17.6 ± 0.8	3.4 ± 1.2	1.8 ± 0.7
<b>Veh-IMO 20'</b>	0.4 ± 0.1	19.6 ± 1.2	9.7 ± 3.1	4.5 ± 2.3
<b>ACTH-ctr</b>	0.6 ± 0.2	14.6 ± 1.4	21.2 ± 2.1	25.0 ± 2.0
<b>ACTH-IMO1'</b>	0.9 ± 0.3	17.7 ± 1.6	23.0 ± 1.9	26.9 ± 1.7
<b>ACTH-IMO 20'</b>	0.4 ± 0.1	18.4 ± 1.8	19.6 ± 1.3	23.1 ± 1.6

Los valores son expresados como la media ± SEM (n=8). El tiempo indica el tiempo transcurrido desde la primera muestra (basal); & indica diferencias significativas vs los otros grupos; \* indica efecto significativo de la exposición a la IMO pero no a la administración de ACTH (ANOVA); # indica efecto significativo de la administración de ACTH pero no de la IMO (ANOVA).

Respuesta endocrina y fisiológica a la IMO del día 8

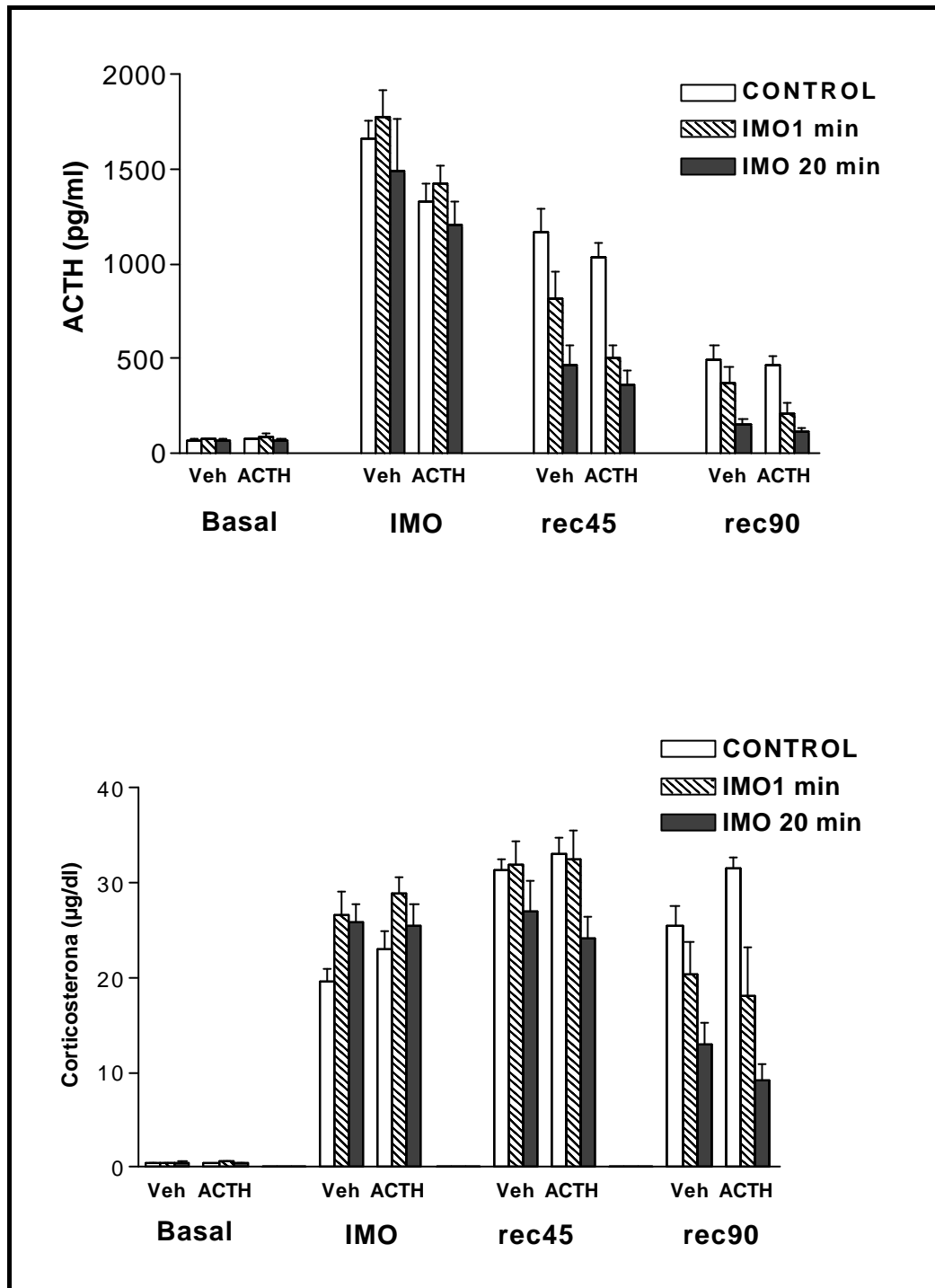
Los resultados del ANOVA de la ingesta se muestran en la Tabla 13. La administración de ACTH el día 1 no modificó la anorexia inducida por la IMO del día 8. En cambio, aquellos animales que tuvieron experiencia previa con la IMO el día 1 mostraron un menor grado de anorexia cuando fueron expuestos al mismo estrés el día 8 (Figura 19). Puesto que se observó una interacción significativa I x D ( $p < 0.001$ ), los análisis a posteriori revelaron un efecto protector de la IMO previa sobre la ingesta, independiente de la duración del estrés el día 1, en el primero, segundo y tercer día siguientes a la segunda exposición a la IMO ( $p$  al menos  $< 0.01$ ).

Al igual que en experimentos anteriores, no incluimos en el análisis estadístico los niveles basales de ACTH y corticosterona. El efecto de la IMO previa y la inyección de ACTH sobre la dinámica de respuesta de la ACTH y la corticosterona el día 8 se estudió mediante el ANOVA de tres factores. El factor experiencia previa con la IMO y ACTH como factores entre sujeto para el efecto y tiempo de toma de muestra como factor intra sujeto. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16: Efecto de la exposición a 20 min de IMO el día 8: Resultados del ANOVA de tres factores.

<b>FACTOR</b>	<b>ACTH</b>	<b>CORTICOSTERONA</b>
Experiencia previa con la IMO (E)	P< 0.001	P<0.006
ACTH (A)	P= 0.051	NS
Tiempo de toma de muestra (T)	P< 0.001	P<0.001
E x A	NS	NS
E x T	P<0.001	P<0.001
A x T	NS	NS
E x A x T	NS	NS

Los resultados obtenidos con el ANOVA revelaron que la experiencia previa con la IMO produjo una reducción global de la respuesta de la ACTH a la IMO el día 8 y una interacción significativa de E x T (Figura 20A). Debido a esta interacción se realizaron comparaciones a posteriori para cada tiempo, independientemente de la administración de ACTH. De los resultados de estos análisis se deduce que la exposición previa a la IMO no modificó los niveles de ACTH justo después del estrés, pero aceleró la recuperación en los tiempos post-IMO ( $p < 0.001$  en ambos casos). En estos dos tiempos de recuperación (45 y 90 min), el efecto fue significativo tanto con 1 min ( $p$  al menos  $< 0.02$ ) como con 20 min ( $p < 0.001$  en los dos tiempos) de IMO previa, pero la recuperación fue mayor en los animales que habían estado expuestos a 20 min de IMO (confirmado por la prueba SNK). La administración previa de ACTH tendió a reducir la respuesta de la ACTH a la IMO del día 8 ( $p = 0.051$ ), aunque no se observaron cambios significativos en la interacción entre la administración de ACTH y la exposición a la IMO el día 1, sugiriendo efectos independientes de ambos tratamientos sobre la respuesta de la ACTH a la segunda IMO (día 8).



**FIGURA 20:** Efecto de la administración de ACTH y de la IMO previa sobre la respuesta de la ACTH y la corticosterona a la segunda IMO una semana después. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM (n=8). El día 1 las ratas fueron inyectadas y se les tomó muestra de sangre (controles) o, además, fueron expuestas a 1 o 20 min de IMO. El día 8 todos los animales fueron expuestos a 20 min de IMO y a las correspondientes tomas de muestra de sangre. Las palabras bajo las barras indican si los animales recibieron vehículo o ACTH el día 1 y el tiempo de toma de muestra el día 8 (basal, 20 min IMO o 45 o 90 min post-IMO). El análisis estadístico reveló una reducción significativa de la respuesta de la ACTH y la corticosterona en el período post-IMO del día 8, en los animales que habían recibido IMO previa (día 1). El efecto fue mayor con 20 que con 1 min de IMO previa. Para otros detalles ver resultados.

La experiencia previa con la IMO también modificó significativamente la respuesta de la corticosterona a la segunda IMO y la dinámica de recuperación (Figura 20B). Puesto que se observó con el ANOVA una interacción significativa E x T, se realizaron comparaciones a posteriori, independientemente de la inyección de ACTH. Estas comparaciones revelaron que: (a) la exposición previa a la IMO incrementó significativamente la corticosterona plasmática justo después de la IMO ( $p < 0.011$ ), siendo el efecto observado tanto en ratas previamente expuestas a 1 min como en las expuestas a 20 min de IMO el día 1 ( $p < 0.004$  y  $p < 0.05$  vs controles, respectivamente); (b) la exposición previa a 20 min de IMO (pero no 1 min IMO) el día 1, dio lugar a niveles más bajos de corticosterona 45 min después de finalizada la segunda exposición al estrés ( $p < 0.01$  vs controles); (c) a los 90 min post-IMO también se observaron niveles más bajos de corticosterona tanto en los expuestos a 1 min como en los expuestos a 20 min de estrés ( $p < 0.004$  y  $p < 0.001$  vs controles, respectivamente). En este último caso, el efecto fue superior en los expuestos a 20 min de IMO (prueba SNK).

## **IIc DISCUSIÓN**

### Efectos a largo plazo del eje HPA

Los resultados presentados en esta serie de experimentos confirman que una sola exposición a un estímulo de elevada intensidad como la IMO reduce la respuesta del eje HPA al mismo estrés aplicado días más tarde (ver resultados capítulo I, (171), dando lugar a una más rápida recuperación de los niveles basales de ACTH y corticosterona plasmática después de finalizada la segunda exposición al estrés. Además, aportan evidencias de que la liberación de glucocorticoides durante la primera exposición a la IMO podría estar parcialmente involucrada en la inducción de los efectos a largo plazo de la IMO sobre el eje HPA.

Los resultados obtenidos en el experimento 3 nos permitieron confirmar la ausencia de efectos a largo plazo de una sola exposición a la IMO sobre el eje HPA en animales ADX+B. La ausencia de efectos a largo plazo sugiere que los glucocorticoides están involucrados en estos efectos. Aunque la primera exposición a la IMO disminuyó momentáneamente la ingesta de bebida en ratas ADX+B, con la consiguiente reducción en la ingesta de corticosterona, no parece probable que esto hubiera inducido una adrenalectomía funcional, dado que el efecto fue significativo sólo en los días posteriores a la IMO. Puesto que el uso de animales ADX+B no nos permitía saber si los glucocorticoides estaban implicados en la inducción de los efectos a largo plazo o en la liberación de corticosterona durante el segundo estrés, diseñamos dos nuevos experimentos usando la metirapona o el RU38486. La metirapona es un inhibidor de la síntesis y liberación de corticosterona tras el estrés, mientras que el RU38486 es un bloqueante de los GR. Ambos fármacos fueron administrados únicamente el día 1 del experimento.

En el día 1, la administración de metirapona causó una inhibición de la liberación de corticosterona después de la IMO y altos niveles de ACTH antes de la exposición a la IMO, que no se modifican después de la exposición. Es posible que los niveles de ACTH después de la administración de metirapona sean tan elevados que la hipófisis sea incapaz de responder a un estímulo estresante incluso de intensidad elevada como la

IMO. El RU38486 no modificó la respuesta de la ACTH a la primera IMO, pero provocó un ligero incremento de la respuesta de corticosterona en todos los tiempos. No conocemos que se haya descrito un efecto específico de la administración de RU38486 sobre la secreción de corticosterona que sea independiente de la ACTH. Sin embargo, se acepta la existencia de mecanismos de regulación adrenal parcialmente independiente de la ACTH (291) y nuestros resultados serían un ejemplo más de esta disociación ACTH/corticosterona, pero también sugieren que existen influencias moduladoras sobre las glándulas adrenales que podrían ser mediadas por la actuación de los GR.

En el día 8, de nuevo observamos que los animales tratados con vehículo y expuestos a la IMO el día 1 mostraban una recuperación acelerada de los niveles basales de ACTH y corticosterona en respuesta a la IMO del día 8. Mientras la administración de metirapona el día 1 no alteró *per se* la respuesta del eje HPA a la IMO del día 8 en ratas sin experiencia previa con la IMO, el fármaco sí redujo los efectos a largo plazo de la primera IMO sobre la respuesta del eje HPA al segundo estrés. Estos resultados nos permiten sugerir que los glucocorticoides estarían participando en la inducción del fenómeno. La administración de RU38486 el día 1 también redujo los efectos a largo plazo de la IMO previa, pero el efecto fue menor que el observado con la administración de metirapona.

Desconocemos la razón de que el RU38486 fuera menos eficaz que la metirapona a pesar de que la dosis de RU38486 que utilizamos fue considerablemente alta. Estas discrepancias entre los efectos de la metirapona y el RU38486 podrían ser explicada asumiendo que los efectos a largo plazo de la corticosterona pudieran ser parcialmente debidos a un efecto de los esteroides asociados a receptores no genómicos. En los últimos años, se han encontrados evidencias que sugieren que la acción de los glucocorticoides podrían estar relacionados con receptores de membrana o interaccionar con receptores para neurotransmisores (ver revisión Makara et al.) (162). Es muy probable que los mecanismos de retroinhibición rápido de los glucocorticoides estén, precisamente, asociados con receptores no-genómicos de glucocorticoides.

Tomandos en conjunto, todos estos resultados sugieren que la liberación de glucocorticoides inducida por la exposición a la IMO es uno de los factores implicados en la inducción de los cambios a largo plazo de la respuesta del eje HPA al mismo estrés. Aunque sólo hemos sido capaces de bloquear parcialmente la inducción de los efectos a largo plazo de la IMO con metirapona y esto podrían cuestionar la importancia de los glucocorticoides en la inducción de los efectos a largo plazo de la IMO, conviene no olvidar que el fenómeno parece muy resistente al bloqueo de distintos sistemas de neurotransmisión (datos no publicados).

Puesto que los resultados de los experimentos anteriores sugerían que los glucocorticoides estaban, al menos, parcialmente implicados en la inducción de los efectos a largo plazo de la IMO, dedujimos que una breve exposición al estrés incapaz de generar por sí misma cambios a largo plazo en el eje HPA podría inducir estos efectos si iba acompañada de una liberación sostenida de glucocorticoides. En el experimento 6, estudiamos los efectos a largo plazo de la exposición a 0, 1 y 20 min de estrés, acompañada de una liberación sostenida corticosterona inducida por la administración de una preparación de ACTH de larga duración.

En el día 1, la exposición a 1 min de IMO no causó incremento en la liberación ACTH, mientras que sí se observó un incremento con 20 min de IMO. Por el contrario, 1 min de IMO bastó para elevar los niveles de corticosterona. El que no hayamos observado un aumento en la respuesta de la ACTH con 1 min de IMO podría deberse a la naturaleza transitoria del cambio y a la diferente dinámica de respuesta de la ACTH y la corticosterona. Si decidimos tomar muestra de sangre a los animales varias horas después de finalizada la exposición al estrés el día 1 fue para demostrar que la administración de ACTH de larga duración efectivamente causaba una activación de la secreción de corticosterona. Y efectivamente, la eficacia de la inyección de ACTH se puso de manifiesto con los altos niveles de corticosterona observados en todos los animales tratados con ACTH aún 260 min después de la inyección.

Aunque la administración de ACTH no interfirió con los efectos a largo plazo de la IMO, sí causó una reducción marginalmente significativa de la respuesta de la ACTH a la IMO del día 8. Por el contrario, este efecto no se observó con la corticosterona, probablemente debido a una saturación de la capacidad de la adrenal para sintetizar corticosterona bajo el efecto de los altos niveles de ACTH alcanzados al final del estrés. No se disponen de datos en la literatura acerca de efectos a largo plazo de una sola administración de ACTH, pero Schmidt et al. (1997) (249) han observado que el bloqueo transitorio de la activación del eje HPA mediante anticuerpos contra CRH incrementa a largo plazo los niveles de AVP en la capa externa de la eminencia media. Puesto que el incremento en los niveles de AVP en la eminencia media están frecuentemente asociados a una sensibilización del eje HPA (250, 282), la liberación prolongada de corticosterona causada por la administración de ACTH podría haber provocado cambios en el eje HPA en un sentido opuesto a los observados por Schmidt et al. dando lugar a una reducción de la respuesta de la ACTH al estrés (desensibilización).

La exposición previa a la IMO (día 1) produjo un aumento de la velocidad de recuperación de los niveles de ACTH y corticosterona cuando los animales fueron expuestos al mismo estrés una semana más tarde. Este aumento en la velocidad de recuperación de los niveles basales de corticosterona fue evidente a pesar de los altos niveles de corticosterona alcanzados después de la IMO en aquellos animales previamente expuestos al estrés el día 1. Esta mejor recuperación fue significativa tanto en el caso de animales que habían sido expuestos a 1 min como en los de 20 min de IMO, aunque el efecto fue mayor en los animales expuestos 20 min. Por lo tanto, incluso 1 min de IMO es capaz de inducir efectos a largo plazo sobre el eje HPA.

La inyección de ACTH el día 1 no potenció los efectos a largo plazo de 1 o 20 min de IMO sobre la respuesta del eje HPA al mismo estrés el día 8. En los animales no tratados con ACTH (vehículo) el efecto de 1 min de IMO fue de menor magnitud que el de 20 min, razón por la cuál la falta de efecto de la administración de ACTH no puede explicarse por un efecto techo del estrés. Por lo tanto, un aumento de la liberación de corticosterona durante el primer día de estrés no parece capaz de potenciar los efectos a largo plazo de la exposición a la IMO. Sin embargo, teniendo en cuenta que en ratas ADX+B no se observó efectos a largo plazo de la exposición previa con la IMO (experimento 2 y 3) y que la supresión de la liberación de corticosterona (con metirapona) el día 1 redujo parcialmente los efectos a largo plazo de la IMO previa, podríamos concluir que una cantidad mínima de corticosterona en plasma es necesaria para inducir parcialmente los efectos a largo plazo de la IMO, pero un incremento

adicional no tiene consecuencia ninguna. En función de los resultados, no parece que los efectos a largo plazo de la IMO sobre el eje HPA muestren una respuesta en U invertida, característica de los efectos de los glucocorticoides sobre distintos tipos de aprendizaje (ver Introducción al capítulo).

El hecho de que una exposición tan breve a la IMO como es 1 min, sea capaz de inducir cambios adaptativos a largo plazo no deja de ser sorprendente. Con otros tipos de aprendizaje, como la evitación pasiva, es posible observar la existencia de una memoria a largo plazo tras una única experiencia de los animales con el choque eléctrico (190) y, por lo tanto, podría ser que una breve exposición a la IMO fuera suficiente para consolidar la memoria acerca de la situación. Sin embargo, es más sorprendente que esta memoria se traduzca en una menor respuesta del eje HPA, lo que implica muy probablemente el desarrollo de mecanismos adaptativos frente a situaciones de estrés. De hecho, no hay datos en la literatura referentes a un efecto protector de una única y breve exposición al estrés sobre la respuesta fisiológica a la misma situación, salvo los resultados publicados por nuestro grupo (171). De nuestros resultados parece deducirse que una única exposición a un estrés intenso, es capaz de inducir efectos protectores sobre las consecuencias fisiológicas de otra exposición semejante, y además, la potenciación de la liberación de corticosterona mientras los animales experimentan la situación estresante no incrementa los efectos a largo plazo.

Hasta el momento no conocemos las razones de las discrepancias entre la desensibilización del eje HPA observada por nosotros y la sensibilización encontrada por el grupo de Tilders (250, 251, 282). Sin embargo, es probable que nos encontremos con dos fenómenos diferentes relacionados con el estrés; que comparten el hecho de que los cambios en el eje HPA se van activando con el tiempo, pero difieren en la dirección de los cambios y en su especificidad. Respecto a este último punto, nosotros observamos en los experimentos previos que la exposición a la IMO el día 1 no mejoró la recuperación del eje HPA después de la exposición un nuevo estímulo estresante (nado) el día 8. El hecho de que los efectos a largo plazo sean específicos para el tipo de estímulo estresante con el cuál los animales han tenido una experiencia previa van en contra de la hipótesis de que los efectos a largo plazo de la IMO sean debido a cambios en los mecanismos de retroinhibición de los glucocorticoides sobre el eje HPA y, de hecho, los estudios de los efectos a largo plazo de una sola exposición al estrés sobre los receptores de corticosteroides han dado resultados conflictivos (28, 144, 282).

#### Efectos a largo plazo sobre la Ingesta

La exposición al estrés sabemos causa alteraciones comportamentales, endocrinas y fisiológicas en el organismo, pero sólo algunas de estas variables son sensibles a determinados estímulos estresantes debido a su intensidad y duración (170). La ingesta es precisamente una de estas variables (167, 175). Decidimos por lo tanto estudiarla, para conocer si la influencia de la exposición previa al estrés causa cambios a largo plazo, en otras variables diferentes al eje HPA.

En respuesta a la IMO el día 1 hemos observado un descenso de la ingesta muy acentuado en las primeras 24 horas post-estrés, con una recuperación progresiva a lo largo de los días, aunque en ocasiones no llega a recuperarse totalmente antes de la segunda exposición a la IMO del día 8. Estos datos coinciden esencialmente con los

encontrados previamente en nuestro laboratorio en respuesta a la IMO (167, 281). En el experimento 3, utilizando animales ADX+B, la adrenalectomía no tuvo un efecto importante ni sobre el nivel normal de ingesta ni sobre las consecuencias de la exposición a la IMO, aunque hubo una tendencia a recuperarse más rápidamente en los animales ADX+B. Si bien se ha demostrado una reducción de la ingesta en animales ADX, particularmente después del estrés (106), los efectos de la ADX sobre el organismo son muy distintos que los de la ADX seguida de suplementación con corticosterona.

En respuesta a la IMO del día 8, observamos que los animales con una experiencia previa con la IMO mostraron un menor grado de anorexia que los controles en los tres días siguientes al estrés. Este efecto protector de la experiencia previa con la IMO sobre la anorexia fue independiente de la adrenalectomía. Estos resultados demuestran por primera vez efectos a largo plazo de una exposición previa a la IMO sobre la anorexia inducida por una nueva exposición a la misma situación estresante.

La administración de metirapona el día 1 redujo la ingesta en las 24 h siguientes a la inyección y lo mismo hizo la IMO, sin que se observara una interacción entre el efecto de ambas. El efecto de la metirapona sobre la ingesta podría deberse a un efecto central del fármaco ya que se ha observado también con la administración intracerebroventricular (108). Si bien el efecto de la metirapona desapareció tras las primeras 24 h, el efecto de la IMO continuó siendo significativo e independiente de la administración del fármaco. La administración de RU38486 no tuvo efecto alguno sobre la ingesta del día 1 ni en los animales controles ni en los expuestos a la IMO, que causó efectos similares a los de los experimentos anteriores. La ausencia de efectos del RU38486 concuerda con lo observado por otros autores (67, 96). Ni la metirapona ni el RU38486 administrados el día 1 tuvieron efecto alguno sobre la protección causada por la IMO del día 1 sobre los efectos anoréxicos de la segunda exposición. Lo que viene a confirmar que los glucocorticoides no parecen implicados en el efecto protector de una experiencia previa con la IMO sobre la respuesta a la segunda exposición. A conclusiones similares podemos llegar en el experimento de administración de ACTH. Lo más interesante de este último experimento fue que bastó una exposición a 1 min de IMO en el día 1 para inducir una protección sobre los efectos anoréxicos de la IMO del día 8 y que los efectos fueron indistinguibles de los observados en el grupo expuesto a 20 min de IMO el día 1.

Todos estos resultados demuestran que la manipulación farmacológica de los niveles de glucocorticoides es incapaz de modular el impacto de una exposición previa a la IMO sobre la ingesta. Puesto que la manipulación de los niveles de glucocorticoides si fue capaz de reducir, al menos parcialmente, los efectos de una exposición previa a la IMO, parece evidente que los mecanismos neurobiológicos implicados en los efectos a largo plazo de la IMO sobre el eje HPA y sobre la ingesta son, al menos parcialmente, diferentes. Estas diferencias vienen apoyadas por el hecho de que los efectos a largo plazo de 1 min de IMO fueron mucho menores que los de 20 min en el caso del eje HPA, pero fueron de igual magnitud en el caso de la ingesta. El conocimiento de los mecanismos que controlan la anorexia inducida por el estrés podría ser de gran utilidad para el conocimiento de las diferencias con el eje HPA. Desafortunadamente, los mecanismos que controlan la anorexia inducida por el estrés no están bien caracterizados. Si bien diversos laboratorios han demostrado que el CRF parece estar implicado en la anorexia inducida por situaciones de estrés similares a la IMO (103, 256, 259), ratones KO para el CRF muestran una anorexia similar a la de los ratones



normales (269), quizás debido al desarrollo de mecanismos compensatorios en los KO. Otros resultados apuntan a un papel, al menos parcial, del receptor MC4, al cual se unen la ACTH y péptidos afines (288) o de la transmisión serotoninérgica (257).

En función de los resultados obtenidos, podemos concluir que la ingesta parece ser un parámetro más sensible a los efectos a largo plazo que el eje HPA. Sin embargo, es importante tener en cuenta que un aspecto fundamental de los efectos a largo plazo sobre el eje HPA, como es la maduración progresiva con el tiempo, no puede estudiarse con la ingesta debido al tiempo que tardan los animales en recuperar sus niveles normales de ingesta. Queda por determinar si ambos fenómenos presentan características similares.

### **CAPITULO III**

**¿Es el miedo/ansiedad un posible inductor de los efectos a largo plazo del estrés sobre el eje HPA?**

### III a. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Nuestros resultados indican que los efectos a largo plazo aparecen con estímulos estresantes de elevada intensidad como la IMO y no con otros más suave como el nado, por lo que parece posible que la aparición de este fenómeno pueda estar relacionado únicamente con la exposición a estímulos aversivos de cierta intensidad. Existen pocos antecedentes de una mejora del aprendizaje con el tiempo, pero Hubber y Deutchs (1969) habían observado, usando una prueba de evitación activa en un laberinto en Y, que la ejecución de las ratas mejoraba con el tiempo (104). Teniendo en cuenta que el tipo de tarea estudiada por Hubber y Deutchs utilizaba el choque eléctrico como estímulo aversivo y que, además, los glucocorticoides sólo parecen estar parcialmente implicados en la inducción de los efectos a largo plazo de la IMO, es posible una contribución del miedo/ansiedad creado durante la situación como un factor responsable de la memoria acerca de estas situaciones aversivas.

La mayor parte de las investigaciones sobre las bases neuroquímicas del miedo/ansiedad se han centrado alrededor del GABA y de su receptor GABA-A (93). El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC. Ejerce su acción mediante la unión a dos clases de receptores; GABA-A y GABA-B, que difieren en sus propiedades farmacológicas, electrofisiológicas y bioquímicas (198). El receptor GABA-B es un receptor de tipo metabotrópico (acoplado a proteínas G) que abre canales de  $K^+$ ; en cambio, el receptor GABA-A inhibe la actividad neuronal por la apertura de canales de  $Cl^-$ . El receptor GABA-A es un oligomero formado por diversas subunidades polipeptídicas, habiéndose descrito 6:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\rho$ . La combinación específica de estas subunidades determina la farmacología del receptor. Este complejo receptor incluye cinco lugares de unión localizados cerca o en el interior del canal de  $Cl^-$  a los cuales se unen, en lugares diferentes, el GABA, las benzodiazepinas, los barbitúricos, la picrotoxina y los esteroides. El GABA es el directo responsable de la apertura del canal de  $Cl^-$ , pero algunas de los lugares de unión comentados, como es el caso de las benzodiazepinas modulan la respuesta del receptor al GABA. Las benzodiazepinas pueden ser de tres clases: agonistas, que inducen una modulación alostérica positiva de los efectos del GABA sobre el canal de  $Cl^-$ , agonistas inversos, que inducen una modulación negativa de los efectos del GABA sobre el canal de  $Cl^-$ , y antagonistas que se unen al receptor sin tener efecto sobre el canal de  $Cl^-$ , pero antagonizan el efecto de los agonistas y de los agonistas inversos. Entre los agonistas podemos destacar el diazepam y el clordiazepóxido, y entre los agonistas inversos las  $\beta$ -carbolinas como el FG7142. Mientras que los agonistas tienen efectos ansiolíticos, los agonistas inversos tienen propiedades altamente ansiogénicas.

La existencia de estos ligandos sugiere que debe haber sustancias endógenas que actúan de igual manera (47, 61) produciendo respuestas de tipo ansiogénicas o ansiolíticas. Sin embargo, la importancia real de las moléculas caracterizadas hasta el momento como posibles ligandos endógenos del lugar de unión para las benzodiazepinas no se conoce aún. A pesar de ello, existen algunas pruebas indirectas que sugieren que estos posibles ligandos endógenos existen. Algunos de los resultados más interesantes fueron obtenidos por Bodnoff et al (23). En este experimento, ratas privadas previamente de comida fueron expuestas a un ambiente nuevo, en el centro del cual se situó una placa conteniendo alimento. Debido a la novedad de la situación, las

ratas privadas de comida mostraban inicialmente una larga latencia antes de comenzar a comer; sin embargo, esta latencia se redujo cuando los animales fueron tratados previamente con diazepam o expuestos diariamente a la misma situación. Cuando los animales ya habituados al ambiente nuevo fueron tratados con FG7142 o con un antagonista del receptor de benzodiazepinas (flumazenil) la latencia volvió a incrementarse considerablemente. Estos datos sugieren que en el proceso de habituación a la novedad debe estar involucrada la liberación de un compuesto endógeno ansiolítico que se une al receptor GABA-A en el lugar de unión para las benzodiazepinas.

Además de participar en el control de la ansiedad, el GABA podría ejercer un papel importante en el control de la actividad del eje HPA, especialmente si tenemos en cuenta que el PVN recibe importante inervación GABAérgica (99). Sin embargo, los efectos de las benzodiazepinas son contradictorios. Parece evidente que a dosis moderadas, las benzodiazepinas como el clordiazepóxido y el diazepam son capaces de inhibir la liberación de corticosterona en respuesta a situaciones estresantes de intensidad moderada (v.g. (136, 202), pero es más discutible que tengan efectos en respuesta a situaciones de estrés de mayor intensidad (v.g. (168). Por otro lado, se ha observado que a dosis altas, estos compuestos son capaces por sí mismos de activar el eje HPA (52, 179), lo que complica extraordinariamente la interpretación de los resultados obtenidos tras una exposición ulterior al estrés. Este efecto estimulador podría ejercerse a través de un mecanismo independiente de la interacción con el receptor GABA-A (285). Tomados en conjunto, los resultados indican que el bloqueo de la ansiedad causada por una situación estresante no tiene porqué estar necesariamente ligado a un bloqueo de la activación del eje HPA.

Existe alguna evidencia experimental de que la transmisión GABAérgica podría participar en los efectos a largo plazo de manipulaciones experimentales o farmacológicas sobre el eje HPA. Antelman et al (1988) observaron que la exposición a una situación estresante era capaz de bloquear algunos efectos fisiológicos del diazepam, incluyendo la respuesta del eje HPA, un mes después de la exposición al estrés (7). Por otro lado, Van Dijken et al 1992 observaron efectos a largo plazo (14 días) de la exposición al choque eléctrico sobre el comportamiento en ambientes nuevos y estos cambios fueron parcialmente revertidos por fármacos ansiolíticos (diazepam) pero no por antidepressivos (284), lo que sugiere una implicación del receptor GABA-A en estos efectos conductuales. Efectos ansiogénicos a largo plazo se han observado también tras la exposición de ratas a uno de sus depredadores naturales, el gato (2) y por la simple administración de un agonista inverso de las benzodiazepinas como el FG7142 (3).

Sobre la base de los datos comentados, parece posible que la inducción de los efectos a largo plazo, que es directamente proporcional a la intensidad de la situación estresante, podría estar relacionada con el nivel del miedo/ansiedad causado por la exposición a la situación estresante. Para demostrar esta hipótesis, en este tercer capítulo nos centramos en la manipulación farmacológica de los niveles de miedo/ansiedad causados durante la primera exposición al estrés mediante la administración de fármacos ansiogénicos (FG7142) o ansiolíticos (diazepam) relacionados al receptor GABA-A.

### III b. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

#### **Experimento 7: Influencia del ansiogénico FG7142 sobre los posibles efectos a largo plazo de la exposición al nado forzado.**

Puesto que los resultados obtenidos en los capítulos anteriores parecen indicar que los efectos a largo plazo podrían estar relacionado con un tipo especial de aprendizaje ligado a estímulos aversivos, nuestra hipótesis es que la inducción del fenómeno dependería no sólo de la liberación de glucocorticoides causada por la primera exposición al estrés, sino también del nivel de miedo/ansiedad producido por la situación. Elegimos el nado por ser un estímulo estresante de intensidad media sin efecto a largo plazo por sí mismo, esperando que la administración previa de FG7142 incrementara los niveles de ansiedad y por lo tanto aparecieran los efectos a largo plazo.

Utilizamos 32 ratas distribuidas al azar en 4 grupos experimentales (n=8): 1/vehículo, 2/ FG, 3/ veh+nado y 4/ FG+nado. La dosis de FG administrada fue de 10 mg/kg. Puesto que los datos en la literatura indican que los agonistas inversos de las benzodiazepinas son capaces, por sí mismos, de activar el eje HPA (49, 52, 72, 264), el día 1 se administró FG7142 o vehículo y 30 min después se tomó una única muestra de sangre a todos los animales para demostrar que efectivamente había activación del eje HPA con la dosis de FG administrada. Posteriormente algunos de los animales fueron expuestos a 20 min de nado, mientras que los del grupos control fueron devueltos al estabulario. Todos los animales permanecieron en el estabulario sin recibir ninguna manipulación experimental hasta el día de la segunda exposición al nado (día 8). Ese día, todos los animales fueron expuestos al nado durante 20 min y se tomaron muestras de sangre justo antes del nado, justo después del nado y a los 30 y 60 min de finalizado el nado. Se midió la temperatura rectal (TR) antes y después del nado.

#### **Resultados**

La administración de FG7142 el día 1 produjo un incremento altamente significativo de los niveles basales de ACTH y corticosterona 30 min después de su administración ( $p < 0.001$  en ambos casos, datos no mostrados). No se observó efecto ni el FG7142 ni del nado sobre los niveles de ingesta (datos no mostrados).

El efecto de la experiencia previa con el nado sobre la dinámica de respuesta de la ACTH y corticosterona a una nueva exposición al nado el día 8 se estudió mediante un ANOVA de tres factores: fármaco (F) y experiencia previa con el nado (N) fueron los factores entre sujeto y el factor tiempo de toma de muestra (T) el factor intra-sujeto (medidas repetidas). Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Efecto del FG7142 y el nado el día 1 sobre la respuesta de la ACTH y corticosterona al nado el día 8: Resultados del ANOVA de tres factores.

FACTOR	ACTH	CORTICOSTERONA
Experiencia previa con el nado(N)	NS	NS
Fármaco (F)	NS	NS
Tiempo de toma de muestra (T)	P< 0.001	P<0.001
N x F	NS	NS
N x T	NS	NS
F x T	NS	NS
N x F x T	NS	NS

El ANOVA de tres factores reveló que no hubo efecto significativo del FG7142 sobre los niveles de ACTH y corticosterona en respuesta al nado. Solo se encontró efecto significativo para el factor tiempo de toma de muestra ( $p<0.001$ ) en las dos hormonas, no encontrándose tampoco significación alguna en las interacciones entre los factores (Figura 22 A y 22B).

La hipotermia causada por el nado se analizó mediante un ANOVA de dos factores. Los resultados revelaron que la hipotermia estuvo reducida tras una nueva sesión de nado ( $p<0.03$ ) el día 8 comparada con los grupos sin experiencia previa, sin que el FG7142 tuviera efecto alguno (Figura 21).

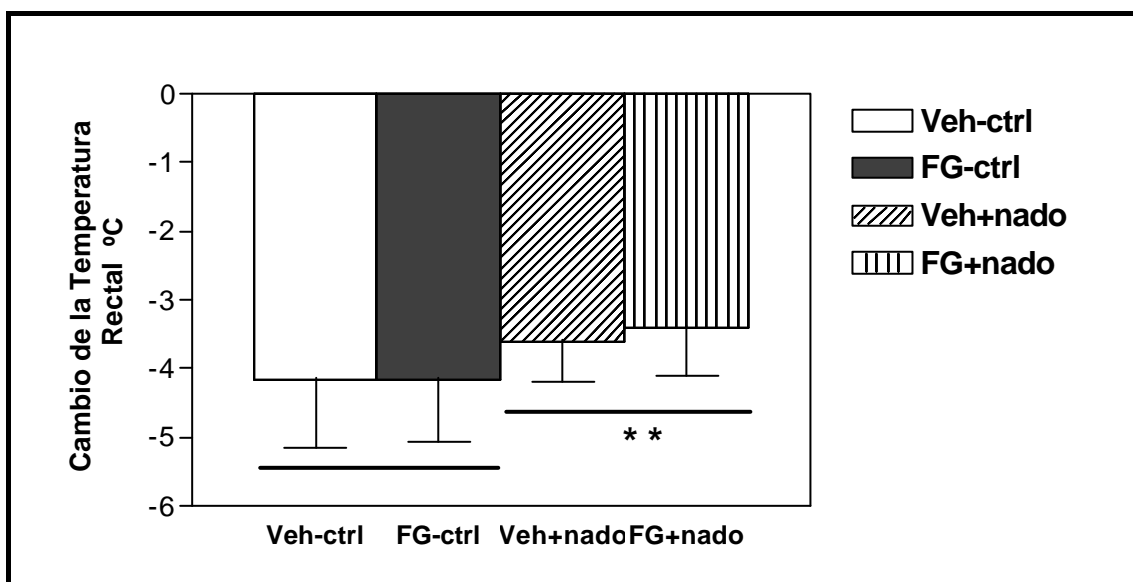
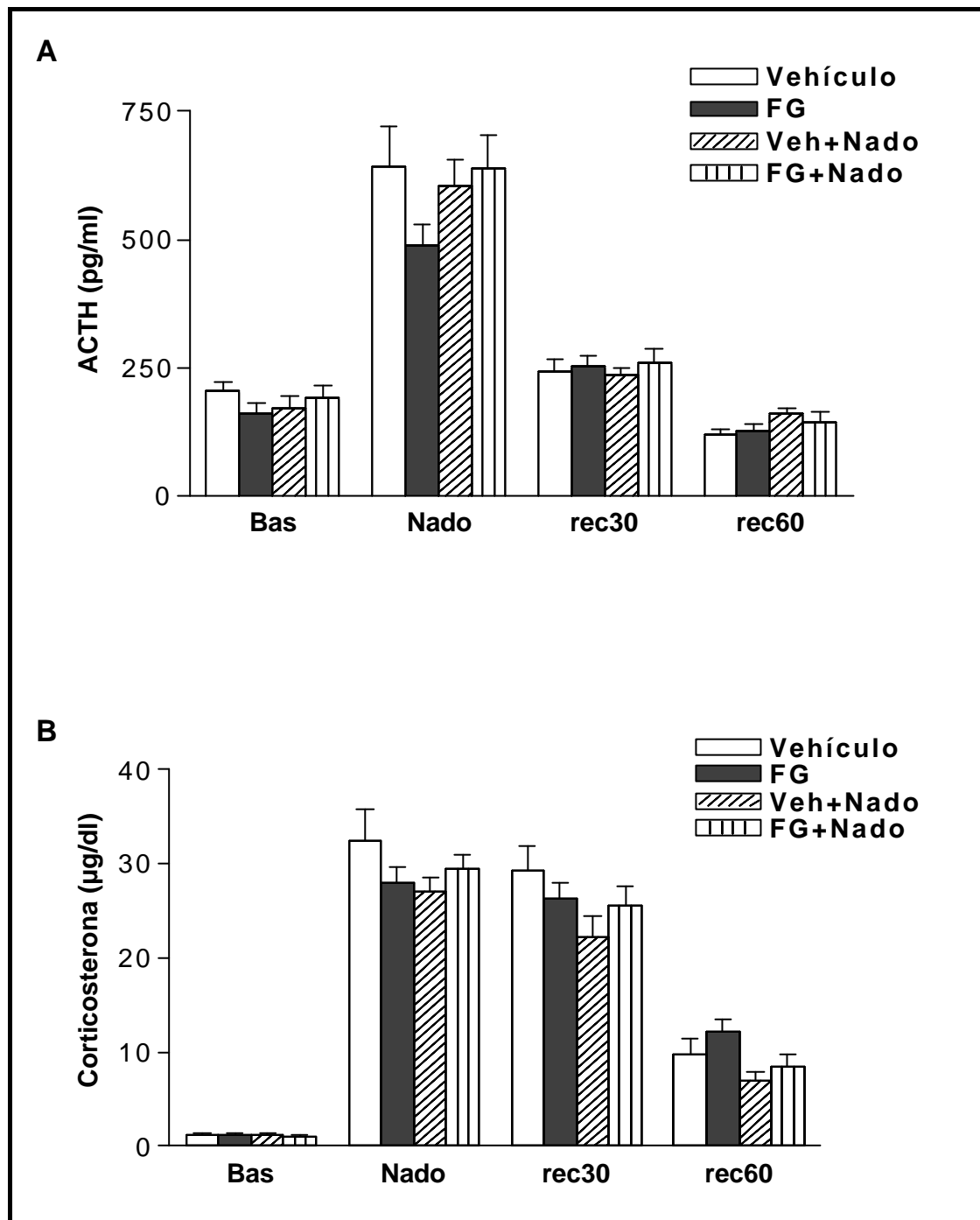


FIGURA 21: Efecto del tratamiento con FG7142 y la exposición al nado el día 1 sobre la hipotermia causada por una nueva exposición al nado el día 8. Se indica la media  $\pm$  SEM ( $n=8$  por grupo) de los cambios en la temperatura rectal antes y después del nado. Los grupos se refieren al tratamiento el día 1, porque el día 8 todos los grupos fueron expuestos al nado. El ANOVA reveló un efecto significativo de la experiencia previa con el nado (\*\*  $p<0.03$ ), pero no del fármaco.



**FIGURA 22:** Efecto del tratamiento con FG7142 y la exposición al nado el día 1 sobre la respuesta del eje HPA a una nueva exposición al nado el día 8. Los grupos se refieren al tratamiento del día 1, dado que el día 8 todos los grupos fueron expuestos al nado. Las muestras fueron tomadas justo antes (basales, Bas) y justo después del nado y a los 30 y 60 min de finalizado la exposición al nado (Rec30 y Rec60). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=8). El ANOVA no reveló efecto ni del tratamiento previo con FG ni de la experiencia previa con el nado.

### **Experimento 8: Efecto del ansiolítico diazepam sobre los efectos a largo plazo de la exposición a la IMO.**

Los resultados del experimento anterior no aportaban ninguna prueba positiva de un posible papel del del miedo/ansiedad como inductor de los efectos a largo plazo del estrés agudo. Cabía la posibilidad de que el tratamiento con FG7142 no hubiera permitido alcanzar un nivel de ansiedad equiparable al de una situación estresante mucho más potente como la IMO. Por ello, en el siguiente experimento decidimos cambiar de estrategia e intentar reducir el nivel de ansiedad creado por la IMO mediante la administración previa de un fármaco ansiolítico como el diazepam. Se escogió una dosis de diazepam a la cual se han observado de manera consistente efectos ansiolíticos.

Utilizamos 26 ratas distribuidas al azar en 4 grupos experimentales (n=5-8): 1/ vehículo, 2/ diazepam, 3/ vehículo + IMO y 4/ diazepam + IMO. El día 1 se administró diazepam (2 mg/kg) o vehículo y 30 min después se tomó una única muestra de sangre. Posteriormente algunos animales fueron expuestos a 20 min de IMO y los grupos control fueron devueltos al estabulario. Todos los animales permanecieron en el estabulario sin recibir ninguna manipulación experimental hasta el día de la segunda exposición a la IMO (día 8). Este día, todos los animales fueron expuestos a la IMO durante 20 min y se tomaron muestras de sangre después de la IMO y a los 45 y 90 min de finalizado el estrés. No se tomaron las muestras basales, dado que, en función de los resultados anteriores, era evidente que los niveles basales no cambiaban como consecuencia de la experiencia previa con la IMO.

### **Resultados**

La dosis de diazepam administrada el día 1 incrementó significativamente los niveles basales de ACTH y corticosterona ( $p < 0.001$  en ambos casos) 30 min después de su administración (datos no mostrados). Los ANOVAs de los efectos de la IMO del día 1 y del día 8 no revelaron efecto del tratamiento con diazepam sobre la ingesta, siendo los efectos de la IMO similares a los ya descritos en otros experimentos previos (datos no mostrado).

El efecto del diazepam y de la experiencia previa con la IMO sobre la dinámica de respuesta de la ACTH y corticosterona a la IMO del día 8 se estudió mediante un ANOVA de tres factores: Fármaco (F) y experiencia previa con la IMO (E) fueron los factores entre sujeto y el factor tiempo de toma de muestra (T) el factor intra-sujeto. El efecto de los factores y sus interacciones se muestran en la Tabla 18.



Tabla 18: Efecto del diazepam y la IMO previa del día 1 sobre los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona en respuesta a la IMO del día 8: Resultados del ANOVA de tres factores.

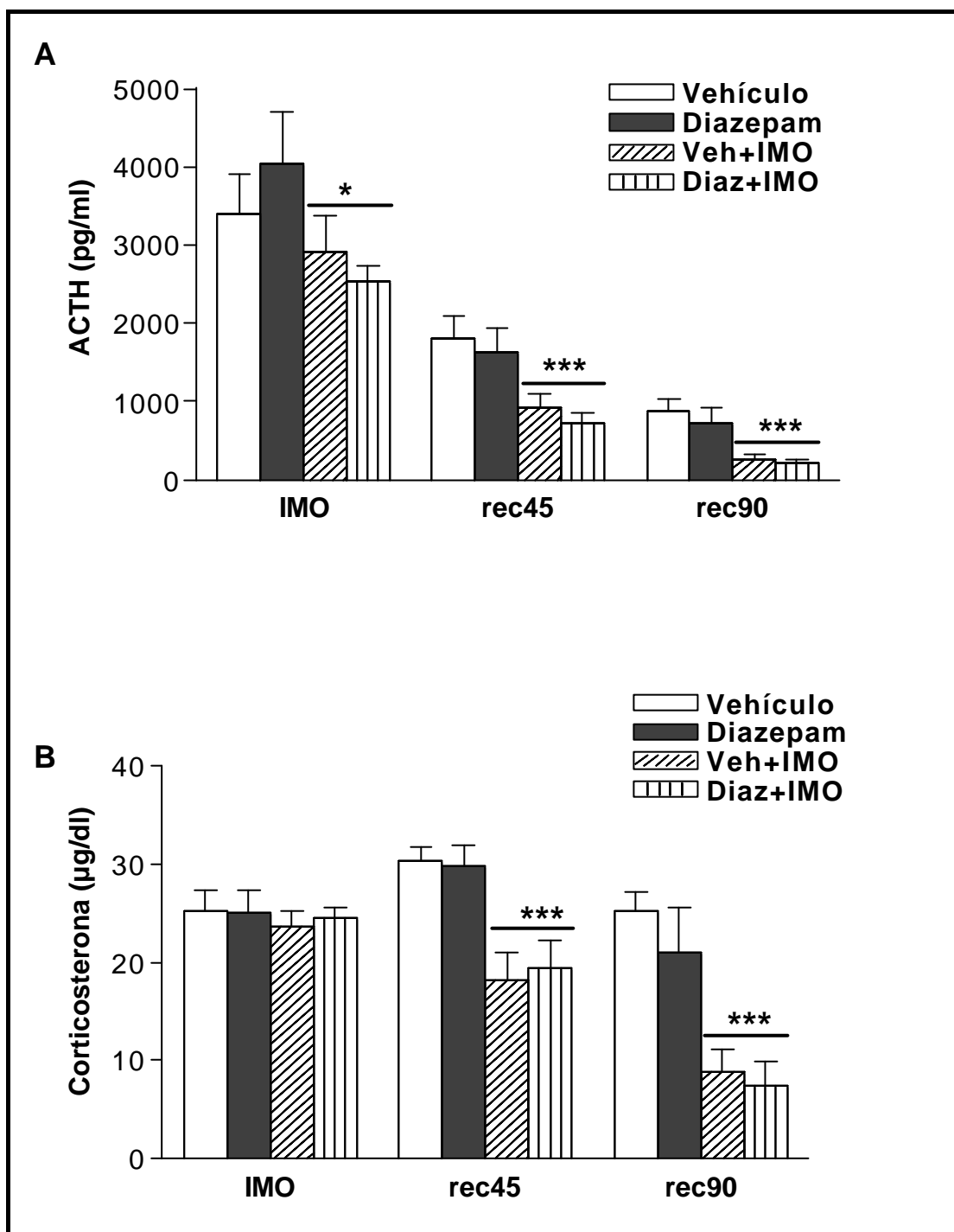
<i>FACTOR</i>	<i>ACTH</i>	<i>CORTICOSTERONA</i>
Experiencia previa con IMO (E)	P<0.001	P<0.001
Fármaco (F)	NS	NS
Tiempo de toma de muestra (T)	P<0.001	P<0.001
E x F	NS	NS
E x T	NS	P<0.001
F x T	NS	NS
E x F x T	NS	NS

El diazepam no tuvo efecto sobre los niveles de ACTH y corticosterona en respuesta a la segunda IMO, aunque sí se observó, como era de esperar, una disminución de la respuesta de la ACTH y la corticosterona en los animales con experiencia previa con la IMO. En el caso de la ACTH el efecto se observó tanto al acabar la IMO como en el período post-IMO, siendo algo menor el efecto justo al acabar la IMO que en el periodo de recuperación como revela las comparaciones de cada tiempo (ver Figura 23). En el caso de la corticosterona, como la interacción E x T para la corticosterona dio diferencias significativas, se realizaron comparaciones a posteriori para cada tiempo, independientemente del factor fármaco. Los análisis revelaron una disminución de la respuesta de la corticosterona a la IMO en función de la experiencia previa sólo en los tiempos de recuperación rec 45 y rec 90 min (p<0.001 en ambos casos).

### III d. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este capítulo indican que los niveles de miedo/ansiedad provocados por la situación estresante no parecen estar involucrados en la inducción de los efectos a largo plazo del estrés sobre el eje HPA. Hemos observado que, independientemente de los posibles cambios en el nivel de miedo/ansiedad causados por los fármacos administrados, ni el nado provocó efectos a largo plazo cuando los animales fueron nuevamente expuestos al mismo estrés, ni se modificaron los efectos a largo plazo de la IMO.

Como el fenómeno de efectos a largo plazo parece constituir un tipo especial de aprendizaje ligado a estímulos aversivos, sugerimos que los niveles de miedo/ansiedad causados por la primera exposición al estrés podrían estar implicados en la inducción de este fenómeno. Nuestra hipótesis estaba basada en los antedecentes comentados en la introducción del capítulo III. Esperábamos por tanto que la manipulación farmacológica de los niveles de miedo/ansiedad durante el primer estrés tuviera importantes consecuencias en la inducción de los efectos a largo plazo sobre el eje HPA.



**FIGURA 23: Efecto del tratamiento con diazepam y la exposición a 20 min de IMO el día 1 sobre la respuesta del eje HPA a una nueva exposición a la IMO 7 días más tarde.** Los grupos se refieren al tratamiento el día 1, porque el día 8 todos los grupos fueron expuestos a la IMO (20 min). Las muestras se tomaron justo después de la IMO y a los 45 y 90 min de finalizado la exposición a la IMO (Rec45 y Rec90). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=8). El ANOVA reveló un efecto significativo de la exposición previa a la IMO, pero no del diazepam (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs grupos sin experiencia previa con la IMO, dentro del mismo tiempo de toma de muestra).

Como observamos en el experimento 1 (capítulo I) un estímulo estresante de mediana intensidad como el nado fue incapaz de inducir efectos a largo plazo sobre el eje HPA, a pesar de una disminución de la respuesta de diferentes variables (hipotermia, conducta activa) a una segunda sesión de nado. La administración de FG7142 no tuvo efecto alguno sobre el eje HPA ni tampoco sobre la temperatura rectal (TR), demostrando que el efecto sobre esta variable fisiológica no se vio alterada por la manipulación farmacológica de los niveles de ansiedad. Puesto que nuestra hipótesis asumía que la administración de un fármaco ansiogénico como el FG7142 potenciaría los efectos ansiogénicos del nado y esto podría inducir efectos a largo plazo sobre el eje HPA, es evidente que dicha hipótesis no se ha cumplido. La razón de que el FG7142 no tuviera efecto podría haberse debido a que la dosis del fármaco utilizado no hubiera sido la apropiada para lograr un efecto ansiogénico o bien que los efectos a largo plazo dependieran de algún factor relacionado con la intensidad del estrés pero no del nivel de ansiedad causado por la situación. La dosis de FG7142 utilizada (10 mg/kg) ha demostrado ejercer un efecto ansiogénico comparable al de la exposición de animales a un ambiente nuevo (23) o al de la exposición de las ratas a un gato (3), y por tanto parece una dosis adecuada. Por otro lado, esta dosis fue también eficaz para causar por sí misma una activación del eje HPA similar a la descrita por otros autores (206).

En el experimento 8 utilizamos el diazepam como fármaco ansiolítico al objeto de reducir la ansiedad causada por la exposición a la IMO. Esperábamos que esta reducción de la ansiedad se tradujera en una reducción de los efectos a largo plazo de la IMO y por consiguiente en una modificación de la velocidad de recuperación de las hormonas en los tiempos post-IMO. Los resultados indican, de nuevo, que una exposición previa a la IMO fue suficiente para acelerar la recuperación post-estrés del eje HPA, pero el diazepam no tuvo el efecto esperado, ya que no redujo los efectos a largo plazo de la IMO sobre el eje HPA. Es de destacar que la administración de diazepam no afectó a los efectos de la IMO ni el primer día ni el día 8, lo que indica que ni los mecanismos de memoria acerca de la primera exposición a la IMO ni el efecto anoréxico de la IMO están relacionados con las benzodiazepinas y el receptor GABA-A.

En conjunto, los resultados obtenidos indican, que la magnitud de los efectos a largo plazo del estrés sobre el eje HPA dependen del tipo de estrés aplicado, puesto que observamos que se pone de manifiesto de forma muy evidente con la IMO pero no con el nado (ver capítulo 1, (85, 171) aunque no parece que la ansiedad generada por la situación sea el factor fundamental. De ser así, el diazepam debería haber revertido el fenómeno en respuesta a la IMO y el FG7142 debería haberlo inducido en respuesta al nado, en tanto que los resultados indican que ninguno de los fármacos utilizados tuvo efecto alguno sobre el patrón de respuesta del eje HPA.

Como se ha comentado previamente, diversas situaciones de estrés parecen causar un incremento a largo plazo de los niveles de ansiedad. Por otro lado, estos efectos a largo plazo sobre la ansiedad parecen ser bloqueados por la administración previa de fármacos ansiolíticos (284), lo que sugiere que la ansiedad está relacionada con la inducción de los efectos a largo plazo sobre la conducta. Sin embargo, nadie ha investigado si las benzodiazepinas y el receptor GABA-A están implicados en la inducción por el estrés de los cambios a largo plazo en la respuesta del eje HPA. Nuestros resultados indican que no lo están.