

LIC. EN MEDICINA  
ABIGAIL RAMOS  
SÁNCHEZ

EFFECTO DE LOS ESTRÓGENOS EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR  
SEROTONINÉRGICO 5-HT7 EN EL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL  
HIPOTÁLAMO EN RATAS OVARIECTOMIZADAS SOMETIDAS A ESTRÉS  
CRÓNICO

2019



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LOS ESTRÓGENOS EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR  
SEROTONINÉRGICO 5-HT7 EN EL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL  
HIPOTÁLAMO EN RATAS OVARIECTOMIZADAS SOMETIDAS A ESTRÉS  
CRÓNICO

## Tesis

Que como parte de los requisitos  
para obtener el grado de la

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NEUROMETABOLISMO

Presenta:

Lic. en Medicina Abigail Ramos Sánchez

Dirigido por:

Dra. Nancy Georgina Hernández



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

## FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LOS ESTRÓGENOS EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR  
SEROTONINÉRGICO 5-HT7 EN EL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL  
HIPOTÁLAMO EN RATAS OVARIECTOMIZADAS SOMETIDAS A ESTRÉS  
CRÓNICO

### Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de la  
**Maestría en Ciencias en Neurometabolismo**

#### Presenta:

Lic. en M. Abigail Ramos Sánchez

#### Dirigido por:

Dra. Nancy Georgina Hernández Chan

Dra. Nancy Georgina Hernández Chan

Presidente

Dra. Wendy Portillo Martínez

Secretario

Dra. Mónica Andrea López Hidalgo

Vocal

Dr. Julián Valeriano Reyes López

Suplente

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Octubre 2019

México

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres que siempre me apoyaron, a los profesores que contribuyeron a mi formación, a la Dra. Nancy G. Hernández Chan que me guio en todo momento, a la Universidad Autónoma de Querétaro por ser mi segunda casa, a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, que sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES Y FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	4
II.1 Estrés, homeostasis y alostasis.....	4
II. 2 Mecanismos neuroendocrinos de regulación del estrés.....	4
II. 3 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal: el Núcleo Paraventricular en la fisiología del estrés.....	5
II. 4 Aferencias y eferencias del Núcleo Paraventricular.....	8
II. 5 Serotonina y sus receptores: su implicación con el eje HHA.....	8
II. 6 Receptor 5-HT7 en el Núcleo Paraventricular y el eje HHA.....	10
II. 7 Dimorfismo sexual en el eje HHA: implicación del sistema serotoninérgico.....	12
II. 8 Dimorfismo sexual en el eje HHA: receptor $\beta$ de estrógeno en el NPV.....	15
III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	19
IV. HIPÓTESIS.....	20
V. OBJETIVOS.....	20
V. 1 Objetivo general.....	20
V. 2 Objetivos específicos.....	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
VI. 1 Tipo de investigación.....	21
VI. 2 Población/Animales.....	21
VI. 3 Muestra y tipo de muestra.....	21
VI. 3. 1 Criterios de selección.....	21
VI. 3. 2 Variables estudiadas.....	21
VI. 4 Técnicas e instrumentos.....	21
VI. 4. 1 Técnicas.....	21
VI. 4. 2 Instrumentos.....	21
VI. 5 Procedimientos.....	22
A. Ovariectomía y colocación de implante subdérmico.....	22
B. Protocolo de estrés por restricción.....	22
C. Peso corporal.....	23
D. Cuantificación hormonal: ACTH, corticosterona y estradiol.....	24
E. Inmunohistoquímica.....	24
VI. 5. 1 Análisis estadístico.....	25
VI. 5. 2 Consideraciones éticas.....	25

VII. RESULTADOS.....	27
VII. 1 Ganancia de peso corporal.....	27
VII. 2 Peso de glándulas adrenales.....	32
VII. 3 Cuantificación hormonal.....	34
VII. 3. 1 ACTH.....	34
VII. 3. 2 Corticosterona.....	37
VII. 4 Inmunohistoquímica del receptor 5-HT7.....	38
VIII. DISCUSIÓN.....	40
IX. CONCLUSIONES.....	46
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.....	6
Figura 2	Inmunohistoquímica del receptor 5-HT7.....	12
Figura 3	Inmunofluorescencia del receptor $\beta$ de estrógeno (ER $\beta$ ) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el NPV del hipotálamo.....	16
Figura 4	Protocolo de estrés por restricción.....	23
Figura 5	Ganancia de peso corporal.....	31
Figura 6	Peso de glándulas adrenales.....	32
Figura 7	Niveles hormonales	
	A. ACTH.....	35
	B. Corticosterona.....	35
Figura 8	Inmunohistoquímica del receptor 5-HT7 en el NPV del hipotálamo.....	39

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético  
5-HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina  
5-HT7: receptor 7 de serotonina  
8-OH-DPAT: 8-hydroxy-2-(di-n-propilamino)tetralina  
AADC: enzima L-descarboxilasa de aminoácidos aromáticos  
ACTH: hormona adrenocorticotrópica  
ARNm: ácido ribonucleico tipo mensajero  
AVP: arginina vasopresina  
CRH o CRF: hormona liberadora de corticotropina  
CTRL E2: control con estradiol  
CTRL Sham: control sin estradiol  
E2: estradiol  
EC E2: estrés crónico con estradiol  
EC Sham: estrés crónico sin estradiol  
ERE: elementos de respuesta a estrógenos  
GABA: ácido gamma aminobutírico  
GR: receptor de glucocorticoides  
HHA: hipotálamo-hipófisis-adrenal  
ISRS: inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina  
MAO: enzima monoaminoxidasa  
MR: receptor de mineralocorticoides  
NPV: núcleo paraventricular  
PKA: proteína cinasa A  
PLC $\beta$ : fosfolipasa C $\beta$   
RE $\alpha$ : Receptor de estradiol tipo  $\alpha$   
RE $\beta$ : Receptor de estradiol tipo  $\beta$   
SERT: transportador de serotonina  
SNA: sistema nervioso autónomo  
TPH: enzima triptófano hidroxilasa  
VMAT: transportador vesicular de monoaminas

## RESUMEN

El núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) es el activador del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) en el estrés. Diversos receptores de serotonina (5-HT) están involucrados en la liberación de ACTH, entre ellos el 5-HT7. El estrés crónico desregula el eje HHA y disminuye la expresión de 5-HT7 en el NPV en machos. El NPV expresa también al receptor de estrógeno beta. Los estrógenos potencian al eje HHA; se desconoce su efecto sobre la expresión de receptores de serotonina en el NPV de la hembra en el estrés crónico. Se evaluó la expresión del receptor 5-HT7 en el NPV, la ganancia de peso corporal, el peso de las glándulas adrenales, los niveles de ACTH y corticosterona en ratas ovariectomizadas con suplementación de estradiol y sometidas a estrés crónico (EC E2) o condición control (CTRL E2), así como grupos sin estrógeno (EC Sham y CTRL Sham). El grupo EC E2 tuvo la menor ganancia de peso corporal, mientras que el grupo CTRL Sham tuvo el mayor peso. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los grupos a partir del día 10 de exposición a estrés de restricción, y hasta el final del experimento ( $p < 0.001$ ). Al contrario, el grupo EC E2 presentó el mayor peso de la glándula adrenal y el grupo CTRL Sham, el menor. Los grupos sometidos a estrés presentaron significativamente mayor peso glandular respecto a sus controles ( $p < 0.01$ ). Los grupos en la condición de estrés crónico o control presentaron mayor peso adrenal en presencia de estrógeno ( $p < 0.001$ ). Los niveles basales de ACTH tendieron a ser mayores en los grupos con estrógeno respecto a los animales sin la hormona, alcanzando diferencias solo en los valores de los extremos ( $p < 0.001$ ). Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los niveles de corticosterona con una tendencia a tener valores mayores de la hormona en los grupos sin tratamiento estrogénico (EC Sham vs CTRL E2). La evaluación cualitativa sugiere que tanto la ausencia de estrógeno, como la exposición a estrés crónico disminuyen de la expresión del receptor 5-HT7 en el NPV.

**(Palabras clave:** núcleo paraventricular, estrés crónico, estradiol, corticosterona, ACTH, receptor 5-HT7).

## ABSTRACT

Paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN) is the HPA axis activator. PVN expresses several serotonin receptors involved in HPA control, such as (5-HT7). Chronic stress deregulates HPA axis while reducing 5-HT7 expression in PVN in males. Beta estrogen receptor is expressed in PVN, as well. Estrogen potentiates HPA activation during acute stress. It is unknown if estrogen may influence 5-HT7 expression in PVN during chronic stress in females. Body weight gain, adrenal weight, in addition to basal and 30-minute stress-induced ACTH and corticosterone levels were evaluated in ovariectomized rats in the presence or absence of estrogen supplementation, with or without chronic 14- day stress exposure. 5-HT7 expression in PVN was also assessed. Animals with estrogen and chronic stress exposure had the lowest weight gain (EC E2), while those without estrogen and control exposure showed the highest weight gain (CTRL sham). Significant differences ( $p < 0.001$ ) between groups were observed from day 10 of restriction stress through day 14. Conversely, EC E2 group had the lowest adrenal gland weight whereas CTRL sham animals had the highest gland weight. Animals with chronic stress exposure with or without estrogen showed significant higher ( $p < 0.01$ ) adrenal weight compared to their controls. Groups that received estrogen (with or without stress) had higher adrenal weight as compared to animals with vehicle only ( $p < 0.001$ ), suggesting that both stress and estrogen increase adrenal weight. Basal ACTH levels in estrogen treated groups showed a trend to be higher compared to animal without female hormone, only some significant differences were reached comparing values at the extremes ( $p < 0.001$ ). Significant differences were observed in corticosterone levels ( $p < 0.05$ ) with a higher level of the hormone in control animals with estrogen as compared to stressed animals with vehicle. 5-HT7 assessment suggests that both the absence of estrogen and stress exposure reduce its expression in PVN.

**(Keywords:** hypothalamus, paraventricular nucleus, estradiol, corticosterone, ACTH, 5-HT7 receptor).



## I. INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la homeostasis es indispensable para la supervivencia de un organismo. Cuando existe un estímulo estresor que amenaza estas condiciones de equilibrio, se ponen en marcha una serie de respuestas que involucran al sistema nervioso autónomo en su división simpática con efectos casi inmediatos, y al eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) como un mecanismo neuroendocrino con efectos más tardíos y prolongados. El objetivo de ambos sistemas es incrementar las posibilidades de supervivencia en condiciones de estrés agudo. Sin embargo, cuando el estímulo estresor persiste por tiempo prolongado, este supone una carga energética importante, que conlleva finalmente a la desregulación neuroendocrina. El HHA inicia en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, que integra numerosas aferencias de otras regiones encefálicas asociadas con procesos complejos como la memoria, el aprendizaje, la regulación emocional y la toma de decisiones; derivado de sus múltiples aferencias, el NPV expresa una gran variedad de receptores para neurotransmisores como el glutamato (Li y Pan, 2017), el ácido gamma amino butírico (GABA) (Cruz- Martínez *et al*, 2018), la dopamina (Tejas-Juárez *et al*, 2014) y la serotonina (Tokarski *et al*, 2012), entre otros.

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) que llega al NPV es liberada por los núcleos del rafe dorsal y medial, localizados en el tallo cerebral. A partir de 1987, se ha descrito 15 subtipos de receptores de serotonina (5-HTR), que han sido agrupados en 7 familias, que se expresan en el sistema nervioso como en el tracto gastrointestinal. Excepto el receptor 5-HT<sub>3</sub> que es un receptor ionotrópico, los demás subtipos de 5-HTR son de tipo metabotrópico, ya que están acoplados a las proteínas Gs, Gi, G12 y fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ) (Chávez-León *et al*, 2008; Charnay y Léger, 2010; Nautiyal *et al*, 2017). La gran diversidad de receptores, así como la variabilidad en su expresión en distintos tejidos, determina que el sistema serotoninérgico posea efectos muy variados a través del organismo, se conoce por

ejemplo, que está estrechamente implicado en la regulación de procesos neurofisiológicos como la ingesta y saciedad, el ciclo sueño-vigilia, la modulación del estado anímico y de las respuestas al estrés, de forma particular se ha descrito que la 5-HT posee un efecto estimulador sobre el eje HHA (Goel *et al*, 2014).

Algunos de los receptores que se han estudiado por su papel en la regulación del eje HHA, son los subtipos: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub> y el 5-HT<sub>7</sub> de descripción más reciente (Bard, 1993). Estudios recientes realizados en ratas macho han reportado que una disminución en la expresión del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el NPV en condiciones de estrés crónico por restricción, respecto a los animales sin estrés. Esta regulación a la baja se asoció a una desregulación endocrina de las hormonas ACTH y corticosterona, hecho que sugiere que el receptor 7 está involucrado en las alteraciones del eje HHA posterior a periodos de exposición a estrés de restricción por 15 días (García-Iglesias *et al*, 2013).

Se tiene evidencia además, que las respuestas del eje HHA también se encuentran influenciadas por hormonas sexuales. Particularmente, se han atribuido al estradiol funciones potenciadoras tanto en condiciones basales como en respuesta al estrés agudo y crónico (Lund *et al*, 2004). Lo anterior se apoya por el hecho de que neuronas productoras del factor liberador de corticotropina (CRH) presentan una notable expresión del receptor  $\beta$  de estrógenos, la cual se mantiene independientemente de del sexo en diversas especies (Oyola *et al*, 2017).

Finalmente, la hiperactividad del eje HHA que se presenta ante la exposición crónica al estrés y que involucra niveles altos de glucocorticoides, es una vía patológica común que comparten diversas enfermedades neuropsiquiátricas tales como la depresión mayor y la ansiedad, trastornos más prevalentes en mujeres. Por otra parte, se ha descrito que el uso crónico de fármacos antidepresivos del grupo de inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina induce, similar a la condición de estrés crónico, una regulación a la baja del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el NPV (Mullins,

1999). Por tal motivo, el presente en este trabajo se evaluó la expresión del receptor 5-HT7 en condiciones de estrés crónico en ratas hembra ovariectomizadas con o sin suplementación de estradiol. Asimismo, se evaluó la ganancia de peso corporal, el peso de las glándulas adrenales como indicadores fisiológicos de la exposición al estrés crónico por 14 días. También se cuantificaron las hormonas ACTH y corticosterona basales e inducidas por un único episodio de estrés crónico de 30 minutos de restricción en los animales con estresados y control.

Dirección General de Bibliotecas UFRG

## II. ANTECEDENTES Y FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### II. 1 Estrés, homeostasis y alostasis

El estrés se define como un estímulo puntual que es percibido como amenazante para la homeostasis. Los eventos estresantes son capaces de activar una serie de respuestas que ponen en marcha varias reacciones que implican acciones neurales, metabólicas y neuroendocrinas, que permiten al organismo responder al estresor y así, desencadenar mecanismos que aseguren la preservación del equilibrio del medio interno (Duval *et al*, 2010; Zárate *et al*, 2014). Aunque la homeostasis se mantiene en límites muy estrechos, el proceso por el cual se sostiene el estado de equilibrio de un sistema implica en realidad múltiples mecanismos altamente dinámicos, los cuales se engloban en el término “alostasis”. Cabe recalcar que los cambios alostáticos, que implican un gasto energético importante, pueden ser distintos en función del tiempo y de las condiciones en que estos se presentan (Murcio-Ramírez, 2007; Zárate *et al*, 2014).

### II. 2 Mecanismos neuroendocrinos de regulación del estrés

La respuesta fisiológica al estrés involucra la activación de numerosas regiones cerebrales tales como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal, que participan también en procesos complejos como la memoria, el aprendizaje, la regulación emocional y la toma de decisiones. Estas áreas en acción sinérgica inducen la activación de las respuestas autonómica y hormonal al estrés, las cuales se ejecutan a través del sistema nervioso autónomo (SNA) y del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), respectivamente. Aunque la actividad de la rama simpática del SNA ocurre rápidamente comparado con la activación del eje HHA, ambos sistemas participan tanto en condiciones de estrés agudo como crónico (Duval *et al*, 2010; Zárate *et al*, 2014).

La activación paralela del sistema nervioso simpático y eje HHA, se denomina “Síndrome de Adaptación General” y consta de 3 fases a saber: 1) fase de alerta, que es la reacción inmediata al estímulo estresante derivada de la percepción cognitiva, y cuya resultante es la liberación de adrenalina por la médula adrenal, que tiene como finalidad favorecer el suministro energético para generar la respuesta de lucha o huida. 2) fase de resistencia, que inicia con la liberación de glucocorticoides por la corteza adrenal como el cortisol en el humano y corticosterona en el roedor. La liberación de glucocorticoides permite responder a un estímulo estresor persistente. 3) fase de agotamiento, ocurre en condiciones de estrés prolongado, y genera alteraciones hormonales ocasionando que la carga alostática se incremente, superando la capacidad fisiológica del organismo para mantener la homeostasis (Mucio-Ramírez, 2007; Duval *et al*, 2010)

### **II. 3 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal: el Núcleo Paraventricular en la fisiología del estrés**

En condiciones de estrés agudo, la activación del eje neuroendocrino HHA sostiene el estado de alarma iniciado por la respuesta del sistema nervioso simpático. La activación del eje HHA inicia en el NPV del hipotálamo, el cual se subdivide en varias regiones anatómicas. Así, las poblaciones de neuronas en el NPV median distintas acciones a través de las presentan múltiples conexiones con otras regiones encefálicas y espinales. De forma general se describen 2 subtipos celulares: la división parvocelular y la magnocelular. Esta última supone la principal fuente de las hormonas neurohipofisarias oxitocina y arginina vasopresina (AVP), por lo que sus proyecciones se dirigen hacia la hipófisis posterior. La división parvocelular alberga las neuronas productoras del factor liberador de corticotropina (CRF), localizadas en las zonas anterior, media y periventricular del NPV, sitios que emiten sus proyecciones hacia la porción externa de la eminencia media y que son activados principalmente por estrés (Figura 1). (Swanson *et al*, 1980; Oyola *et al*, 2017).

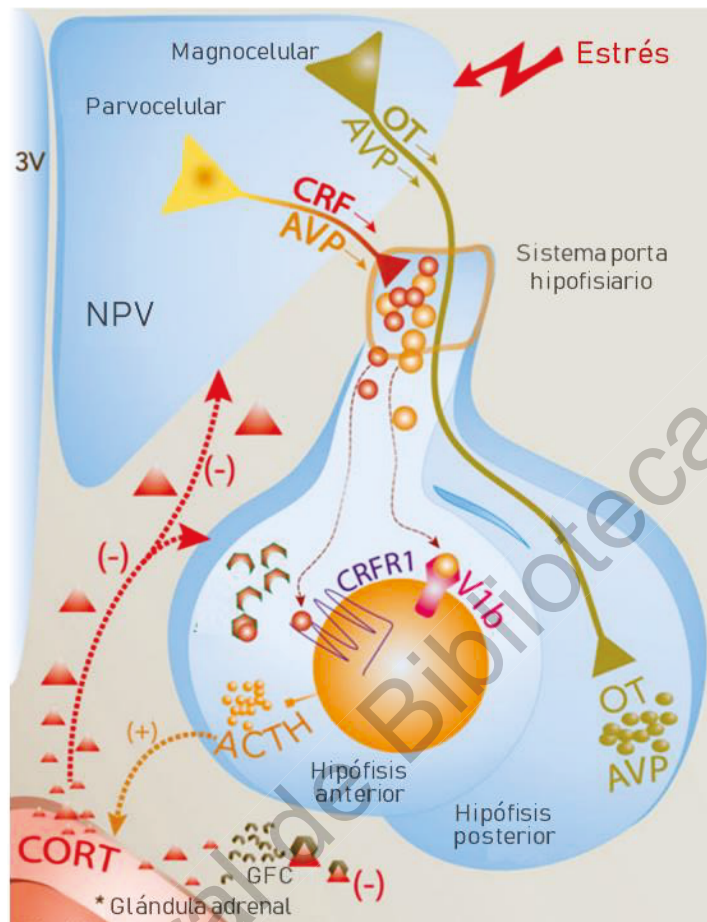


Figura 1. Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal. Se muestra el núcleo paraventricular (NPV) con sus divisiones magnocelular que proyecta hacia la hipófisis posterior para liberar oxitocina (OT) y arginina vasopresina (AVP). La región parvocelular contiene las neuronas productoras del factor liberador de la corticotropina (CRF) que a través del sistema porta hipofisiario alcanza su sitio efector en la hipófisis anterior, actuando principalmente en los receptores de CRH tipo 1 (CRFR1). La unión de CRF con su receptor induce la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que estimula la corteza adrenal para la síntesis y liberación de glucocorticoides (CORT) que retroalimentan negativamente el eje. GFC: globulina fijadora de corticoesteroides, V1b: receptor 1b de arginina vasopresina, 3v: tercer ventrículo (Tomado de Oyola *et al*, 2017).

El CRF forma parte de una familia de péptidos que también incluyen a las urocortinas 1 a 3, péptidos anorexigénicos asociados al estrés. Estas moléculas se unen con distinta afinidad a los 2 tipos de receptores de CRF. El receptor de CRF tipo 1 (CRF-R1) une principalmente a CRF, aunque también a la urocortina 1; mientras que el receptor de CRF tipo 2 (CRF-R2) une con mayor afinidad a las urocortinas que al CRF (Neufeld *et al*, 2010).

El CRF además puede unirse a la proteína de unión a CRF (CRH-BP por sus siglas en inglés), una glucoproteína de 322 aminoácidos que se encuentra muy conservada entre distintas especies, y a la que se ha atribuido una función de balance de la actividad del eje HHA. CRH-BP se encuentra coexpresada con el receptor CRHR1 en las células corticotropas de la hipófisis anterior. Incluso, CRF muestra mayor afinidad por su CFH- BP que por el receptor CRF-R1, por lo que CRH-BP ejerce un efecto de contrabalance de la activación del eje HHA. Por ejemplo, ratones *knockout* de CRH-BP muestran un incremento de comportamientos ansiosos, mediado por un incremento en los niveles de CRF libre (Potter *et al*, 1992; Behan *et al*, 1995; Burrows *et al*, 1998).

El CRF liberado es transportado a través del sistema portal hipofisiario hasta alcanzar las neuronas corticotropas de la adenohipófisis. CRF se une a su receptor específico, estimulando la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) a partir de su precursor, la proopiomelanocortina (POMC). La ACTH es vertida a la circulación general y su blanco principal son las células de la zona fasciculada de la corteza adrenal que secretan glucocorticoides como el cortisol en el humano y la corticosterona en el roedor (Mucio-Ramírez, 2007; Duval *et al*, 2010; Zárate *et al*, 2014).

Los glucocorticoides liberados hacia la circulación general ejercen su efecto a través de su unión a 2 tipos de receptores intracelulares: el receptor tipo I o de mineralocorticoides (MR) y el receptor tipo II o de glucocorticoides (GR). Es importante resaltar que el MR posee una afinidad a los glucocorticoides 10 veces mayor que la del GR, por lo que, en condiciones basales tiene una ocupación del 90%. El receptor MR se expresa principalmente en regiones del sistema límbico, y regula la inhibición tónica de la secreción de glucocorticoides en condiciones basales. Por otro lado, el GR se distribuye en regiones como el sistema límbico, el locus coeruleus, el hipocampo, los núcleos dorsales del rafe y el PVN. En este último, la ocupación del receptor GR cumple la función primordial de

retroalimentación negativa del eje HHA en condiciones de estrés agudo (Lanfume y *et al*, 2008; Meraz y Bañuelos, 2009; Duval *et al*, 2010).

#### **II. 4 Aferencias y eferencias del Núcleo Paraventricular**

Además de fungir como pieza clave en el control neuroendocrino de la respuesta al estrés, el NPV participa activamente en la regulación de la respuesta autonómica. Lo anterior debido a que las neuronas parvocelulares localizadas en la región dorsal y lateral del núcleo emiten proyecciones que alcanzan regiones del tallo cerebral y a la médula espinal. Entre las regiones descritas se encuentran el núcleo de Edinger-Westphal, el locus coeruleus, el núcleo parabraquial, el núcleo del tracto solitario y el núcleo motor dorsal que forman parte del complejo dorsal del vago, así como a la columna intermediolateral de la médula espinal, entre otras. Las regiones antes mencionadas se relacionan de forma directa o indirecta con el control del sistema nervioso autónomo pues contienen neuronas preganglionares de ambas subdivisiones: simpática y parasimpática (Swanson y Sawchenko, 1980).

A su vez, el NPV recibe proyecciones de varios núcleos localizados en el tronco del encéfalo, entre ellos, los núcleos del rafe dorsal, sitio principal de síntesis de serotonina encefálica. Estos núcleos serotoninérgicos proyectan además a otras regiones como a la corteza frontal y prefrontal, la amígdala y el hipocampo, que participan también en la integración cognitiva del estrés (Goel *et al*, 2014).

#### **II. 5 Serotonina y sus receptores: su implicación con el eje HHA**

En el sistema nervioso, la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) se sintetiza a partir del aminoácido esencial triptófano por la enzima triptófano hidroxilasa 2 (TPH2), que lo transforma en 5-hidroxitriptofano. Este último compuesto es descarboxilado por la enzima L-d Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC, por sus siglas en inglés), que origina 5-hidroxitriptamina (5-HT) también llamada serotonina.



Una vez liberada al espacio sináptico, la serotonina es recapturada por la terminal presináptica por el transportador de serotonina (SERT), en un proceso dependiente de adenosin trifosfato (ATP). La serotonina recapturada puede ser reutilizada a través de su vesiculación mediante el transportador vesicular de monoaminas (VMAT), o bien puede ser degradada por medio de la enzima monoaminoxidasa (MAO) de localización mitocondrial (Chávez-León *et al*, 2008; Charnay y Léger, 2010; Takahashi *et al*, 2010). Cabe recalcar que, la 5-HT cerebral constituye alrededor del 3% de la serotonina corporal, ya que la mayor fuente de serotonina en el organismo es de origen entérico y es sintetizada por la enzima triptófano hidroxilasa tipo 1 (TPH1). Se cree que ambas serotoninas permanecen aisladas por la barrera hematoencefálica (Charnay y Léger, 2010).

Se han descrito 15 subtipos de receptores de serotonina (5-HTR) de 1987 a la fecha. Estos han sido agrupados en 7 familias que se expresan en sistema nervioso y en el tracto gastrointestinal. Excepto el receptor 5-HT<sub>3</sub> que es de tipo ionotrópico, los demás subtipos de receptores de serotonina son de tipo metabotrópico, y que están acoplados a las proteínas G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>12</sub> y fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ) (Chávez-León *et al*, 2008; Charnay y Léger, 2010; Nautiyal *et al*, 2017). En el encéfalo, el sistema serotoninérgico está estrechamente implicado en numerosos procesos neurofisiológicos como la regulación de la ingesta y saciedad, el ciclo sueño-vigilia, la modulación del estado anímico y de las respuestas al estrés. De forma particular se ha descrito que la 5-HT posee un efecto estimulador sobre el eje HHA (Goel *et al*, 2014).

Para el estudio de los efectos del sistema serotoninérgico en el eje HHA, se han empleado varias estrategias que van desde la utilización de agonistas selectivos de ciertos receptores, o bien, agentes que incrementan las concentraciones de serotonina incidiendo en su síntesis, liberación, recaptura o degradación. Por ejemplo, se ha documentado que la administración de L-triptófano, o bien, de

fármacos liberadores de 5-HT como la fenfluramina, conduce a un incremento en ACTH y glucocorticoides. En contraste, la depleción de L-triptófano induce niveles atenuados de glucocorticoides en respuesta al estrés. De forma paralela, el impacto estimulador de 5-HT sobre el eje HHA en respuesta al estrés, induce también a la activación de los núcleos del rafe dorsal, incrementando la neurotransmisión serotoninérgica a través del encéfalo (Goel *et al*, 2014).

Algunos de los receptores que más frecuentemente se han estudiado en la regulación del eje HHA, son los subtipos: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>4</sub>. Se ha documentado por ejemplo, que la administración sistémica de agonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> producen también un incremento en los niveles plasmáticos de ACTH y glucocorticoides tanto en roedores como en humanos. En tanto, el bloqueo farmacológico del receptor 1A mediante el uso de antagonistas induce una respuesta atenuada en consecuencia a la exposición a estrés. Respuestas similares se han encontrado con el uso de agonistas y antagonistas de 5-HT<sub>2A</sub> y 2C (Dayer, 2014; Goel *et al*, 2014; Yohn *et al*, 2017). En los últimos años se ha implicado también en fisiopatología del estrés, al miembro más recientemente descrito de la familia de receptores serotoninérgicos, el receptor 5-HT<sub>7</sub>.

## **II. 6 Receptor 5-HT<sub>7</sub> en Núcleo Paraventricular y el eje HHA**

Clonado en 1993 por Bard, el receptor 5-HT<sub>7</sub> es un receptor transmembranal metabotrópico acoplado a proteínas G que activan la proteína cinasa A (PKA) (Leopoldo *et al*, 2011; Guseva *et al*, 2014). Este receptor se encuentra ampliamente distribuido en el SNC en áreas involucradas en la integración neuroendocrina de la respuesta al estrés como el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo, la corteza prefrontal, la amígdala, los núcleos del rafe y la médula espinal. Se ha establecido la participación del receptor 7 en la fisiología de distintos procesos tales como la regulación del ciclo circadiano, la memoria, el dolor, la termorregulación, el estado de ánimo y el estrés (Hedlund, 2009; Sarkisyan *et al*, 2010; Leopoldo *et al*, 2011).

Los primeros reportes sugerentes de la función del receptor 5-HT7 en la regulación del estado de ánimo ocurrieron cuando se describió la disminución en su expresión a nivel del hipotálamo posterior al uso prolongado de antidepresivos. Estudios realizados en el modelo murino, evaluaron mediante inmunohistoquímica la expresión del receptor 5-HT7 luego de la administración vía intraperitoneal durante 21 días de diversos fármacos como la fluoxetina, imipramina, desimipramina, clorgilina, mianserina y nefazodona, así como el agonista del receptor 5-HT7 el 8-OH-DPAT. Encontrando una disminución tanto en la afinidad expresada como sitios de unión a serotonina, como en la densidad del receptor en el hipotálamo (Mullins, 1999). Se ha documentado también que otros fármacos, como los antipsicóticos atípicos, también inducen una regulación a la baja en la expresión del receptor 5-HT7, a través del incremento de su degradación vía lisosomal (Manfra *et al*, 2015).

También, se ha documentado que los antagonistas del receptor 5HT7 como el amisulpride (diseñado como un antagonista de los receptores dopaminérgicos D1 y D2, pero que también funciona como antagonista del receptor 7 de serotonina) (Abbas *et al*, 2009), así como el lurasidone (fármaco antagonista de los receptores D2, antagonista del 5-HT7 y agonista parcial del autoreceptor 5-HT1A) (Cates *et al*, 2013), son capaces de producir un potente efecto antidepresivo en ratones macho, utilizando modelos de nado forzado y de suspensión de la cola.

Aunado a los reportes anteriores, se ha documentado que el tratamiento repetido con antidepresivos tanto tricíclicos como la imipramina, tanto como ISRS como el citalopram, conduce a una atenuación de los efectos excitadores mediados por la activación del receptor 5-HT7 en el hipocampo, efecto mediado a través de modificaciones en las proteínas transductoras de señales dependientes de AMPc o de la actividad de la proteína cinasa A (PKA) (Tokarski *et al*, 2005). Interesantemente, se ha reportado un incremento en la expresión del receptor 7 en la región del hipocampo asociado a la exposición niveles elevados de corticosterona plasmática en roedores (Tokarski *et al*, 2012).

Otros estudios recientes, han encontrado que la exposición a episodios de estrés por restricción por 14 días disminuye la inmunoreactividad del receptor 5-HT7 particularmente en el NPV del hipotálamo. Concomitante a esta disminución, se documentó la sobreexpresión del receptor 7 en la corteza de la glándula adrenal, e indujo la desregulación de las hormonas ACTH y corticosterona en eje HHA en la rata macho (Figura 2) (García-Iglesias *et al*, 2013). Los hallazgos mencionados en párrafos anteriores sugieren que el receptor 7 de serotonina desempeña un papel importante en la homeostasis del eje HHA, así como en su desregulación inducida por la exposición repetida al estrés.

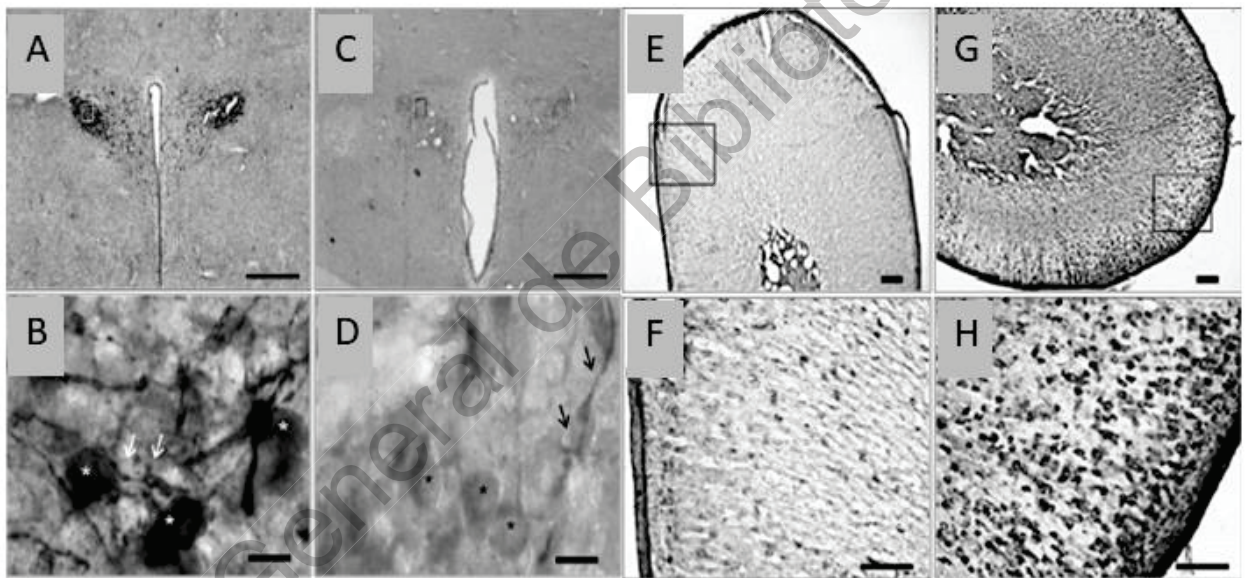


Figura 2. Inmunohistoquímica del receptor 5-HT7. A-D corresponde al NPV del hipotálamo, E-H corresponde a la corteza de las glándulas adrenales. A, B, E y F corresponden a las condiciones control, mientras que C, D, G y H corresponden a condiciones de estrés crónico por restricción durante 14 días, en donde se observa una disminución en la expresión del receptor 5-HT7 en el NPV (C y D), mientras que las glándulas adrenales se observa un incremento en la expresión de tal receptor (G y H). (Adaptado de García-Iglesias *et al*, 2013).

## II. 7 Dimorfismo sexual en el eje HHA: implicación del sistema serotoninérgico

Se conoce que existen diferencias en las respuestas del eje HHA inducidas por estrés entre ratas macho y hembras, encontrando que éstas últimas son más

reactivas (Lund *et al*, 2004). Para la evaluación de respuestas del eje HHA en roedores, se han utilizado diversos paradigmas de estrés. Por ejemplo, se ha documentado que el estrés agudo de restricción conduce a un incremento de serotonina a nivel de la corteza prefrontal y en la amígdala basolateral, la cual es más notable en hembras (Mitsushima *et al*, 2006). La evaluación en el modelo murino mediante la aplicación de choques eléctricos en las patas como un modelo de estrés físico, induce un incremento en los niveles de serotonina también a nivel de la corteza frontal además de en el mesencéfalo en las hembras, lo cual se observa en los machos (Heinsbroek *et al*, 1990). En tales casos el incremento de serotonina es paralelo al de su metabolito de degradación: el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), que se toma en consideración como un indicador indirecto de la utilización y recambio de la transmisión serotoninérgica.

Estas diferencias respecto al sexo en la actividad de serotoninérgica inducida por el estrés han sido atribuidas a las condiciones basales, pues se ha documentado que las hembras muestran un tono serotoninérgico más acusado respecto a machos, en diversas regiones encefálicas como el prosencéfalo, los núcleos del rafe dorsal, el hipocampo, el área lateral y ventromedial del hipotálamo. Además se ha sugerido que el metabolismo de la serotonina es estimulado por estradiol, pues hembras ovariectomizadas que recibieron una sola dosis de estradiol, presentaron mayores niveles de 5-HIAA en los núcleos del rafe dorsal respecto a aquellas que no recibieron tal hormona (Svec *et al*, 2002).

A su vez, la serotonina ejerce de forma general, un efecto estimulador de la sobre el eje HHA, el cual ha sido estudiado mediante el empleo de distintos fármacos, tanto agonistas de los diferentes receptores serotoninérgicos, como ISRS. La flenfluramina (estimulador de la liberación de serotonina), el precursor aminoacídico de la serotonina: el L-triptófano, así como diversos agonistas de receptores serotoninérgicos tales como la clorfenilpiperazina; conducen al incremento de los niveles de ACTH y glucocorticoides tanto en hembras como en machos (Feuchtl *et*

*al*, 2004; Vielhaber *et al*, 2005), sin embargo el pico de respuesta es más acentuada en hembras, en particular en respuesta a ISRS tales como el citalopram y la fluoxetina, mientras que la tasa de recuperación hacia los niveles basales es comparable en ambos sexos (Goel y Bale, 2010).

El uso de agonistas o antagonistas específicos a los distintos receptores de 5-HT, permiten elucidar los mecanismos que subyacen a las diferencias sexuales en la respuesta del eje HHA. Por ejemplo, se tiene evidencia de que la administración sistémica de agonistas específicos del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, inducen un incremento en las respuestas de ACTH y corticosterona de hembras en comparación con machos; y esta respuesta es más acentuada si el fármaco es administrado directamente en el NPV (Haleem *et al*, 1989). Además se demostró que las hembras ovariectomizadas presentaron una respuesta atenuada de la corteza adrenal a ACTH inducida por el agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, encontrando que el nivel de glucocorticoides es restaurado mediante la administración de estradiol, y bloqueada con la administración simultánea de testosterona (Matsuda *et al*, 1991). Tales hallazgos apoyan la importancia de la regulación estrogénica en el eje HHA mediado por el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, no solo a nivel central, sino también a nivel periférico.

En contraste, la exposición crónica a estrés induce a la desensibilización del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el NPV, por lo que la liberación de ACTH inducida por serotonina se torna atenuada. Cabe mencionar que el grado de desensibilización es comparable entre hembras y machos; si bien los niveles absolutos de ACTH son fisiológicamente mayores en hembras respecto a los machos (Grippe *et al*, 2005). Tal respuesta, podría estar relacionada con los niveles de expresión del receptor, pues se ha descrito que existen mayores niveles de ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la hipófisis e hipocampo de las hembras en comparación con machos (Goel y Bale, 2010).

## II. 8 Dimorfismo sexual en el eje HHA: receptor $\beta$ de estrógeno en el NPV

Diversos estudios han señalado que el estradiol puede modificar directa o indirectamente la función del eje corticotropo a varios niveles. El estradiol ejerce su efecto en órganos blanco a través de su unión a 2 tipos de receptores nucleares que pertenecen a una superfamilia de factores de transcripción dependientes de ligandos: receptor de estrógeno tipo alfa ( $RE\alpha$ ) y beta ( $RE\beta$ ). Luego de su unión con el ligando, los receptores de estrógeno forman homodímeros u heterodímeros que se unen a secuencias del ADN en sitios denominados elementos de respuesta a estrógenos (ERE). Los ERE están localizados en las regiones promotoras de diversos genes, donde reclutan proteínas co-reguladoras o influyendo sobre la actividad de los factores de transcripción.

Se ha propuesto que los dos subtipos de receptores de estrógeno regulan procesos diferentes en la fisiología cerebral. Se ha documentado que los ratones *knock-out* de  $RE\alpha$  tienen notables alteraciones en el comportamiento reproductivo, mientras que en ratones *knock-out*  $RE\beta$ , estos patrones se encuentran intactos (Pérez *et al*, 2013).

Por su parte el  $RE\beta$ , descrito en 1996, se ha asociado a la regulación de diversas funciones como el aprendizaje, la memoria, la actividad locomotora, el estado anímico y la regulación del eje HHA (Stern, 2003; Oyola *et al*, 2017); pero no se ha reportado implicación de  $RE\beta$  receptor en las funciones asociadas a la reproducción (Isgor *et al*, 2003; Liu *et al*, 2011).

La distribución anatómica de los receptores  $RE\alpha$  y  $RE\beta$ , evidenciada por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, han mostrado que existe una sobreposición de ambos receptores en diversas áreas a nivel de sistema nervioso central, tales como la parte medial del núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo preóptico, el núcleo ventromedial y ventrolateral del hipotálamo (Pérez *et al*,

2003); en tanto, otras regiones como el NPV expresan de forma casi exclusiva al receptor RE $\beta$ . Así, las neuronas magnocelulares y parvocelulares del NPV expresan RE $\beta$ , con mayor nivel detectado en las últimas (Simonian y Herbison, 2003). Cabe mencionar que la expresión de este receptor es consistente en diversas especies, lo que sugiere que los estrógenos juegan un papel clave en la regulación de las funciones mediadas por el NPV en el mamífero (Isgor *et al*, 2003; Stern, 2003; Oyola *et al*, 2017).

Además, se ha reportado la colocalización de 60 al 90% de las isoformas de RE $\beta$  en neuronas productoras de CRH en el NPV, principalmente en la región parvocelular medial. En contraste, el RE $\alpha$  tiene una expresión escasa en el NPV y esta no colocaliza con marcadores de CRH. Sugiriendo de este modo, que el RE $\beta$  podría desempeñar un rol importante en la regulación de la transcripción de CRH en condiciones tanto fisiológicas o patológicas (Figura 3) (Miller *et al*, 2004; Oyola *et al*, 2017).

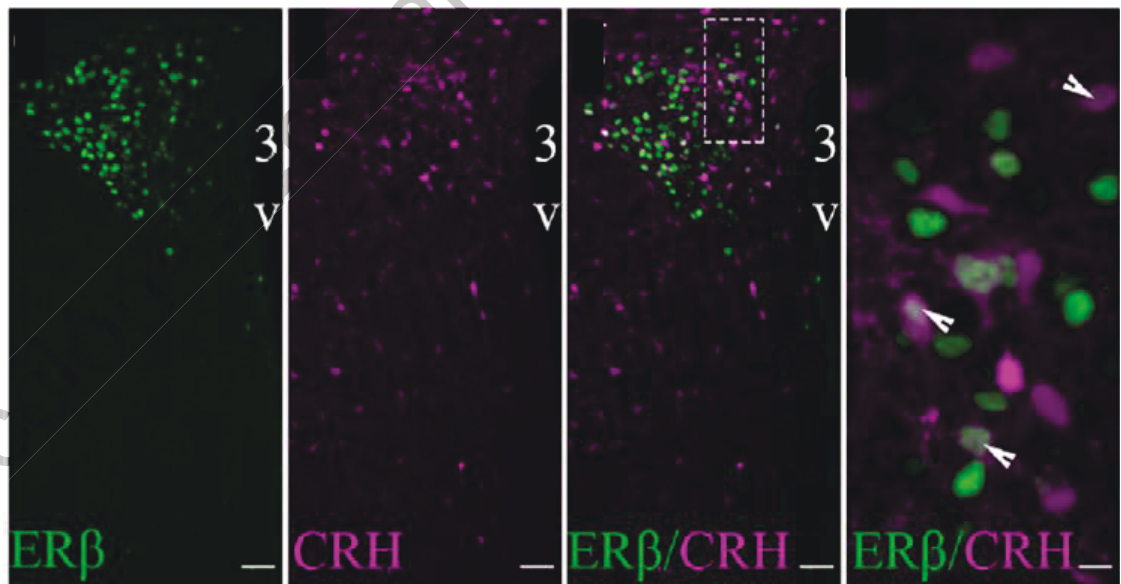


Figura 3. Inmunofluorescencia del receptor  $\beta$  de estrógeno (ER $\beta$ ) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el NPV del hipotálamo. Se identifica el Er $\beta$  en verde, y CRH en morado en las neuronas del NPV. La colocalización de ambas señales puede observarse en la región medial del núcleo. 3v corresponde al tercer ventrículo. (Tomado de Oyola *et al*, 2017).



Existe evidencia de que las células productoras de CRH expresan varias isoformas de RE $\beta$  asociado a distintos patrones de regulación del promotor de este péptido. La isoforma RE $\beta$ 1 muestra una actividad constitutiva independiente de ligando, mientras que la isoforma RE $\beta$ 1 $\delta$ 3 tiene una fuerte actividad dependiente de ligando. Por tanto, la respuesta inducida por RE $\beta$ 1 $\delta$ 3 como activador de la transcripción de CRH, es mayor que cualquier otra isoforma de RE $\beta$  y del RE $\alpha$  (Miller *et al*, 2004).

Los estrógenos ejercen una influencia en la transcripción de ARNm de CRH en el NPV actuando como un potenciador de las respuestas al estrés en las neuronas productoras de CRH en condiciones fisiológicas, las cuales son dependientes de los niveles de estrógeno en las distintas fases del ciclo estral; alcanzando mayores niveles de ARNm de CRH, en las fases de estro y proestro durante la exposición a estrés agudo. De manera similar, los niveles de corticosterona presentan cambios significativos en condiciones basales y en respuesta al estrés agudo en las distintas fases del ciclo estral (Liu *et al*, 2011). Por otra parte, se ha reportado también, que los niveles bajos de corticosterona se asocian a la reducción del ARNm de RE $\beta$  en el NPV en la fase proestro. Esta condición se revierte al suministrar corticosterona exógena (Isgor *et al*, 2003).

Se sugiere también que RE $\beta$  en el NPV contribuye a la regulación de la activación del eje HHA en el estrés por restricción ya que, utilizando antagonistas selectivos de RE $\beta$  se atenúan los niveles de corticosterona inducidos por estrés, tales resultados son dependientes del ciclo estral, siendo significativos únicamente en la fase diestro. Estos resultados sugieren que el RE $\beta$  en el NPV tiene una influencia crítica en la respuesta al estrés del eje HHA, la cual puede ser regulada por la corticosterona circulante (Isgor *et al*, 2003).

El estrés por restricción genera un aumento significativo en las concentraciones locales de estradiol en el NPV durante la fase proestro, así como incremento en los niveles plasmáticos de la hormona en la fase proestro y estro. En animales

ovarietomizados, ocurre también un incremento significativo en los niveles de estradiol en el NPV, sin diferencias en los niveles séricos de esta hormona (Liu *et al*, 2011). Además, se documentó en el mismo trabajo, un aumento en la expresión de ARNm de la enzima aromatasas y de RE $\beta$ , en la fase proestro en condiciones de estrés agudo. Estos cambios sugieren que la respuesta al estrés del eje HHA es mayor cuando las concentraciones plasmáticas basales de estrógenos son elevadas y, que el aumento en las concentraciones de estrógeno en el NPV resultan del incremento local de su producción.

La concentración creciente de estradiol hipotalámico en conjunto con una mayor expresión del gen RE $\beta$  indica una retroalimentación positiva de la señalización de estradiol hipotalámico durante el estrés agudo. Si bien se tienen datos acerca de la interrelación entre el RE $\beta$  y el eje corticotrópico en situaciones de estrés, se desconoce si estrógenos a través del receptor  $\beta$ , podrían inducir cambios en la expresión de algunos receptores de serotonina involucrados en la regulación del eje HHA en el NPV como el receptor 5-HT $7$ .

### III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Los modelos animales permiten estudiar los procesos fisiológicos en condiciones controladas. Así, el conocimiento generado a partir de la utilización de modelos experimentales ha permitido comprender las bases fisiológicas que subyacen condiciones patológicas de índole anímica como la depresión, la desesperanza aprendida, ansiedad y el estrés crónico (Abelaira *et al*, 2013; Buynitsky y Mostofsky, 2009). En particular, el modelo de estrés por restricción en los roedores ha sido ampliamente (Glavin *et al* 1994; Campos *et al*, 2013) para el estudio de diversos efectos adversos de tipo gastrointestinal, inmunológico y neuroendocrino asociados al estrés crónico.

El fundamento teórico del presente trabajo yace en los antecedentes planteados en extenso en la sección anterior con el fin de estudiar el efecto que tiene la privación o reemplazo de los estrógenos sobre la expresión del receptor 7 de serotonina en el núcleo paraventricular del hipotálamo y su relación con otros marcadores fisiológicos de estrés como la ganancia en el peso corporal, la relación peso corporal y de las glándulas suprarrenales, así como el efecto de la exposición a estrés sobre las hormonas adrenocorticotrópica y corticosterona en un la rata hembra juvenil.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los estrógenos preservarán la expresión del receptor serotoninérgico 5-HT7 mediado por el receptor beta, en el núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas ovariectomizadas sometidas a estrés crónico.

#### **V. OBJETIVOS**

##### **V. 1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de los estrógenos en la expresión del receptor serotoninérgico 5-HT7 en el núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas ovariectomizadas sometidas a estrés crónico.

##### **V. 2 Objetivos específicos**

- I. Evaluar la expresión del receptor 5-HT7 en el NPV del hipotálamo en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógeno o en ausencia de él, en condiciones control y de estrés crónico.
- II. Cuantificar las hormonas ACTH, corticosterona y estradiol en cada uno de los 4 grupos.
- III. Evaluar la ganancia de peso corporal y el peso de glándulas adrenales en cada uno de los 4 grupos.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **VI. 1 Tipo de investigación**

Experimental transversal

### **VI. 2 Población /Animales**

Ratas hembra de la cepa Wistar de entre 230 a 250 g de peso, obtenidas del bioterio de Instituto de Neurobiología, *campus* Juriquilla de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **VI. 3 Muestra y tipo de muestra**

En el presente estudio se utilizarán 60 animales, cifra que corresponde a la cantidad reportada por trabajos análogos en la literatura.

#### **VI. 3.1 Criterios de selección**

Los establecidos de acuerdo al sexo, peso, cepa y salud.

#### **VI. 3.2 Variables estudiadas**

Expresión del receptor 5-HT<sub>7</sub> por inmunohistoquímica de luz visible, peso corporal, hormonas ACTH y corticosterona.

### **VI. 4 Técnicas e instrumentos**

**VI. 4.1. Técnicas:** Inmunohistoquímica, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

**VI. 4.2. Instrumentos:** Equipo de cirugía, micropipetas y puntas, cristalería, cuarto frío, lector de microplacas de ELISA, microscopio, balanza de animales, bomba

peristáltica, equipo de perfusión transcardíaca, cilindros de acrílico, tubos con anticoagulante, guillotina.

## **VI. 5 Procedimientos**

### **A. Ovariectomía y colocación de implante subcutáneo**

Los animales serán alojados por parejas en cajas de acrílico en una habitación con ventilación adecuada a 25° C en un ciclo de luz-oscuridad invertido 12:12, con agua y alimento *ad libitum* y limpieza en días alternos tres veces a la semana.

Todos los animales serán ovariectomizados bajo anestesia profunda con una mezcla de ketamina (70 mg/kg) - xilazina (6 mg/kg). Paralelamente, los animales recibirán un implante subcutáneo de un cilindro de silicón con un diámetro interno de 1.6 mm y externo de 3.17 mm conteniendo 70 µL de aceite de sésamo con 17β-estradiol a una dosis de 0.25 mg/kg de peso o únicamente el vehículo según sean asignados de forma aleatoria a cada grupo (Lund T, 2005). Los animales se mantendrán en recuperación durante 7 días, posterior a los cuales se iniciará la habituación al cuarto de alojamiento por 5 días. Posteriormente, los animales serán asignados de manera aleatoria al protocolo de estrés por restricción o al grupo control; en este último, los animales sólo serán manipulados para ser pesados durante los 14 días del experimento sin ser sometidos al modelo de estrés crónico por restricción. Obteniendo 4 grupos: los grupos control con o sin estrógeno (CTRL E2 y CTRL Sham, respectivamente) y los grupos de estrés crónico con o sin estrógeno (EC E2 y EC Sham, respectivamente).

### **B. Protocolo de estrés por restricción**

Los animales destinados al grupo de estrés crónico serán pesados diariamente y posteriormente sometidos al protocolo de estrés por restricción, que consiste en la

introducción del animal en un cilindro de acrílico de dimensiones: 6.3 cm de diámetro por 15 cm de largo, ajustables en longitud al peso de ratas de entre 200- 300 gramos. La restricción se realizará durante 20 minutos, a horarios aleatorios durante la fase de oscuridad, respetando un margen de 2 horas del cambio de fase luz-oscuridad, durante los 14 días del experimento (Figura 4).



Figura 4. Protocolo de estrés por restricción, consiste en introducir al animal en un cilindro de acrílico, ajustable en longitud de acuerdo con el peso y tamaño del sujeto de estudio, de tal manera que sus movimientos se encuentren restringidos, pero sin llegar a causar daño físico al animal.

### **C. Peso corporal**

Todas las ratas serán pesadas desde el día de la ovariectomía, el tiempo de recuperación, el tiempo de habituación y los 14 días del experimento. Estos datos serán registrados diariamente hasta el final del experimento y se analizarán con el paquete estadístico PrismGraphpad 7.0.

#### **D. Cuantificación hormonal: ACTH, corticosterona y estradiol**

Los animales destinados a la cuantificación hormonal (n=40, 10 por cada grupo) serán sacrificados por decapitación y se colectará la sangre troncal, de acuerdo con el protocolo establecido para el modelo de estrés (28). Los plasmas se separarán por centrifugación a (2.0 rpm durante 10 minutos a 4 °C) y se procesarán mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando los reactivos ACTH kit Mybiosource (San Diego, CA, USA), Corticosterone ELISA kit (Abcam , Cambridge, MA, USA) y kit de Estradiol (E2) (International Immunodiagnostics, Foster City, CA, USA), utilizados de acuerdo a las instrucciones provistas por cada fabricante. De forma paralela, se obtendrán también las glándulas adrenales en fresco de cada uno de los 40 animales, para ser pesadas. Los resultados obtenidos se analizarán utilizando el programa SPSS.

#### **E. Inmunohistoquímica**

Los animales destinados a la determinación morfológica (n=20, 5 por cada uno de los 4 grupos) serán anestesiados profundamente administrando la dosis de eutanasia de pentobarbital sódico intraperitoneal (50 mg/k). Posterior a la verificación de la pérdida del reflejo de flexión pedal, se administraron 30 ml de amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.4, seguido de 250 ml del fijador paraformaldehído 4% pH 7,4 por perfusión transcardiaca. Al final del procedimiento, se extraerán los encéfalos y se colocarán en una solución crioprotectora de sacarosa 30% hasta su corte y procesamiento.

Se obtuvieron cortes coronales de 50 µm de grosor, abarcando regiones anteriores, mediales y posteriores del NPV para los 5 encéfalos por condición experimental. Los cortes se permeabilizaron con solución amortiguadora de fosfatos con detergente Triton X 100 (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 0.5%. Posterior a la permeabilización, los tejidos se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente



(TA) con suero de caballo al 3% en amortiguador de fosfatos, a fin de prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos. Después, los cortes se incubaron por 48 horas a 4 °C con una dilución 1:200 del anticuerpo primario contra el receptor 5-HT7 hecho en conejo (Abcam, Cambridge, MA, USA). Posterior al retiro del anticuerpo primario seguido de lavados, los cortes se incubaron por 2 horas a TA con una dilución 1:400 del anticuerpo secundario biotinilado contra conejo hecho en cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A fin de amplificar la señal de la inmunoreactividad, los cortes se incubaron por 2 horas con el complejo avidina-biotina- peroxidasa (ABC) de acuerdo a las instrucciones de fabricante (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Finalmente, los sitios de unión de los anticuerpos serán revelados mediante la reacción de reducción de sales de diaminobenzidina y níquel, siguiendo las instrucciones del fabricante (Vector, Laboratories, Burlingame, CA, USA). Los cortes fueron montados en portaobjetos previamente gelatinizados y cubiertos con resina, para su posterior análisis. Se analizaron cortes representativos del NPV en los niveles anterior, posterior y medio para su evaluación cualitativa.

#### **VI. 5.1 Análisis estadístico**

Los resultados del peso corporal se colectarán del inicio al final del experimento y se analizarán estadística paramétrica con el paquete estadístico PrismGraphpad 7.0. Los resultados obtenidos de los niveles plasmáticos de las hormonas ACTH y cortisol se analizarán con estadística no paramétrica utilizando en el mismo programa.

#### **VI. 5.2 Consideraciones éticas**

Todos los procedimientos se realizaron conforme a lo establecido en la Guía de Cuidado y Uso de animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, 2011), y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de producción,

cuidado y uso de animales de laboratorio. Todos los protocolos experimentales se realizarán minimizando el sufrimiento de los animales. Asimismo, los desechos biológicos serán procesados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, de Protección ambiental, Salud ambiental y Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Los procedimientos quirúrgicos fueron realizados por un médico general.

Dirección General de Bibliotecas UAG

## VII. RESULTADOS

### VII. 1 Ganancia de Peso corporal

El peso registrado desde el día de la ovariectomía hasta el final del experimento de la totalidad de los animales incluidos (n=65, 15 por cada grupo de estudio y 5 animales intactos en que no se realizó ninguna intervención), se muestra en la figura 5. Los resultados muestran que la ganancia de peso ocurre de forma homogénea posterior a la ovariectomía y el periodo de recuperación de la intervención. De forma global, el grupo con mayor ganancia de peso corresponde al grupo que no fue sometido a estrés repetido sino únicamente a la manipulación diaria para el pesaje y que recibieron un implante con el vehículo sin estradiol (CTRL Sham). El grupo CTRL Sham registró un peso en el día de la ovariectomía de  $261.4 \pm 22.61$  g, alcanzando al día 14 de manipulación control un peso de  $308.4 \pm 28.70$  g. En contraste, el grupo que presentó menor ganancia de peso corresponde al grupo que fue sometido a estrés de restricción por 14 días con implante con estradiol (EC E2) ( $29.4 \pm 21.63$  g), con un peso corporal en el día de la ovariectomía de  $240.7 \pm 18.19$  g, alcanzando al día 14 del periodo de estrés un peso de  $270.1 \pm 25.07$  g. El grupo control sin estrés crónico y con implante estrogénico (CTRL E2) tuvo una ganancia de peso corporal de  $46.8 \pm 9.05$  con un peso inicial de  $244.7 \pm 7$  g y  $291.5 \pm 11.1$ . El grupo sometido a estrés crónico con vehículo (EC Sham) tuvo una ganancia de peso de  $38.4 \pm 11.35$  g, que correspondieron  $260.7 \pm 9.7$  g al inicio del experimento y  $299.1 \pm 13$  g al final. La ganancia de peso corporal por grupos fue comparada con ANOVA no paramétrica de una vía [ $F(3, 54) = 2.954, p = 0.0406$ ], no se encontrando diferencias estadísticas en la comparación de la ganancia de peso global entre los grupos.

Los pesos por grupo fueron registrados a partir del día de la ovariectomía, donde la totalidad de los animales tuvo un peso corporal de 210-230 g de peso corporal y se asignaron de manera aleatoria a los grupos que recibieron implante subcutáneo con estradiol sin estrés crónico (CTRL E2), implante con vehículo sin estrés crónico

(CTRL Sham), implante con estradiol y sometido a estrés crónico (EC E2) e, implante con vehículo sometido a estrés crónico (EC Sham). Los resultados del peso promedio por grupo se compararon con una ANOVA paramétrica de dos vías tomando los factores de estrés crónico o condición control, así como la presencia o ausencia de estrógeno por el tiempo: 7 días de recuperación posteriores a la ovariectomía e implante, 5 días de habituación al pesaje, y 14 días del protocolo de estrés por restricción o manipulación para pesaje (Figura 5).

El factor estrés crónico resultó significativo [ $F(4, 812) = 57.05, p < 0.0001$ ], el factor tiempo mostró diferencias significativas [ $F(13, 812) = 75.89, p < 0.0001$ ], al igual que la interacción entre ambos factores [ $F(52, 812) = 3.090, p < 0.0001$ ]. Se aplicaron pruebas *post hoc* de Bonferroni, encontrando las diferencias que se muestran en la tabla 1.

Día	Medias del peso corporal por grupo	Grupos comparados	Significancia <i>Post hoc</i> Bonferroni comparaciones múltiples	
-2	EC E2 EC Sham CTRL E2 CTRL Sham	231.4 ± 19.05 256.7 ± 15.97 242.3 ± 16.61 253.8 ± 19.01	EC E2 vs EC sham EC E2 vs CTRL sham EC sham vs CTRL sham	p<0.05 p<0.05 p<0.05
2	EC E2 EC Sham CTRL E2 CTRL Sham	234.5 ± 20.56 267.3 ± 19.81 252.4 ± 16.44 269.5 ± 21.05	EC E2 vs CTRL sham EC E2 vs EC sham	p<0.001 p<0.001
4	EC E2 EC Sham CTRL E2 CTRL Sham	241.9 ± 22.41 274.2 ± 20.22 261.8 ± 17.16 281.4 ± 23.12	EC E2 vs CTRL sham EC E2 vs EC sham	p<0.0001 p<0.001
6	EC E2 EC Sham CTRL E2 CTRL Sham	238.9 ± 21.22 275.3 ± 18.02 259.7 ± 16.13 283.4 ± 22.17	EC E2 vs CTRL sham EC E2 vs EC sham	p<0.0001 p<0.0001
8	EC E2 EC Sham CTRL E2 CTRL Sham	252.7 ± 24.71 284.5 ± 21.39 275.1 ± 19.29 298.1 ± 23.54	EC E2 vs CTRL sham EC E2 vs EC sham	p<0.0001 p<0.001
10	EC E2 EC Sham CTRL E2 CTRL Sham	251.8 ± 23.19 288.5 ± 21.50 280.5 ± 19.02 303.4 ± 24.39	EC E2 vs CTRL sham EC E2 vs EC Sham EC E2 vs CTRL E2	p<0.0001 p<0.0001 p<0.01
12	EC E2 EC Sham CTRL E2 CTRL Sham	259.7 ± 25.28 294.3 ± 19.90 292.1 ± 22.04 307.2 ± 23.70	EC E2 vs CTRL Sham EC E2 vs CTRL E2 EC E2 vs EC Sham	p<0.0001 p<0.001 p<0.001
14	EC E2 EC Sham CTRL E2 CTRL Sham	263.2 ± 25.86 299.4 ± 21.38 299.6 ± 21.96 314.1 ± 24.71	EC E2 vs CTRL Sham EC E2 vs CTRL E2 EC E2 vs EC Sham	p<0.0001 p<0.0001 p<0.0001

Tabla 1. Comparación de los cambios en el peso corporal a lo largo del experimento. Los días -4 y -2 corresponden al periodo de habituación, mientras que los números positivos corresponden a los 14 días del periodo de estrés por restricción o de manipulación control. CTRL Sham: control sin estradiol, CTRL E2: control con estradiol, EC Sham: estrés crónico sin estradiol, EC E2: estrés crónico con estradiol.

No se encontraron diferencias estadísticas al momento de la ovariectomía o durante los 7 días del periodo de recuperación post quirúrgico (días -10, -8 y -6, Figura 5). Los cambios en el peso corporal registrados en los grupos comienzan a ser notables el día a partir del primer día del periodo de habituación (día -2, Figura 5) entre el

grupo EC E2 con el menor peso corporal y ambos grupos Sham (CTRL Sham y EC Sham,  $p < 0.05$ ), lo que sugiere que los efectos del estradiol son evidentes tras 8 días de haber sido colocado el implante subcutáneo, en ausencia de protocolo de restricción.

Estos cambios en el peso corporal son progresivos en los días subsecuentes, alcanzando una significancia estadística mayoral día 4 del periodo de estrés entre el grupo con estrés crónico y estrógeno (EC E2) y el grupo control sin estrés/ sin estrógeno (CTRL Sham) ( $p < 0.0001$ ), y entre el grupo EC E2 y EC Sham ( $p < 0.01$ ), donde los animales del grupo EC E2 tuvieron el menor peso corporal comparado con ambos grupos Sham sin estrógeno. Al día 6, se encontraron diferencias entre el grupo EC E2 y los grupos estresado (EC Sham) y control sin estradiol (CTRL Sham) y grupo control. Este resultado sugiere que el estradiol induce una menor ganancia de peso corporal en los animales estresados. Esta diferencia en el peso corporal la cual se mantuvo entre el grupo EC E2 y ambos grupos Sham hasta el final del experimento.

Para el día 10 del periodo de estrés, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) también entre el grupo EC E2 y CTRL E2 (control de pesaje con estradiol), adicional a las encontradas entre el grupo EC E2 y ambos grupos Sham. Las diferencias entre el EC E2 respecto al grupo CTRL E2, así como a ambos grupos sin estradiol alcanzaron una significancia estadística mayor ( $p < 0.0001$ ) en el día 14, último del experimento (Tabla 1). Esto sugiere que los efectos del estrés crónico sobre la ganancia de peso corporal se acentuaron luego de 10 días del inicio de la exposición, y que son potenciados por la presencia de estradiol.

## Ganancia de Peso Corporal

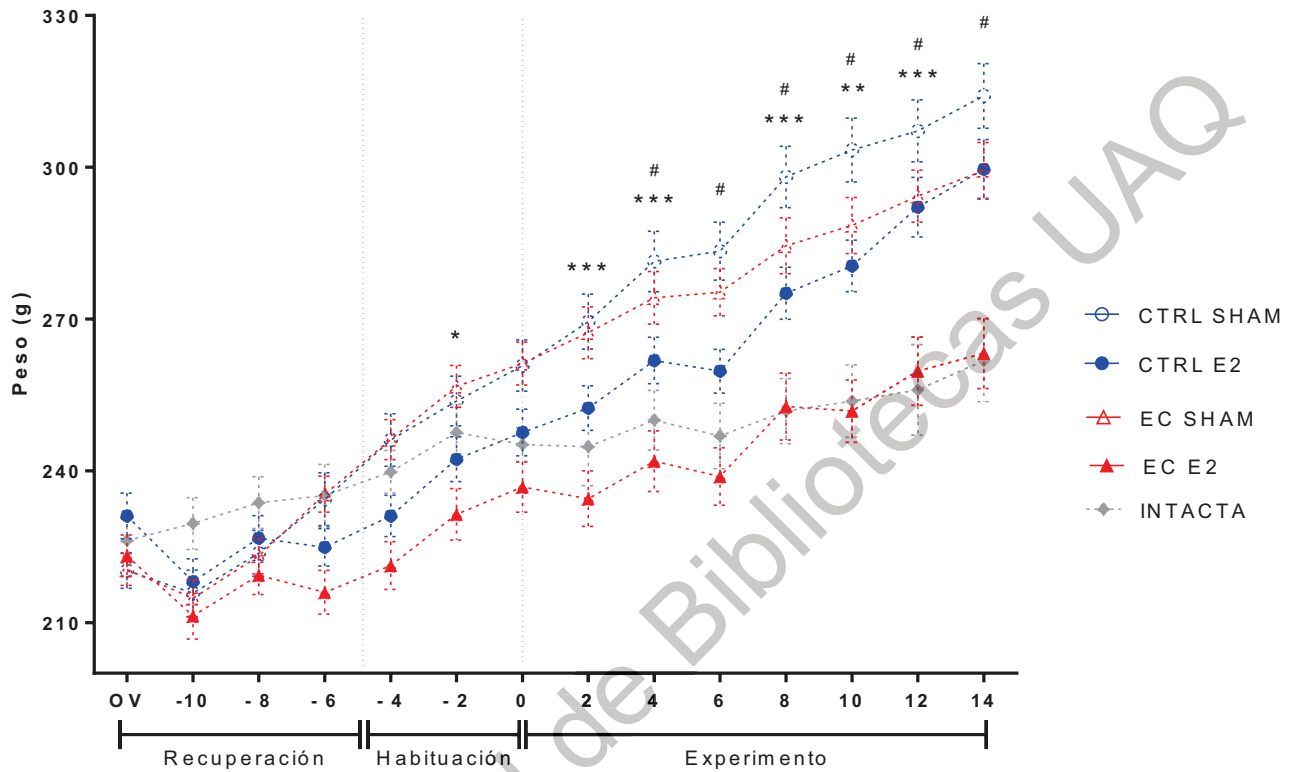


Figura 5. Ganancia de peso corporal. Registro del peso corporal a partir del día de la ovariectomía (OV) hasta el día 14 del periodo de restricción o manipulación control. Se encontraron diferencias significativas (\*  $p < 0.05$ ) en la prueba post hoc de Bonferroni entre el grupo EC E2 y ambos grupos Sham (CTRL Sham y EC Sham) a partir del primer día de habituación, alcanzando una significancia estadística mayor (#  $p < 0.0001$ ) en el día 4 del periodo de estrés, entre el grupo EC E2 y CTRL Sham, y en el día 6 para el grupo EC E2 y EC Sham. Para el día 10 del periodo de estrés, se encontraron diferencias significativas (\*\*  $p < 0.01$ ) entre el grupo EC E2 y CTRL E2, alcanzando una significancia estadística mayor (#  $p < 0.0001$ ) al final del experimento. En línea gris se muestra la progresión del peso de animales intactos, en los que no se realizó ninguna manipulación. Las medidas expresadas representan la media y desviación estándar, analizadas con ANOVA de dos vías.

## VII. 2 Peso de glándulas adrenales

El peso de las glándulas adrenales obtenidas en fresco de todos los grupos experimentales (n=40, 10 por cada grupo), se muestran en la figura 6. El peso de las glándulas adrenales se expresa con relación al peso corporal (un gramo de peso de glándulas adrenales/100 gramos de peso corporal). Los datos obtenidos de los cuatro grupos fueron analizados con la prueba ANOVA de una vía, obteniendo un valor significativo de  $[F(3, 35) = 24.72, p 0.0001]$ . Las diferencias entre grupos se determinaron con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, como se muestra en la figura 6.

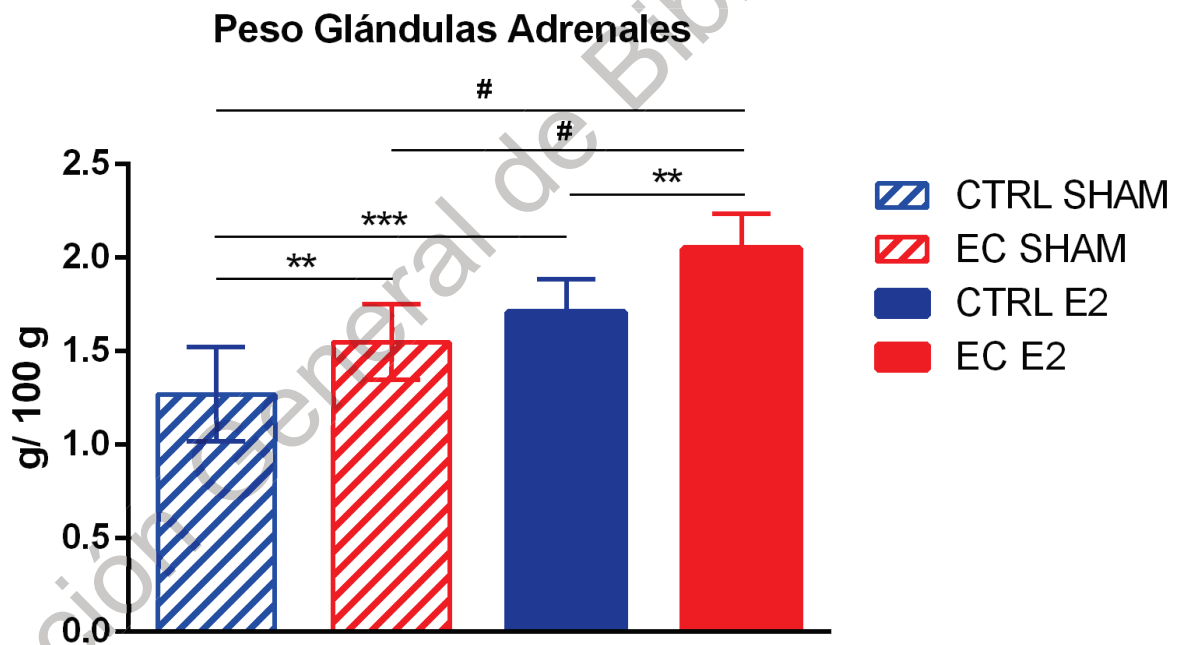


Figura 6. Peso de glándulas adrenales. Relación entre el peso de las glándulas adrenales y el peso corporal correspondientes a cada uno de los 4 grupos. La medición está expresada en 1 g de peso de ambas adrenales por 100 g de peso corporal. Se encontraron diferencias significativas con la prueba ANOVA ( $F(3, 35) = 24.72, p < 0.0001$ ). Se encontraron diferencias entre los grupos con estrés crónico y control sin estrés sin estradiol (EC SHAM y CTRL SHAM,  $** p < 0.01$ ), así como entre las condiciones de estrés crónico y control en presencia de estradiol (EC E2 y CTRL E2,  $p < 0.01$ ). También se encontraron diferencias ( $*** p < 0.001$ ) en el peso de las glándulas adrenales entre las condiciones control sin estradiol (CTRL SHAM) y con estradiol (CTRL E2) con mayor peso este último grupo. Los grupos estresado sin estradiol (EC SHAM) y con estradiol (EC E2) mostraron diferencias significativas entre sí ( $\# p < 0.0001$ ) con el mayor peso de las glándulas adrenales en este último grupo. Las medidas expresadas son la media y la desviación estándar de cada condición.



Se encontró que el grupo con estrés crónico y estradiol (EC E2) presentó la mayor relación del peso de las glándulas adrenales y peso corporal ( $X = 2.05 \pm 0.18$  g) mientras que los animales con menor relación pertenecían al grupo control sin estradiol (CTRL Sham) con  $X = 1.27 \pm 0.25$  g, encontrando diferencias significativas entre ellos ( $p < 0.0001$ ). Las medidas expresadas corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar.

Los animales del grupo control con estradiol (CTRL E2) tuvo un peso significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) de las glándulas adrenales que la misma condición sin la hormona (CTRL Sham). En tanto, los animales del grupo sometido a estrés crónico con estradiol (EC E2) tuvieron también significativamente mayor peso glandular ( $p < 0.0001$ ) comparados con el grupo sometido a estrés sin estradiol (EC Sham). Este resultado sugiere que el estrógeno ejerció un efecto potenciador sobre el peso de la glándula adrenal independientemente de la condición experimental.

Adicionalmente, los animales de los grupos sometidos a estrés crónico tuvieron comparativamente mayor peso glandular comparados con la condición control, tanto en presencia como en ausencia de estradiol; encontrando diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los grupos CTRL Sham y EC Sham, así como entre los grupos CTRL E2 y EC E2. Este resultado sugiere que el sometimiento al protocolo de estrés por restricción por 14 días induce un incremento en el peso de la glándula adrenal, de manera independiente a la acción de los estrógenos.

### **VII. 3 Cuantificación hormonal**

Posterior a la obtención de plasma de las 4 condiciones experimentales (n= 40; 5 animales por grupo) se cuantificaron las hormonas de ACTH y corticosterona en los grupos de estudio. La medición se llevó a cabo en condiciones basales o tras la exposición a un único episodio de estrés de restricción durante 30 minutos previo a la decapitación y obtención del plasma.

#### **VII. 3. 1 ACTH**

Los valores obtenidos en cada uno de los 4 grupos de estudio se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis debido al tamaño de la muestra y a que algunos de los valores de los grupos no cubrieron el criterio de distribución normal. Los resultados muestran diferencias significativas entre sí ( $H(8) = 24.4$ ,  $p < 0.001$ ), seguido de comparaciones múltiples de Dunn (Figura 7). Los resultados se muestran en la figura 7A.

En la hormona adrenocorticotrópica, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el nivel hormonal en las comparaciones entre los grupos control sin estradiol (CTRL Sham) en el tiempo cero y el grupo control con estradiol (CTRL E2) en el minuto 30 posterior al inicio del episodio de estrés, con el nivel más alto en este último grupo. Asimismo, se encontró diferencias entre el nivel basal de ACTH en el grupo CTRL Sham, con un nivel significativamente menor ( $p < 0.01$ ) que aquel inducido por 30 minutos de estrés de restricción del grupo estresado crónico con estradiol (EC E2). También se encontró diferencia entre el nivel basal de ACTH en el grupo estresado crónico sin estradiol (EC Sham) y el nivel significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) de la hormona en los animales estresados crónicos (EC E2) expuestos por 30 minutos a estrés de restricción.

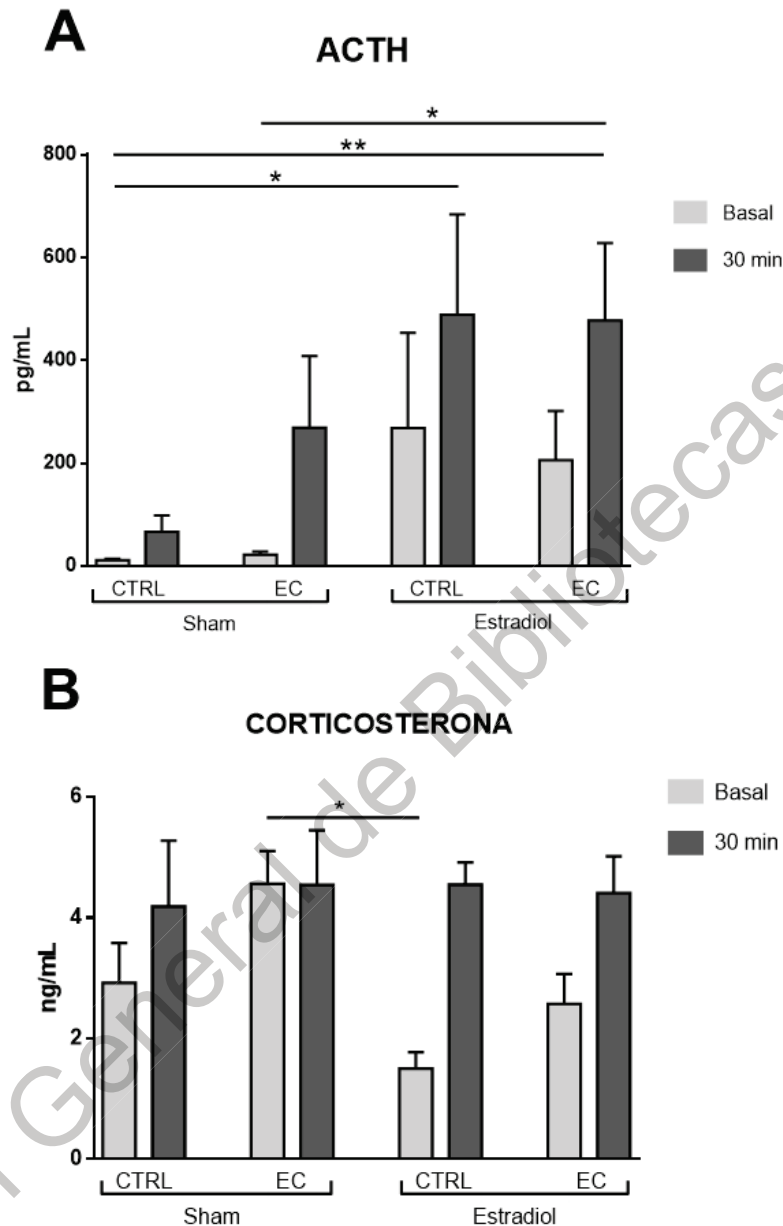


Figura 7. Nivel basales e inducidos por el último episodio de 30 minutos de estrés por restricción de las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales en los grupos control y estresado crónico sin estradiol (CTRL Sham y EC Sham), y las condiciones análogas en presencia de estradiol (CTRL E2 y EC E2). A) ACTH. Se observaron diferencias significativas con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis ( $p < 0.001$ ), así como entre el nivel basal del grupo control sin estradiol (CTRL Sham), respecto al nivel inducido por 30 minutos de estrés de restricción de los grupos control con estradiol (CTRL E2,  $p < 0.05$ ) y estresado crónico con estradiol (EC E2) ( $p < 0.01$ ) en la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Dunn. También se encontraron diferencias entre el nivel basal de ACTH del grupo estresado crónico sin estrógeno (EC Sham) y el nivel posterior a 30 minutos de restricción en el grupo sometido a estrés crónico con estradiol (EC E2) ( $p < 0.05$ ). B) Corticosterona. Se observaron diferencias significativas en la prueba Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ), así como en el nivel basal de corticosterona entre los grupos estresado crónico sin estradiol (EC Sham) y control con estradiol (CTRL E2) ( $p < 0.05$ ).

Es importante hacer notar que, aunque la comparación de los niveles basales de ACTH fue significativa ( $H(4) = 9.14, p < 0.05$ ) con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, no se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles basales de las 4 condiciones experimentales con la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Dunn. De manera similar, al comparar los niveles de ACTH inducidos por 30 minutos de estrés por restricción de los 4 grupos con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis el resultado arrojó diferencias significativas ( $H(4) = 7.89, p < 0.05$ ), si bien no se encontraron diferencias significativas entre grupos con la prueba *post hoc* de Dunn.

Resulta relevante mencionar que, aunque no se encontraron diferencias significativas en las pruebas *post hoc* de Dunn, existe una tendencia a que el nivel basal de la hormona ACTH sea mayor en los animales control o estresados crónicos en presencia de estradiol. Asimismo, existe una tendencia a que el nivel de ACTH sea incrementado por el hecho de haber estado sometido a estrés por 14 días en el grupo que carecía de estradiol (Figura 7A). Otra observación es que existe una tendencia a que el nivel de ACTH inducido por el último episodio de restricción sea mayor en los animales control y estresados crónicos con implante de estradiol, comparado con el grupo estresado crónico sin estradiol. El nivel de ACTH inducido por 30 minutos de estrés oscila alrededor de los 500 pc/mL (diferente de los 300 pc/mL del grupo estresado crónico sin estradiol) tanto en la condición control como estresada crónica en presencia de estradiol; por lo que se sugiere que este sea el nivel máximo de liberación fisiológica de ACTH probablemente potenciado por estradiol.

### VII. 3. 2 Corticosterona

Los niveles plasmáticos de corticosterona correspondientes a cada uno de los 4 grupos de estudio se muestran de forma esquemática en la figura 7B. Los datos fueron analizados utilizando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, donde se encontró que los grupos eran significativamente diferentes ( $H(8) = 9.14, p < 0.05$ ). No encontraron diferencias significativas en los grupos con la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Dunn.

Los valores de los niveles basales de corticosterona con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas ( $H(4) = 10.2, p < 0.05$ ), encontrando diferencias entre los grupos estresado crónico sin estradiol (EC sham) con nivel significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) de corticosterona basal comparado con el grupo control con estradiol (CTRL E2). Finalmente, la comparación de los valores de corticosterona inducida por la exposición a 30 minutos de estrés de restricción con la prueba Kruskal-Wallis, esta arrojó diferencias significativas ( $H(4) = 7.89, p < 0.05$ ), sin encontrarse diferencias en las comparaciones múltiples de Dunn.

De manera general, ambos grupos con estrógeno (CTRL E2 y EC E2), así como el grupo control sin estrógeno mostraron un incremento esperado, en el nivel de corticosterona por inducción de 30 minutos de estrés por restricción, alrededor de 4 ng/mL comparado con 1-3 ng/ mL del nivel basal de la hormona; excepto el grupo estresado crónico sin estradiol (EC Sham) que no presentó el incremento esperado acorde a la fisiología, registrado valores basales comparables con los inducidos por la exposición al episodio final de 30 minutos de estrés de restricción.

#### VII. 4 Inmunohistoquímica del receptor 5-HT7

En la figura 8 se presentan los resultados de la inmunohistoquímica del receptor 5-HT7 realizadas en un animal intacto y en los 4 grupos de estudio. De forma general se puede observar que la expresión es notablemente distinta a la reportada previamente en machos tanto en condiciones control como de estrés crónico (Figura 2). De forma general, en las hembras la expresión del receptor 5-HT7 es menor que la encontrada en machos. Para fines de este trabajo, consideramos que la expresión basal del receptor 5-HT7 en el NPV corresponde a la condición control con estrógeno, dado que la expresión del receptor resultó ser mínima en el animal intacto. Esto último podría asociarse a posibles cambios en la expresión del receptor 7 ligados al ciclo estral, aunque no existe evidencia en la literatura de esta especulación.

De este modo, la observación de los cortes representativos de los niveles anterior medio y posterior de PVN, evidenció que la expresión del receptor 5-HT7 es menor en los animales del grupo control sin reemplazo de estradiol (CTRL Sham) comparado con la condición análoga en presencia de estrógenos (CTRL E2). Este hallazgo sugiere que la expresión del receptor 7 en el NPV está asociada a la presencia de estrógenos. También se observó que la expresión del receptor 5-HT7 fue menor en el grupo sometido a estrés crónico con estradiol (EC E2) comparado con el grupo control con estradiol (CTRL E2). Este hecho sugiere que la condición de estrés induce una disminución en la expresión crónica pese a la presencia de estradiol.

La comparación cualitativa de la expresión del receptor 7 en ambas condiciones de sometimiento a estrés crónico, con y sin estradiol (EC E2 vs EC Sham), permitió observar que la menor expresión se encuentra en el grupo de estrés crónico sin estradiol (EC Sham), lo cual sugiere que la condición de estrés crónico podría ser una agravante de la baja expresión del receptor 5-HT7 en ausencia de estrógeno.

En otras palabras, que ambos factores: el estrés y la falta de estrógeno inciden negativamente en la expresión del receptor de serotonina 7 en el NPV.

De forma adicional, se encuentra una notable expresión a nivel de las células endimarias del tercer ventrículo, con un patrón similar entre ambos grupos control con o sin estradiol, y el de estrés crónico con estradiol; y significativamente menor nuevamente en el grupo de estrés crónico sin estradiol (EC Sham) similar a lo observado en el NPV. Se desconoce la función del receptor 5-HT7 en las células del epéndimo en el tercer ventrículo en la rata hembra.

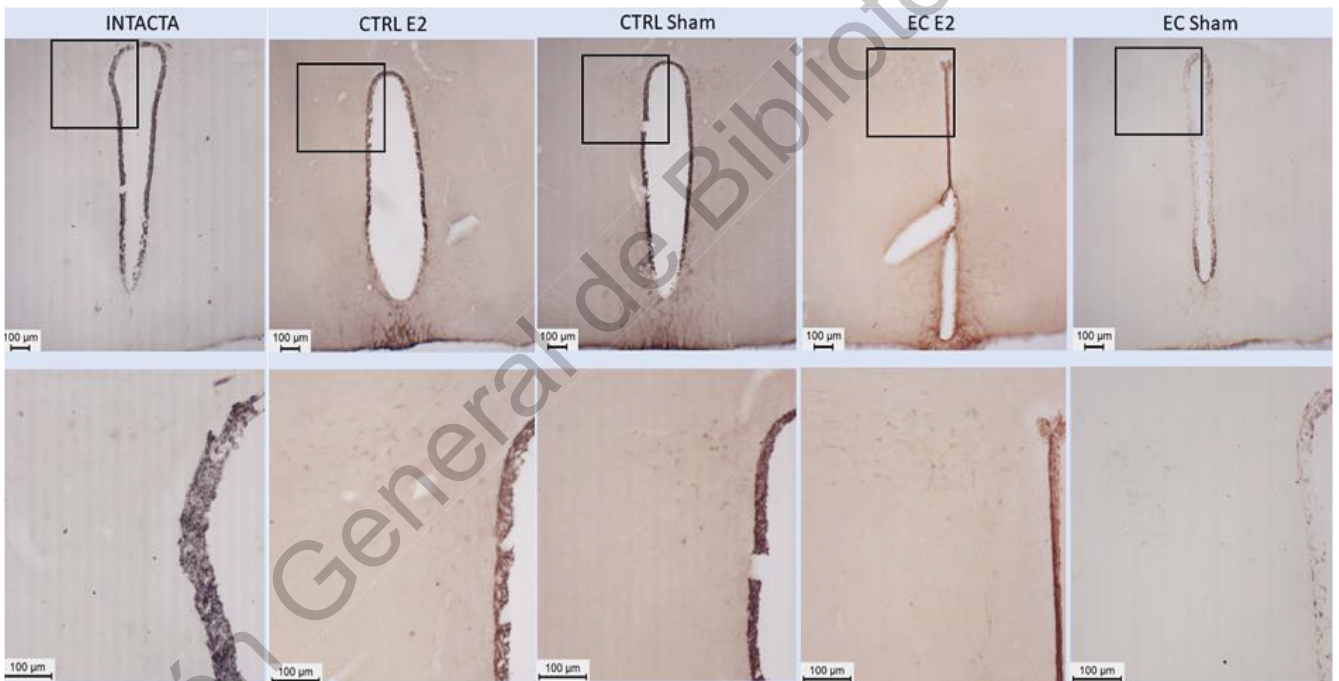


Figura 8. Inmunohistoquímica del receptor 5-HT7 en el NPV del hipotálamo. Se evaluó la expresión del receptor en los 4 grupos de estudio y en un animal intacto. Se puede observar que la expresión del receptor es menor en el PVN de un animal intacto respecto al grupo control con reemplazo estrogénico (CTRL E2), por lo que para fines de este trabajo se considera como expresión basal la correspondiente a este último grupo. Puede observarse que la expresión del receptor 5-HT7 es menor en el grupo control sin estradiol (CTRL Sham) comparado con la condición análoga con hormona (CTRL E2), por lo que se adjudica que la expresión del receptor serotoninérgico 7 se relaciona con la presencia de estradiol sistémico. Se observa también, que el sometimiento al protocolo de estrés por restricción por 14 días consecutivos disminuye la expresión del receptor 5-HT7 en los animales del grupo con estrógeno (EC E2), respecto al control de manipulación (CTRL E2); hallazgo que sugiere el efecto negativo del estrés crónico sobre la expresión del receptor. El grupo con menor expresión del receptor 7 en el NPV fue aquel sometido a estrés sin reemplazo hormonal (EC Sham), hecho que apunta hacia el efecto sinérgico negativo de ambas variables sobre la expresión del receptor 7 en el NPV.

## VIII. DISCUSIÓN

Este trabajo es el primero en arrojar luz respecto a la expresión del receptor 7 de serotonina en la rata hembra. Dicho receptor está vinculado a la regulación neuroendocrina del eje hipotálamo-hipófisis- adrenales en dos puntos importantes: el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), centro integrador de la respuesta endócrina al estrés y, en la glándula adrenal que funge como amplificador sistémico de la respuesta; basado en estudios hechos en la rata macho.

Una de las aportaciones más relevantes del presente trabajo es la fuerte noción que el estradiol ejerce un efecto en la regulación de la homeostasis energética, generando una menor ganancia de peso corporal en los animales implantados con la hormona respecto a los grupos análogos carentes de la misma. Adicionalmente, este efecto sobre la ganancia de peso corporal fue potenciado por el sometimiento a estrés crónico por 14 días consecutivos. Dado que, los grupos estresados con estradiol y sin él, mostraron una menor ganancia de peso corporal a partir del día 10 del inicio del periodo de restricción y hasta el final del experimento en el día 14.

Los efectos mediados por estradiol fueron identificados luego de una semana de haber colocado el implante, mientras que los efectos atribuidos al estrés crónico empiezan a ser evidentes tras 10 días de exposición a este, teniendo como resultado que el grupo que presentó menor ganancia de peso corporal fue el suplementado con estradiol y sometido a estrés crónico, mientras que el que presentó mayor ganancia fue el control sin estradiol. Los hallazgos en el peso de las glándulas adrenales fueron opuestos, encontrando que el grupo con mayor relación entre el peso de la glándula y el peso corporal (1 g/ 100 g) fue aquel con reemplazo de estradiol y estrés crónico (EC E2), mientras que el menor fue el grupo control sin estradiol (CTRL Sham).



Nuestros resultados coinciden con reportes previos tanto en roedores como en humanos (Heine *et al*, 2000; Okura *et al*, 2003), ya que los estrógenos ejercen un efecto anti-obesogénico a través del receptor tipo  $\alpha$ , pues se ha documentado que mutaciones en este gen se asocian al incremento en la ingesta alimentaria y reducción del gasto energético mediante la disminución en la locomoción (Xu *et al*, 2011) y en la termogénesis dependiente del tejido adiposo marrón (Kamei *et al*, 2005). Uno de los sitios efectores principales es el núcleo arcuato, en el que las neuronas productoras de POMC coexpresan el receptor tipo  $\alpha$  que al ser activado por el 17- $\beta$  estradiol incrementa su tasa de disparo y liberación de las hormonas (ACTH, entre ellas) (Gao *et al*, 2006; De Souza F *et al*, 2011; Stincic *et al*, 2018). Se conoce también que otras regiones encefálicas involucradas en el control de la ingesta y la saciedad como el núcleo del tracto solitario (Asarian y Geary, 2007) y los núcleos del rafe dorsal (Santollo *et al*, 2011) son controladas o influidas por estrógenos a través del receptor  $\alpha$ .

Los estrógenos pueden actuar también sobre la glándula adrenal, a través de la unión con receptores ( $\alpha$ ,  $\beta$  y GPR30) ampliamente expresados en todas las zonas de la corteza adrenal, o bien interfiriendo directamente con procesos enzimáticos (Trejter *et al*, 2015). Se ha determinado en animales ovariectomizados, que tras suplementar con dosis fisiológicas de estradiol, el peso de las glándulas adrenales se incrementa principalmente a expensas de la zona glomerular y fascicular sitios de síntesis de mineralocorticoides y glucocorticoides, respectivamente; aunque también a través del incremento en la vascularización en la médula adrenal que conduce a un incremento de la actividad de la glándula adrenal en su totalidad (Saruhan y Ozdemir, 2005). De aquí que, los grupos control y estresados crónicos con estradiol tuvieran una mayor relación del peso de la glándula adrenal comparados con sus análogos sin estrógeno.

Por otra parte, la activación crónica del eje HHA conduce a una mayor demanda sobre las glándulas adrenales y a una menor ganancia ponderal. La exposición

crónica a estrés conduce a una pérdida de la retroalimentación negativa mediada por una reducción en la expresión de receptores a glucocorticoides en el NPV (Herman, 2016), lo que conduce al incremento en los niveles de CRH y de POMC, ambos con conocidos efectos anorexigénicos (Sekino *et al*, 2004; Eerola *et al*, 2018). A nivel de la corteza adrenal se presenta hiperplasia e hipertrofia particularmente en la zona fascicular, y se ha descrito también una mayor sensibilidad a ACTH (Ulrich- Lai *et al*, 2006), lo que se traduce al aumento en los niveles circulantes de corticoesteroides, cuyo efecto lipolítico conduce a una pérdida ponderal (Kuo *et al*, 2017).

Nuestros resultados en referencia a los niveles hormonales del eje HHA, coinciden parcialmente con lo reportado previamente en la literatura, en donde se refiere a los estrógenos como potenciadores de las respuestas del eje HHA tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Un hallazgo importante es que los niveles basales de ACTH, así como aquellos inducidos por 30 minutos un episodio agudo de estrés, fueron mayores en presencia de estradiol, tanto en el grupo control como en los animales expuestos a estrés crónico. La respuesta fisiológica ante un estímulo estresor es el rápido aumento en los niveles de ACTH. Existe una tendencia a preservar este efecto en los animales que recibieron estradiol, así como en aquellos que implantados únicamente con el vehículo. Sin embargo, sólo se alcanzó significancia estadística entre el nivel basal de ACTH del grupo control sin estradiol y el inducido por 30 minutos de exposición a estrés de restricción en los grupos control y estresado en presencia de estradiol.

Los efectos potenciadores de los estrógenos en la síntesis y secreción de ACTH han sido descritos en investigaciones previas, a través de diversos mecanismos. Se ha reportado que animales ovariectomizados presentan una disminución en la secreción de ACTH inducida por estrés (Burgess y Handa, 1992; Burgess, 1993, Suzuki *et al*, 2001), efecto que no sólo es revertido al administrar estradiol, sino también es más acentuado respecto a la respuesta evocada en presencia de

testosterona (Lund *et al*, 2004). Estudios más recientes han reportado que en presencia de estradiol, existen mayores niveles de ARNm de c-fos y de CRH en el NPV en respuesta a distintos tipos de estrés, tanto físico como psicológico (Liu *et al*, 2011; Lund *et al*, 2004; Viau *et al*, 2005; Figueiredo *et al*, 2007). Este incremento en CRH se corresponde con un aumento en los niveles de ACTH, que presentan una elevación más rápida y acentuada que en ausencia de estradiol, principalmente en fases del ciclo estral que presentan mayores niveles ésta hormona (Iwasaki *et al*, 2009).

Estudios moleculares han permitido atribuir estos efectos sobre CRH y ACTH a la acción del receptor estrogénico  $\beta$ , pues este presenta una elevada expresión en poblaciones de neuronas productoras de CRH en el NPV del hipotálamo (Oyola *et al*, 2017). Más aún, mediante el empleo de antagonistas selectivos del RE $\beta$  se ha encontrado una respuesta atenuada en los niveles de corticosterona inducidos por estrés (Isgor *et al*, 2003). Otro mecanismo descrito es que los estrógenos median una disminución en el ARNm del receptor de glucocorticoides y de la capacidad de unión de corticosterona al mismo a nivel del hipotálamo y la adenohipófisis, que conduce a un defecto en la retroalimentación negativa del eje (Burgess y Handa, 1992; Burgess, 1993; Green *et al*, 2017). En base a los hallazgos antes mencionados, podemos afirmar que los efectos de los estrógenos a nivel del hipotálamo y la adenohipófisis son mediados por distintas vías, cuyo resultado último es la potenciación de la respuesta de CRH y ACTH. Esta noción apoya la tendencia en los grupos control y estresado crónico con estradiol a tener niveles basales de ACTH mayores que sus contrapartes sin reemplazo estrogénico.

Por otro lado, los niveles de corticosterona encontrados en este trabajo muestran un efecto dissociado respecto a los valores de ACTH, encontrando que, en ausencia de estradiol, los niveles basales son mayores que los reportados en los animales que recibieron suplementados estrogénico. Los valores tras 30 minutos de estrés agudo no fueron distintos entre los grupos de estudio. En este caso, la respuesta

fisiológica de incremento de los niveles de corticosterona en respuesta a un estímulo estresor agudo, se preserva únicamente en presencia de estradiol, mientras que, en ausencia de este, los niveles hormonales no muestran diferencias en condición basal y en respuesta a estrés.

Nuestro resultado respecto a la tendencia de los niveles basales de corticosterona más elevados en el grupo estresado crónico sin estradiol, son contrario a los reportados en la literatura que sostienen que tras la ovariectomía, así como mediante el uso de antagonistas de receptores estrogénicos, ocurre una reducción en los niveles basales de corticosterona y en respuesta al estrés. En tanto, la suplementación con estradiol revierte la disminución de ambos niveles de corticosterona (Isgor *et al*, 2003; Liu *et al*, 2012; Kalil *et al*, 2013; Lund, 2006). reportes previos sugieren que estas respuestas son debidas al menos en parte a un aumento en la sensibilidad de la corteza suprarrenal a la ACTH (Figueiredo *et al*, 2007). Sin embargo, estos resultados no siempre son consistentes entre los diferentes grupos de investigación ya que se ha reportado también que los estrógenos disminuyen la interacción de ACTH y el receptor 2 de melanocortina (MC2R) en la corteza adrenal y, de manera concomitante la liberación de glucocorticoide, pues inducen una disminución de la interacción entre éste y su proteína accesoria (MRAP) que regula la inserción del receptor en la membrana plasmática (Babischkin, 2010).

Otro mecanismo al que puede atribuirse la menor concentración de corticosterona encontrada en nuestro trabajo es explicado por la proteína fijadora de corticoesteroides (CBP), cuya síntesis hepática es estimulada por estradiol, de tal manera que mayores niveles de esta proteína pueden asociarse a menores niveles circulantes libres de corticosterona (Lin *et al*, 2010). Por otra parte, se ha descrito que el estradiol actúa como un supresor de la síntesis hepática y renal de la enzima  $11\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa, la cual es responsable de la conversión de cortisona, una molécula inactiva, a su forma activa: cortisol en el humano y

corticosterona en el roedor (Paulsen *et al*, 2008), de tal forma que la ausencia de estradiol puede favorecer el incremento de corticosterona. De este modo, se sugiere realizar más investigación a fin de elucidar el efecto del estradiol sobre los niveles basales de corticosterona.

Este trabajo evalúa por primera vez la expresión del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el NPV del hipotálamo en ratas hembra tanto en condiciones basales como en respuesta al estrés crónico. Reportes previos realizados en machos, muestran una notable expresión de este receptor en condiciones basales que se reduce con la exposición crónica a estrés (García-Iglesias *et al*, 2013). Nuestros resultados muestran que en la hembra los patrones de expresión son notablemente distintos, pues en condiciones basales son menores que los reportados en machos, encontrando además, que la presencia de estradiol protege de la disminución en la expresión en condiciones de estrés crónico. Asimismo, los resultados de este trabajo sugieren que los estrógenos están implicados en expresión del receptor 7 de serotonina en el NPV en la rata hembra y, posiblemente participe en la desregulación del eje HHA en condiciones de estrés crónico.

## IX. CONCLUSIONES

El estrés crónico conlleva a la desregulación del eje HHA. Los hallazgos de este trabajo sugieren que la presencia de estradiol acentúa tales diferencias en la rata hembra. El efecto sinérgico de los estrógenos y el estrés crónico pudo observarse en la menor ganancia de peso corporal y mayor peso de las glándulas adrenales los animales estresados y suplementados con estradiol. De manera concomitante, los niveles basales e inducidos por estrés de restricción de ACTH fueron mayores en aquellos animales suplementados con estradiol respecto a sus controles, independientemente de estar sometidos a estrés crónico, aunque fue mayor en este último caso. Esta respuesta hipofisiaria incrementada, apoyan la noción del papel potenciador de los estrógenos sobre el eje HHA a nivel central en las hembras. Las respuestas periféricas evaluadas por los niveles de corticosterona siguieron un patrón fisiológico de elevación inducida por un evento estresante en los animales control de estrés con estradiol y en ausencia del mismo, así como en las ratas estresadas suplementadas con estradiol; este patrón se encuentra ausente en condiciones de estrés crónico en ausencia de estradiol. Este hallazgo sugiere que, que pese al efecto potenciador de los estrógenos sobre el eje HHA, desempeñan también preservador de la sincronía del eje en condiciones de estrés crónico.

Un hallazgo relevante fue que la expresión del receptor 5-HT7 en el NPV fue notablemente menor que aquella observada en machos en condiciones basales y de estrés crónico (García- Iglesias, 2013). En la condición control la ausencia de estrógeno se asocia a un menor nivel de expresión del receptor 7 de serotonina, lo que sugiere que el estradiol podría ejercer un efecto regulador de la transcripción del mismo. Asimismo, existe una disminución en la expresión del receptor 5-HT7 en aquellos animales sometidos a estrés crónico en presencia de estradiol respecto a los controles con estradiol pero sin estrés. Este resultado apoya los reportes previos que postulan que el estrés y los altos niveles de serotonina que este induce a nivel del NPV, constituyen un factor deletéreo sobre la expresión de este receptor 5-HT7

en ambos sexos. Adicionalmente, el grupo con menor expresión del receptor 7 fue aquel sometido a estrés crónico en ausencia de estradiol, lo cual sugiere que ambas variables, el estrés y la ausencia de estrógeno podrían incidir negativamente sobre la expresión del receptor 5-HT7 y quizá, otros receptores serotoninérgicos involucrados en la respuesta al estrés. Finalmente, este trabajo concluye que la interacción neuroendocrina de la respuesta al estrés es compleja y que el estradiol ejerce un efecto altamente relevante en la regulación, como en la potenciación del eje HHA a nivel central y sistémico.

Como perspectivas para la investigación futura, queda por elucidar si la expresión del receptor 5-HT7 en el NPV sigue un patrón asociado al ciclo estral; ya que, la evaluación cualitativa de expresión del receptor en la hembra intacta, difieren de aquella suplementada con estrógeno. También permanece por esclarecer el efecto que el estrés y la privación de estrógenos ejercen sobre los receptores serotoninérgicos, como el 5-HT7, presentes en otros tejidos afectados por el estrés y la ausencia de estrógeno como el intestino, glándula adrenal y tejido adiposo. Finalmente, sostenemos que este trabajo ha arrojado un poco de luz sobre la fisiología del estrés y su interacción con la hormona sexual femenina; que sin duda contribuirá a la comprensión de los procesos normales y patológicos que subyacen a afecciones humanas asociadas al género (femenino) como la depresión mayor, la colitis nervosa y la obesidad.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A, Hedlund P, Huang X, Tran T, Meltzer H. (2009). Amisulpride is a potent 5-HT7 antagonist: relevance for antidepressant actions in vivo. *Psychopharmacology*. 20:119-128.

Abelaira HM, Réus GZ, Quevedo J. (2013). Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Braz J Psychiatry*.35: Suppl 2:S112-20.

Asarian L., & Geary N. (2007). Estradiol Enhances Cholecystokinin-Dependent Lipid-Induced Satiety and Activates Estrogen Receptor- $\alpha$ -Expressing Cells in the Nucleus Tractus Solitarius of Ovariectomized Rats. *Endocrinology*. 148(12): 5656–5666.

Babischkin J, Aberdeen G, Pepe G, Albrecht E. (2016). Estrogen Suppresses Interaction of Melanocortin 2 Receptor and Its Accessory Protein in the Primate Fetal Adrenal Cortex. *Endocrinology*. 157(12), 4588–4601.

Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL. (1993). Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*.;268:23422-6.

Behan DP, De Souza EB, Lowry PJ, Potter E, Sawchenko P, Vale WW. (1995). Corticotropin releasing factor (CRF) binding protein: a novel regulator of CRF and related peptides. *Front Neuroendocrinol* .16:362–382.

Burgess L, Handa R. J. (1992). Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology*. 131: 1261–1269.



Burgess L. (1993). Estrogen-Induced Alterations in the Regulation of Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptor Messenger RNA Expression in the Female Rat Anterior Pituitary Gland and Brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 4: 191–198.

Burgos-Santillán I, McGregor-Regalado JP, Rodríguez-Córdova V, Hernández-Montiel HL, Mendoza-Trejo MS, Hernández-Chan NG. (2017). Progressive changes in the expression of 5-HT7 serotonin receptor in paraventricular nucleus of hypothalamus are related to differences in spontaneous motor behavior in a rodent model of chronic stress. *Jornadas Académicas Instituto de Neurobiología*, póster 19.

Burrows HL, Nakajima M, Lesh JS, Goosens KA, Samuelson LC, Inui A, Camper SA, Seasholtz AF. (1998). Excess corticotropin releasing hormone-binding protein in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in transgenic mice. *J Clin Invest*. 101:1439–1447

Buynitsky T, Mostofsky DI. (2009). Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*. 33:1089-98.

Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimarães FS. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz J Psychiatry*. 35 Suppl 2:S101-11.

Cates L, Roberts A, Huitron-Resendiz S, Hedlund P. (2013). Effects of lurasidone in behavioral models of depression. Role of the 5-HT7 receptor subtype. *Neuropharmacology*. 70: 211-217.

Charnay Y, Léger L. Brain serotonergic circuitries. (2010) *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 12: 471-483.

Chávez- León E, Ontiveros Uribe M, Serrano Gómez C. (2008). Los antidepresivos inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (ISRS, ISR-5HT). *Salud Mental*; 31:308-319.

Cruz-Martínez AM, Tejas-Juárez JG, Mancilla-Díaz JM, Florán-Garduño B, López-Alonso VE, Escartín-Pérez RE. (2018). CB1 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulate the release of 5-HT and GABA to stimulate food intake in rats. *European Neuropsychopharmacology*; 28: 1247-1259.

Dayer A. (2014). Serotonin-related pathways and developmental plasticity: relevance for psychiatric disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 16(1):29-41.

De Souza F. S. J, Nasif S, López-Leal R, Levi D. H, Low M. J, Rubinsten M. (2011). The estrogen receptor  $\alpha$  colocalizes with proopiomelanocortin in hypothalamic neurons and binds to a conserved motif present in the neuron-specific enhancer nPE2. *European Journal of Pharmacology*. 660(1): 181–187.

Duval F, González F, Rabia H. (2010). Neurobiology of stress. *Revista Chilena de Neuropsiquiatría*. 48(4):307-318.

Eerola K, Virtanen S, Vähätalo L, Ailanen L, Cai M, et al. (2018). Hypothalamic  $\gamma$ -melanocyte stimulating hormone gene delivery reduces fat mass in male mice. *Journal of Endocrinology*. 18–0009.

Feuchtl A, Bagli M, Stephan R, Frahnert C, Kolsch H, Kuhn KU, Rao ML. (2004). Pharmacokinetics of m-chlorophenylpiperazine after intravenous and oral administration in healthy male volunteers: Implication for the pharmacodynamic profile. *Pharmacopsychiatry* 37: 180-188.

Figueiredo H, Ulrich-Lai Y, Choi D, Herman J. (2007). Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 292(4), E1173–E1182.

Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi C. S. Bechmann, I., et al. (2006). Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nature Medicine*. 13(1): 89–94.

García-Iglesias B, Mendoza-Garrido M, Gutiérrez-Ospina G, Rangel-Barajas C, Noyola-Díaz M, Terrón J. (2013). Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: Involvement of 5-HT7 receptors. *Neuropharmacology*. 71: 216-227.

Glavin GB, Paré WP, Sandbak T, Bakke HK, Murison R. (1994). Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav*. 18:223-49.

Goel N, Bale TL. (2010). Sex differences in the serotonergic influence on the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis. *Endocrinology* 151: 1784- 1794.

Goel N, Workman J, Lee T, Innala L, Viau V. (2014). Sex Differences in the HPA Axis. *Comprehensive Physiology*. 4: 1121-1155.

Green M, Marcolin M, McCormick C. (2017). The effects of ovarian hormones on stressor-induced hormonal responses, glucocorticoid receptor expression and translocation, and genes related to receptor signaling in adult female rats. *Stress*. 21(2), 90–100.

Guseva D, Wirth A, Ponimaskin E. (2014). Cellular mechanisms of the 5-HT7receptor-mediated signaling. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 8.

Haleem D, Kennett G, Whitton P, & Curzon G. (1989). 8-OH-DPAT increases corticosterone but not other 5-HT<sub>1A</sub> receptor-dependent responses more in females. *European Journal of Pharmacology*, 164(3), 435–443.

Hedlund P. (2009). The 5-HT<sub>7</sub> receptor and disorders of the nervous system: an overview. *Psychopharmacology*; 206:345-354.

HEIA, Sullivan N, Damjanoska K, Crane J, Carrasco G, Shi J, Chen Z, Garcia F, Muma N, Van de Kar L. (2005). Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1A receptor function, in male and cycling female rats. *Psychopharmacology* 179: 769-780.

Heine P. A, Taylor J. A, Iwamoto G. A, Lubahn D. B, Cooke P. S. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(23), 12729–12734.

Heinsbroek R, Van Haaren F, Feenstra M, Van Galen H, Boer G, Van de Poll N. (1990). Sex differences in the effects of inescapable footshock on central catecholaminergic and serotonergic activity. *Pharmacol Biochem Behav* 37: 539-550.

Herman J, McKlveen J, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, et al. (2016). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology*. 603–621.

Isgor C, Cecchi M, Kabbaj M, Akil H, Watson J. (2003). Estrogen receptor  $\beta$  in the paraventricular nucleus of hypothalamus regulates the neuroendocrine response to stress and is regulated by corticosterone. *Neuroscience*. 121: 837-845.

Iwasaki-Sekino A, Mano-Otagiri A, Ohata H, Yamauchi N, Shibasaki T. (2009). Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 34(2), 226–237.

Kalil B, Leite C, Carvalho-Lima M, Anselmo-Franci J. (2013). Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. *Stress*. 16(4), 452–460.

Kamei Y, Suzuki M, Miyazaki H, Tsuboyama N, Wu J, et al. (2005). Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*. 51(2): 110-7.

Kuo T, Chen T, Lee R, Nguyen N. Broughton, et al. (2017). *Pik3r1* Is Required for Glucocorticoid-Induced Perilipin 1 Phosphorylation in Lipid Droplet for Adipocyte Lipolysis. *Diabetes*. 66(6), 1601–1610.

Lanfume Y, Mongeau R, Cohen-Salmon C, Hamon M. (2008). Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 32(6):1174-1184.

Leopoldo M, Lacivita E, Berardi F, Perrone R, Hedlund P. (2011). Serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptor agents: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. *Pharmacology & Therapeutics*. 129(2):120-148.

Li DP, Pan HL. (2017). Glutamatergic Regulation of Hypothalamic Presympathetic neurons in Hypertension. *Current Hypertension Reports*; 19:78.

Lin H, Muller Y, Hammond G. (2010). Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 316(1), 3–12.

Liu J, Hu P, Qi XR, Meng FT, Kalsbeek A, Zhou JN. (2011). Acute Restraint Stress Increases Intrahypothalamic Oestradiol Concentrations in Conjunction with Increased Hypothalamic Oestrogen Receptor  $\beta$  and Aromatase mRNA Expression in Female Rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 23: 435-443.

Liu J, Bisschop P, Eggels L, Foppen E, Fliers E, Zhou J, et al. (2012). Intrahypothalamic Estradiol Modulates Hypothalamus-Pituitary-Adrenal-Axis Activity in Female Rats. *Endocrinology*. 153(7), 3337–3344.

Lund T, Munson D, Haldy M, Handa R. (2004). Androgen inhibits, while estrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*. 16:272-278.

Lund T, Rovis T, Chung W, Handa R. (2005). Novel Actions of Estrogen Receptor- $\beta$  on Anxiety-Related Behaviors. *Endocrinology*. 146(2):797-807.

Lund, T. (2006). The Androgen 5 -Dihydrotestosterone and Its Metabolite 5 -Androstan-3beta, 17beta-Diol Inhibit the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Response to Stress by Acting through Estrogen Receptor beta-Expressing Neurons in the Hypothalamus. *Journal of Neuroscience*. 26(5), 1448–1456.

Manfra O, Van Craenenbroeck K, Skieterska K, Frimurer T, Schwartz T, Levy F. O, & Andressen K. W. (2015). Downregulation of 5-HT7 Serotonin Receptors by the Atypical Antipsychotics Clozapine and Olanzapine. Role of Motifs in the C-Terminal

Domain and Interaction with GASP-1. ACS Chemical Neuroscience, 6(7), 1206–1218.

Martín-López M, Perea J, Morabet L, Navarro J. (2008). Actualización del papel de la enzima MAO-A en la regulación de la conducta agresiva. *Psiquiatría Biológica*. 15(5):175-81.

Matsuda T, Nakano Y, Kanda T, Iwata H, Baba A. (1991). Gonadectomy changes the pituitary-adrenocortical response in mice to 5-HT1A receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 200: 299-304.

Meraz M. T, Bañuelos P J. (2009). Effect of chronic stress on the dendritic remodeling in the region CA3 hippocampal. *e-Gnosis Revista Digital Científica y Tecnológica*. 7(3):2-12.

Miller W. J. S. (2004). Estrogen Receptor ER  $\beta$  Isoforms Rather Than ER  $\alpha$  Regulate Corticotropin-Releasing Hormone Promoter Activity through an Alternate Pathway. *Journal of Neuroscience*, 24(47), 10628–10635.

Mitsushima D, Yamada K, Takase K, Funabashi T, Kimura F. (2006) Sex differences in the basolateral amygdala: The extracellular levels of serotonin and dopamine, and their responses to restraint stress in rats. *Eur J Neurosci* 24: 3245-3254.

Mucio-Ramírez J. (2007). La neuroquímica del estrés y el papel de los péptidos opioides. *Revista de educación bioquímica*. 26(4):121-128.

Mullins U. (1999). Effects of Antidepressants on 5-HT<sub>7</sub> Receptor Regulation in the Rat Hypothalamus. *Neuropsychopharmacology*, 21(3), 352–367.

Nautiyal K, Hen R. (2017). Serotonin receptors in depression: from A to B. *F1000 Research*. 6:123.

Neufeld-Cohen A, Tsoory M. M, Evans A. K, Getselter D, Gil S, Lowry C. A, et al. (2010). A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(44), 19020–19025.

Okura T, Koda M, Ando F, Niino N, Ohta S, Shimokata H. (2003). Association of polymorphisms in the estrogen receptor  $\alpha$  gene with body fat distribution. *International Journal of Obesity*. 27(9), 1020–1027.

Oyola M, Thompson M, Handa A, Handa R. (2017). Distribution and chemical composition of estrogen receptor  $\beta$  neurons in the paraventricular nucleus of the female and male mouse hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*. 525(17):3666-3682.

Patrycja P, Krzysztof T, Malgorzata G, Grzegorz H. (2007). Effects of repetitive administration of tianeptine, zinc hydroaspartate and electroconvulsive shock on the reactivity of 5-HT<sub>7</sub> receptors in rat hippocampus. *Pharmacological Reports*. 59, 625-635.

Paulsen S, Nielsen M, Richelsen B, Bruun J, Flyvbjerg A, et al. (2008). Upregulation of Adipose 11- $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Expression in Ovariectomized Rats Is due to Obesity Rather Than Lack of Estrogen. *Obesity*. 16(4), 731–735.

Pérez S, Chen E, Mufson E. (2003). Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Developmental Brain Research*. 145(1):117-39.

Potter E, Behan DP, Linton EA, Lowry PJ, Sawchenko PE, Vale WW. (1992). The central distribution of a corticotrophin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts



multiple sites of band modes of interaction with CRF. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:4192–4196.

Santollo J, Torregrossa A.M, & Eckel L. A. (2011). Estradiol acts in the medial preoptic area, arcuate nucleus, and dorsal raphe nucleus to reduce food intake in ovariectomized rats. *Hormones and Behavior*. 60(1): 86–93.

Sarkisyan G, Roberts A, Hedlund P. (2010). The 5-HT7 receptor as a mediator and modulator of antidepressant-like behavior. *Behavioural Brain Research*. 209(1):99-108.

Saruhan BC, Ozdemir, N. (2005). Effect of ovariectomy and of estrogen treatment on the adrenal gland and body weight in rats. *Saudi Medical Journal*. 26(11): 1705-9.

Sekino A, Ohata H, Mano-Otagiri A, Arai K, Shibasaki T. (2004). Both corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 are involved in stress-induced inhibition of food intake in rats. *Psychopharmacology*. 176(1), 30–38.

Simonian S. X., & Herbison A. E. (2003). Differential Expression of Estrogen Receptor  $\alpha$ ; and  $\beta$ ; Immunoreactivity by Oxytocin Neurons of Rat Paraventricular Nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 9(11), 803–806.

Stern J, Zhang W. (2003). Preautonomic neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus contain estrogen receptor  $\beta$ . *Brain Research*. 2003;975(1-2):99-109.

Stincic TL, Grachev P, Bosch MA, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. (2018). Estradiol Drives the Anorexigenic Activity of Proopiomelanocortin Neurons in Female Mice. *New Research, Neuronal Excitability*. 5(4): 0103-18.

Suzuki S, Lund T, Price R, Handa R. J. (2001). Sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: novel roles for androgen and estrogen receptors, in *Recent Research Developments in Endocrinology*. 2, 69–86.

Svec F, Thompson H, Corll C, Porter J. (2002). Levels of hypothalamic neurotransmitters in lean and obese Zucker rats. *Nutr Neurosci* 5: 321-326.

Swanson LW, Sawchenko PE, Wiegand SJ, Price JL. (1980). Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla or spinal cord. *Brain Research*. 198(1): 190–195.

Swanson LW, Sawchenko PE. (1980). Paraventricular Nucleus: A Site for the Integration of Neuroendocrine and Autonomic Mechanisms. *Neuroendocrinology*. 31(6): 410–417.

Takahashi A, Quadros I, de Almeida R, Miczek K. (2010). Brain serotonin receptors and transporters: initiation vs. termination of escalated aggression. *Psychopharmacology*. 213(2-3):183-212

Tejas-Juárez JG, Cruz-Martínez AM, López-Alonso VE, García-Iglesias B, Mancilla-Díaz JM, Florán-Garduño B, Escartín-Pérez RE. (2014). Stimulation of dopamine D4 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats induces hyperphagia: involvement of glutamate. *Physiology and Behavior*; 22:272-81.

Terrón J. (2014). Novel insights into the potential involvement of 5-HT7 receptors in endocrine dysregulation in stress-related disorders. *Reviews in the Neurosciences*, 25(3).

Tokarski K, Bobula B, Grzegorzewska-Hiczwa M, Kusek M, Hess G. (2012). Stress- and antidepressant treatment-induced modifications of 5-HT<sub>7</sub> receptor functions in the rat brain. *Pharmacological Reports*. 64(6):1305-1315.

Tokarski K, Zahorodna A, Bobula B, Grzegorzewska M, Pitra P, & Hess G. (2005). Repeated administration of citalopram and imipramine alters the responsiveness of rat hippocampal circuitry to the activation of 5-HT<sub>7</sub> receptors. *European Journal of Pharmacology*, 524(1-3), 60–66.

Trejter M, Jopek K, Celichowski P, Tyczewska M, Malendowicz L, et al. (2015). Expression of estrogen, estrogen related and androgen receptors in adrenal cortex of intact adult male and female rats. *Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol*. 53(2), 133–144.

Ulrich-Lai Y, Figueiredo H, Ostrander M, Choi D, Engeland W, et al. (2006). Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 291(5), E965–E973.

Vahl T, Ulrich-Lai Y, Ostrander M, Dolgas C, Elfers E. (2005). Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 289(5): E823-E828.

Viau V, Bingham B, Davis J, Lee P, Wong M. (2005). Gender and Puberty Interact on the Stress-Induced Activation of Parvocellular Neurosecretory Neurons and Corticotropin-Releasing Hormone Messenger Ribonucleic Acid Expression in the Rat. *Endocrinology*. 146(1), 137–146.

Vielhaber K, Riemann D, Feige B, Kuelz A, Kirschbaum C, Voderholzer U. (2005). Impact of experimentally induced serotonin deficiency by tryptophan depletion on saliva cortisol concentrations. *Pharmacopsychiatry* 38: 87-94.

Xu Y, Nedungadi T. P, Zhu L, Sobhani N, Irani B. G, Davis K. E, et al. (2011). Distinct Hypothalamic Neurons Mediate Estrogenic Effects on Energy Homeostasis and Reproduction. *Cell Metabolism*. 14(4), 453–465.

Yohn C, Gergues M. and Samuels B. (2017). The role of 5-HT receptors in depression. *Molecular Brain*, 10(1).

Zárate S, Acevedo-Triana C, Sarmiento-Bolaños M, Cárdenas P L, León L. (2014). Efectos del estrés sobre los procesos de plasticidad y neurogénesis: una revisión. *Universitas Psychologica*. 13(3).