

Tesis de Posgrado

Neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo : Interacciones con el sistema de la hormona liberadora de corticotrofina y el ciclo de vigilia-sueño en roedores

Peñalva, Rosana G.

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Peñalva, Rosana G.. (2001). Neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo : Interacciones con el sistema de la hormona liberadora de corticotrofina y el ciclo de vigilia-sueño en roedores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3321_Penalva.pdf

Cita tipo Chicago:

Peñalva, Rosana G.. "Neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo : Interacciones con el sistema de la hormona liberadora de corticotrofina y el ciclo de vigilia-sueño en roedores". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3321_Penalva.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo:
Interacciones con el sistema de la hormona
liberadora de corticotrofina
y el ciclo de vigilia-sueño en roedores**

Tesis para optar al título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires

Rosana G. Peñalva

Director: Dr. J.M.H.M. Reul

Co-director: Dr. E. Arzt

INSTITUTO MAX PLANCK DE PSIQUIATRIA
Departamento de Neuroendocrinología
Sección de Neuroquímica
Director: Prof. Dr. Dr. F. Holsboer
Munich, Alemania

Año 2001

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. Dr. Holsboer por haberme brindado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en el Instituto Max Planck.

Al Dr. Hans Reul por haberme recibido en su grupo, por los consejos brindados, por la confianza y el apoyo a mi trabajo.

Al Dr. Eduardo Arzt por haberme ofrecido esta posibilidad y haber confiado en mí.

A la Dra. Astrid Linthorst por transmitirme sus conocimientos y experiencia, por su presencia permanente y disposición a las consultas, por sus comentarios y consejos, por su paciencia con mi inglés y sus rápidos progresos en el español.

Un especial agradecimiento a Cornelia Flachskamm, por su invaluable ayuda, por su eficiencia, por el gran placer de diseñar y realizar ensayos juntas, por su colaboración en el comienzo de los experimentos en esos “tan difíciles” horarios de la mañana.

A la Dra. Alicia Bilang por demostrarme que la neuroanatomía es apasionante, por sus valiosos consejos y críticas constructivas. Por escucharme en mis malos momentos y por brindarme siempre una palabra de aliento, por sus abrazos al compartir emocionada mis alegrías.

A la Dra. Marike Lancel por introducirme al apasionante mundo del sueño, y a todo su grupo, por la buena disposición y el asesoramiento técnico.

Al flamante Grupo Linthorst, a Marjolein Beekman, por el estímulo y colaboración constante. A Akihiko Oshima, Aki, por las charlas enriquecedoras. A Mika Ilmen, porque sí. A Anja Weber, por su estímulo y apoyo permanente, pero sobre todo, por su invaluable amistad.

A los ex- y actuales integrantes del Grupo Reul, a Angela Gesing, Cornelius Bachmann y Susanne Droste por la colaboración y ayuda siempre dispuesta, por los agradables momentos en “nuestra” oficina. A Susanne, por los encuentros en roller-skate “after work”.

A Sabina Bicking por su eficiente colaboración y por su buen humor permanente. Por su cálida ayuda en mi adaptación al mundo alemán, por nuestros viajes, por estar siempre presente, por su amistad. A Martin Hirshmann por su paciencia en la enseñanza de la técnica de inmunohistoquímica, por los recreos para compartir un cigarrillo. A Thomas Pohl por su colaboración con la histología. A Jochen Rech por demostrarme que las computadoras no muerden. A Ruth Schwab y Cristina Latrich por su ayuda y colaboración.

A Elfi Fesl por su ayuda administrativa, por las enriquecedoras charlas en español y, oh sorpresa para mí, también en alemán. Por la comprensión y el apoyo permanente.

A Anke y a Marina por las traducciones. Al "Arbeitstherapie" por su ayuda en la edición de este trabajo.

A la Dra. Mónica Frungieri, a Moni, por su gran ayuda en la redacción de este trabajo, por alentarme en cada momento.

Al Dr. Marcelo Paéz Pereda, por sus correcciones, enseñanzas y consejos profesionales. Por estar siempre ahí, en todo momento, en forma incondicional, siempre con la palabra justa. Por su amistad.

A la Dra. Marta Labeur, por su constante y cálido apoyo, por los consejos y críticas constructivas. Por las charlas infinitas, por su comprensión y por su invaluable amistad, por hacer posible que me sienta "en casa".

A mi gente. A mis amigas, a las Doctoras y Licenciadas Andrea y Marcia Puebla, Paula Rodriguez Moreno y Verónica Martinez (en estricto orden alfabético), y a mi familia por todo el apoyo y comprensión, por compartir sueños y realidades más allá de la distancia, por darme fuerzas para seguir adelante.

A mis padres, porque hicieron posible que pudiera llevar a cabo esta gran experiencia, por el apoyo incondicional, por todo el cariño que siempre me dan.

Danken möchte ich an dieser Stelle

Herrn Prof. Dr. Dr. Holsboer dafür, dass er es mir ermöglicht hat, diese Arbeit am Max Planck Institut durchzuführen.

Herrn Dr. Hans Reul dafür, dass er mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat, für seinen Rat, sein Vertrauen und seine Unterstützung, die er mir und meiner Arbeit zuteil werden ließ.

Herrn Dr. Eduardo Arzt, der es mir ermöglicht hat, nach Deutschland zu kommen und mir stets sein Vertrauen entgegengebracht hat.

Frau Dr. Astrid Linthorst, die mir ihr Wissen und ihre Erfahrung zur Verfügung gestellt hat, mir stets mit Kommentaren und Ratschlägen zur Seite stand, nie die Geduld verlor, wenn mir die englischen Worte nicht einfallen wollten und selbst eine Begabung für die spanische Sprache bewiesen hat.

Ein besonderer Dank geht an Cornelia Flachskamm für ihre unschätzbare Unterstützung, für die effiziente Zusammenarbeit und das große Vergnügen, gemeinsam ein Experiment zu planen und durchzuführen, für die Zusammenarbeit zu Beginn der Versuchsreihen in diesen so schwierigen frühmorgendlichen Stunden.

Frau Dr. Alicia Bilang, die mir gezeigt hat, dass die Neuroanatomie ein sehr spannendes Gebiet ist und mir wertvolle Ratschläge und konstruktive Kritik gegeben hat. In schweren Zeiten hat sie mir zugehört und Trost gespendet, bei jedem noch so kleinen Erfolg konnte sie sich gemeinsam mit mir freuen.

Frau Dr. Marike Lancel, die mir die faszinierende Welt des Schlafs erschlossen hat und ihrer Arbeitsgruppe für die Bereitschaft mich fachkundig zu beraten.

Der neu ins Leben gerufenen Arbeitsgruppe Linthorst, Marjolein Beekman, für ihre Anregungen und die gute Zusammenarbeit. Akihiko Oshima, Aki, für bereichernde Gespräche. Mika Ilmen einfach so. Anja Weber für ihre stete Motivation und Unterstützung, aber vor allen Dingen für ihre unschätzbare Freundschaft.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Reul, Angela Gesing, Cornelius Bachmann und Susanne Droste für ihre Zusammenarbeit und Hilfe, ganz einfach für die schönen Momente in „unserem“ Büro. Susanne für etliche entspannende Runden auf Inline-skates „after work“.

Sabine Bicking für die effiziente Zusammenarbeit und ihre unerschütterliche gute Laune. Für ihre sanfte Anleitung, mich in der neuen deutschen Umgebung zurecht zu finden, für unsere gemeinsamen Reisen, für ihre Freundschaft, kurz dafür, dass sie immer da

war und ist. Martin Hirschmann für die Geduld, mit der er mich mit der Methodik der Immunologie vertraut gemacht hat und für die kurzen Pausen, in denen wir gemeinsam eine Zigarette geraucht haben. Thomas Pohl für seine Unterstützung im histologischen Bereich. Jochen Rech dafür, dass er mir gezeigt hat, dass Computer keine Monster sind. Ruth Schwab und Cristina Lattrich für ihre Hilfe und Zusammenarbeit.

Elfi Fesl für ihre Unterstützung in Verwaltungsangelegenheiten, für bereichernde Gespräche auf Spanisch und, zu meiner eigenen großen Überraschung, sogar auf Deutsch. Für ihr Verständnis und ihre unangeschränkte Unterstützung.

Anke und Marina für die Übersetzungen und der Arbeitstherapie für ihre Hilfe beim Drück dieser Arbeit.

Frau Dr. Mónica Frungieri, Moni, für ihre große Hilfe bei der Ausarbeitung dieser Arbeit und ihre nie versiegenden aufmunternden Worte.

Dr. Marcelo Paéz Pereda für seine Verbesserungsvorschläge, für das Wissen, dass er mir zuteil werden ließ und für seinen professionellen Rat. Dafür, dass er da war, wenn ich ihn brauchte und vollkommen bedingungslos immer die richtigen Worte für mich bereit hielt, für seine Freundschaft.

Frau Dr. Marta Labeur, für ihre konstante und von Herzen kommende Unterstützung, für ihren Rat und ihre konstruktive Kritik. Für nicht enden wollende Gespräche, für ihr Verständnis und ihre unschätzbare Freundschaft. Dafür, dass sie es mir ermöglicht hat, mich „wie zuhause“ fühlen zu können.

Meinen „Leuten“. Meinen Freundinnen, Andrea und Marcia Puebla, Paula Rodriguez Moreno und Verónica Martinez (in alphabetischer Reihenfolge) und meiner Familie für all ihre Unterstützung und all ihr Verständnis und nicht zuletzt dafür, dass sie auch über die räumliche Entfernung hinweg meine Träume und meine Wirklichkeit mit mir geteilt hat und mir die Kraft gegeben hat weiterzumachen.

Meinen Eltern, weil sie es mir durch ihre bedingungslose Unterstützung und die Liebe, die sie mir geben, ermöglicht haben, diese Arbeit zu verwirklichen und diese großartige Erfahrung zu durchleben.

RESUMEN

La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y el neurotransmisor serotonina (5-HT) son mediadores importantes en las respuestas neuroendocrinas y comportamentales al estrés. Alteraciones en el funcionamiento de CRH y 5-HT han sido implicadas en la etiología de enfermedades psiquiátricas relacionadas con el estrés, como la depresión mayor. Sin embargo, hasta el momento, no se ha estudiado en profundidad la relación existente entre estos trastornos. Un estudio reciente demostró que niveles crónicos elevados de CRH en el cerebro de ratas reduce la respuesta de la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo frente al estrés. Esto es relevante debido a la importancia de este área en el procesamiento de la información sensorial y la coordinación de las respuestas comportamentales y neuroendocrinas al estrés. Uno de los síntomas más severos de la depresión mayor son las perturbaciones en el sueño. Dado que 5-HT y CRH han sido involucradas en la regulación del ciclo de vigilia-sueño y del estado de alerta, sería factible que la disfunción de ambos sistemas esté implicada en las alteraciones del sueño asociadas a la depresión mayor. El trabajo de investigación desarrollado en esta tesis tiene como objetivo una caracterización detallada de la interacción entre CRH y 5-HT y de la participación de 5-HT en el hipocampo en la regulación del ciclo de vigilia-sueño. A fin de alcanzar estos objetivos, se realizaron estudios de microdiálisis para la determinación de la neurotransmisión serotoninérgica y la actividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), y de registro del sueño en ratas y ratones.

Los resultados presentados en este trabajo de tesis indican que CRH y el péptido relacionado, urocortina, estimulan la neurotransmisión serotoninérgica hipocampal en ratas. Se observó que una alteración crónica del sistema de CRH tiene consecuencias sobre la neurotransmisión serotoninérgica y la actividad del eje HPA. Ratones deficientes del receptor de CRH tipo 1 mostraron un aumento en la síntesis de 5-HT en condiciones basales, niveles indetectables de corticosterona libre y una respuesta elevada de 5-HT durante y luego de una situación de estrés. Además, se señala la participación diferencial de los distintos receptores de CRH en la regulación de la actividad del eje HPA y en la actividad comportamental. Los resultados de este trabajo de tesis indican una correlación entre los niveles hipocampales de 5-HT y los estados de vigilancia del animal. 5-HT presenta niveles elevados durante la vigilia, intermedios durante el sueño lento y valores mínimos asociados al sueño REM. La privación del sueño provoca un aumento en los niveles de 5-HT y corticosterona libre. Sin embargo, los mismos retornan a valores basales durante el subsiguiente período de recuperación del sueño.

Así, los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que CRH y la neurotransmisión serotoninérgica interaccionan marcadamente en el hipocampo. Mas aún, las alteraciones en el sistema de CRH tienen profundas consecuencias en la neurotransmisión serotoninérgica. Puesto que estos resultados indican también la participación de la 5-HT hipocampal en la regulación del ciclo de vigilia-sueño, los mismos podrán contribuir a un mejor entendimiento de la etiología y sintomatología de la depresión mayor.

ABSTRACT

The neuropeptide corticotropin-releasing hormone (CRH) and the neurotransmitter serotonin (5-HT) are key mediators of neuroendocrine and behavioural responses to stress. Interestingly, there is now some evidence that the functioning of both CRH and 5-HT is disturbed in stress-related psychiatric disorders such as major depression, although it is still unclear whether there exists a relationship between these aberrations. A recent study has demonstrated that rats with chronically elevated concentrations of CRH in the brain show reduced responsiveness of serotonergic neurotransmission in the hippocampus to a stressful challenge. This is of interest because the hippocampus is an important brain structure for sensory information processing and behavioural and neuroendocrine responses to stress. One of the most severe symptoms of depression is disturbed sleep. Because regulatory effects of 5-HT and CRH have been shown on vigilance and the sleep-wake cycle, it may be suggested that dysfunctioning of these systems may underlie the sleep disturbances observed in major depression. The research described in this thesis was designed to further elucidate how CRH and 5-HT interact and to find out which role 5-HT in the hippocampus plays in the regulation of the sleep-wake cycle. *In vivo* microdialysis to assess serotonergic neurotransmission and HPA axis activity and EEG recording in rats and mice were used to pursue these goals.

The results presented in this thesis show that CRH and the CRH-like neuropeptide urocortin stimulate hippocampal serotonergic neurotransmission in rats. Moreover, it was found that life-long disturbance of the CRH system has profound consequences for serotonergic neurotransmission and HPA axis activity. Dysfunction of CRH receptor type 1 in mutant mice evolves in increased synthesis of 5-HT under basal conditions, undetectable levels of free corticosterone and elevated responsiveness of 5-HT during and after a stressful experience. Furthermore, the data indicate a differential participation of the different CRH receptor types in the regulation of HPA axis activity and behaviour.

The data described in this thesis further show that the levels of hippocampal 5-HT highly depend on the vigilance state of the animal. Highest levels were found during wakefulness, whereas they drop going to nonREM-sleep reaching lowest levels during REM-sleep. Sleep deprivation markedly increases hippocampal 5-HT and free corticosterone levels. However, during the subsequent period of sleep recovery 5-HT and corticosterone return to basal values.

From the results presented in this thesis it may be concluded that CRH and serotonergic neurotransmission highly interact on the level of the hippocampus. Disturbances in the CRH system seem to have profound subsequent consequences for serotonergic neurotransmission. These observations may be of interest for our understanding of the etiology and symptomatology of major depression, especially because the data indicate that hippocampal 5-HT may play a role in the regulation of vigilance and the sleep-wake cycle.

INDICE

1- INTRODUCCION	1
1.1- Serotonina	2
1.1.1- Biosíntesis	2
1.1.2- Localización	4
1.1.3- Proyecciones aferentes y eferentes	5
1.1.4- Receptores de serotonina	7
1.1.5- Funciones fisiológicas y comportamentales de serotonina	8
1.1.6- Neurotransmisión serotoninérgica y depresión mayor	10
1.1.7- Neurotransmisión serotoninérgica rafe-hipocampo	12
1.2- Sistema de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH)	14
1.2.1- CRH y urocortina (Ucn)	15
1.2.1.1- Localización	15
1.2.2- Receptores y proteína de unión a CRH	18
1.2.2.1- Localización	19
1.2.2.2- Afinidades entre los péptidos componentes de la familia de CRH	21
1.2.3- Efectos de CRH y Ucn	22
1.2.3.1- Efectos endocrinos. Eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA)	22
1.2.3.2- Efectos sobre los sistemas nervioso autónomo e inmune	25
1.2.3.3- Efectos comportamentales	26
1.2.4- El sistema de CRH y la depresión mayor	28
1.2.5- Efectos de CRH sobre el sistema serotoninérgico rafe-hipocampo	29
1.3- El sueño	30
1.3.1- Estados del sueño	30
1.3.1.1- Arquitectura del sueño	31
1.3.1.2- Sueño en ratas	33
1.3.2- Funciones del sueño	35
1.3.3- Bases neuronales del sueño	36
1.3.3.1- Formación reticular y neurotransmisores asociados	36
1.3.3.2- Modelo generalizado del ciclo de vigilia-sueño	37
1.3.3.3- Sueño lento	38

1.3.3.4- Sueño REM	38
1.3.4- La serotonina y el ciclo de vigilia-sueño	39
1.3.4.1- El sueño y la neurotransmisión serotoninérgica hipocampal . . .	41
1.3.5- El sueño y la depresión mayor	42
1.3.6- Privación del sueño	43
1.4- Resumen	45
2- OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	46
2.1- Modelo experimental	46
2.2- Objetivos específicos	46
3- MATERIALES Y METODOS	48
3.1- Animales	48
3.2- Cirugías	49
3.2.1- Implantación de cánulas-guías para la inyección intracerebro- ventricular (i.c.v.) y para microdiálisis	49
3.2.2- Implantación de una cánula-guía para microdiálisis en ratón	50
3.2.3- Implantación de cánula-guía para microdiálisis y electrodos para el registro de EEG/EMG/T _{cer}	50
3.2.4 - Adrenalectomía	51
3.3- Técnicas	52
3.3.1- Técnica de microdiálisis	52
3.3.1.1- Principio teórico	52
3.3.1.2- Sistema de microdiálisis	52
3.3.2- Técnica de registro de EEG/EMG y clasificación de los estados de vigilancia	55
3.3.2.1- Estados de vigilancia	55
3.3.2.2- Registro de EEG/EMG	57
3.3.3- Técnica de inmunohistoquímica	58
3.3.3.1- Principio teórico	58
3.3.3.2- Protocolo	59
3.4- Protocolos experimentales	59
3.4.1- Experimentos de microdiálisis y administración i.c.v. de CRH y Ucn .	59

3.4.1.1- Cronograma general	59
3.4.1.2- Protocolo experimental	60
3.4.1.3- Administración i.c.v. de CRH en animales ADX	61
3.4.2- Experimentos de administración i.c.v. de CRH y Ucn para estudios de inmunohistoquímica	61
3.4.2.1- Cronograma general	61
3.4.2.2- Protocolo experimental	61
3.4.3- Experimentos de microdiálisis en ratones deficientes del receptor de CRH tipo 1 (CRH-R1)	62
3.4.3.1- Cronograma general	62
3.4.3.2- Protocolo experimental	62
3.4.3.3- Estrés por natación forzada	63
3.4.4- Estudios simultáneos de microdiálisis y de registro de EEG/EMG/T _{cer}	64
3.4.4.1- Cronograma general	64
3.4.4.2- Sincronización de los sistemas de microdiálisis y de registro de EEG/EMG/T _{cer}	64
3.4.4.3- Protocolo experimental para el estudio simultáneo de microdiálisis-EEG/EMG/T _{cer}	65
3.4.4.4- Protocolo experimental para el estudio de la respuesta de corticosterona libre	67
3.4.4.5- La privación del sueño por medio de manipulación delicada	68
3.5- Análisis comportamental	68
3.6- Determinación de 5-HT y 5-HIAA en muestras de dializado	69
3.6.1- El sistema de HPLC para la determinación de 5-HT y 5-HIAA	69
3.6.2- Sistema de HPLC de alta sensibilidad	70
3.7- Determinación de hormonas	71
3.7.1- ACTH	71
3.7.2- Corticosterona	72
3.8- Histología y verificación de la adrenalectomía	72
3.9- Materiales	73
3.10- Cálculos y análisis estadísticos	73

4- RESULTADOS	77
<i>PARTE A Interacciones entre el sistema de CRH y la neurotransmisión de 5-HT en el hipocampo, la activación del eje HPA y la actividad comportamental</i>	
4.1- Localización neuroanatómica de la sonda de microdiálisis en el hipocampo y de la cánula para administración i.c.v.	77
4.2- Efectos de la administración i.c.v. de CRH y Ucn en ratas	78
4.2.1- Efectos sobre los niveles de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo	78
4.2.2- Efectos sobre los niveles de corticosterona libre	82
4.2.3- Efectos sobre la actividad comportamental	85
4.2.4- Efectos de la adrenalectomía sobre la acción central de CRH en ratas	88
4.3- Efectos de la administración i.c.v. de CRH/Ucn sobre la expresión de c-fos en el SNC de ratas	89
4.4- Efectos de la deficiencia del gen del CRH-R1 en ratones	93
4.4.1- Efectos sobre los niveles de corticosterona libre	94
4.4.2- Efectos sobre la actividad comportamental durante el ciclo de luz/oscuridad	95
4.4.3- Efectos sobre los niveles de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo durante el ciclo de luz/oscuridad	96
4.4.4- Efectos del estrés por natación forzada sobre los niveles de serotonina y 5-HIAA en el hipocampo	99
4.4.5- Efectos del estrés por natación forzada sobre la actividad comportamental	101
<i>PARTE B Interacción entre la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo y el ciclo de vigilia-sueño en ratas</i>	
4.5- Relación de los estados de vigilancia y los niveles de 5-HT en el hipocampo en condiciones basales	103
4.6- Efectos de la privación de sueño sobre la neurotransmisión de 5-HT en el hipocampo	105
4.6.1- Periodo de privación del sueño	105
4.6.2- Periodo de recuperación	105
4.7- Efectos de la privación de sueño sobre los niveles de corticosterona libre	108
4.8- Efectos de la privación de sueño sobre los estados de vigilancia, la	

actividad de onda lenta y la temperatura cerebral	110
5- DISCUSION	113
<i><u>PARTE A</u> Interacciones del sistema de CRH con la neurotransmisión</i>	
<i>serotoninérgica del hipocampo, el eje HPA y la actividad comportamental</i>	<i>113</i>
<i><u>PARTE B</u> Interacción entre la neurotransmisión de serotonina en el hipocampo</i>	
<i>y el ciclo de vigilia-sueño</i>	<i>129</i>
6- CONCLUSIONES	139
7- REFERENCIAS	143

ABREVIATURAS

5-HIAA	ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	serotonina, 5-hidroxytriptamina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
8-OH-DPAT	8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralin, agonista del receptor 5-HT _{1A}
ACTH	adrenocorticotrofina
ADN	ácido desoxiribonucleico
BNST	núcleo rojo de las terminaciones estriales
CRH	hormona liberadora de corticotrofina
CRH-R1 (-/-)	homocigota deficiente del gen del CRH-R1
CRH-R1 (-/+)	heterocigota deficiente del gen del CRH-R1
CRH-R1	receptor tipo 1 de la hormona liberadora de corticotrofina
EEG	electroencefalograma
EMG	electromiograma
ES	error estándar
fmol	fentomol
FR	formación reticular
GR	receptores de glucocorticoides
gl	grados de libertad
HPA	hipotalámico-pituitario-adrenal
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
i.c.v.	intracerebroventricular
LC	locus coeruleus
M	concentración molar
MAO	monoaminaoxidasa
MR	receptores de mineralocorticoides
NA	noradrenalina
NRD	núcleo del rafe dorsal
NRM	núcleo del rafe medio
PBS	buffer salino fosfato
PCPA	p-clorofenilalanina
POMC	pro-opiomelanocortina
preREM	sueño previo a REM
PVN	núcleo paraventricular
rpm	revoluciones por minuto
SCN	sistema nervioso central
SL	sueño lento
sREM	sueño con movimiento rápido de ojos o sueño paradójico, del inglés <i>rapid eye</i>

movements sleep

SSRI droga antidepresiva inhibidora selectiva de la recaptación de serotonina, del inglés
selective serotonin re-uptake inhibitors

T_{cer} temperatura cerebral

VLPO núcleo ventrolateral preóptico

1- INTRODUCCION

El estrés es una situación biológica o psicológica que debe enfrentar todo organismo vivo en su interacción con el medio ambiente y social. Un concepto amplio de estrés no se limita tan solo a experiencias dramáticas que afectan a un individuo, sino que incluye los numerosos eventos de la vida diaria que requieren la respuesta de los sistemas fisiológicos para retornar a un cierto equilibrio u homeostasis biológica. La ausencia o falla de estas respuestas de adaptación produce alteraciones fisiológicas que pueden derivar en enfermedad.

De la revisión de la literatura sobre la patofisiología de enfermedades psiquiátricas asociadas con alteraciones del estado de ánimo emerge un claro factor determinante: el estrés. Los dos mayores desórdenes del estado de ánimo son: el desorden de depresión mayor, caracterizado por episodios depresivos, pérdida de interés y placer en todas las actividades, cambios significativos en el peso corporal, sentimientos de culpa y dificultad en la concentración, y el desorden bipolar, caracterizado por episodios de manía frecuentemente acompañados de episodios de depresión. Ambos desórdenes presentan un alto índice de suicidio (Kaplan y col., 1994). El estrés y la depresión mayor han sido relacionados a través de distintas vías; eventos estresantes frecuentemente preceden el comienzo de la depresión, así como también, el grado de estrés ha sido implicado con la severidad de la enfermedad (Brown y col., 1994). Otro vínculo importante entre la depresión y el estrés lo constituye la presencia, en los pacientes depresivos, de alteraciones en las funciones del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) y de la neurotransmisión serotoninérgica, los cuales son componentes fundamentales de las respuestas neuroendocrinas y comportamentales de un organismo frente al estrés (Chaouloff y col., 1999), (Owens y Nemeroff, 1991). Varios estudios han implicado los trastornos en los sistemas de la serotonina (Maes y Meltzer, 1995) y de la hormona de liberación de corticotrofina (CRH) (Arborelius y col., 1999), (Holsboer, 1999) en la etiología de la depresión mayor. Sin embargo, la interacción entre ambos sistemas dentro del sistema nervioso central (SNC), y la implicación de la misma en disfunciones fisiológicas y comportamentales no ha sido estudiada en detalle.

Por otra parte, una de las sintomatologías características de la depresión mayor son los trastornos que los pacientes presentan en el ciclo de vigilia-sueño, con una clara reducción de la continuidad, eficacia y tiempo total del sueño (Benca, 1996). Dado que

la serotonina se encuentra involucrada en la regulación del ciclo de vigilia-sueño (Portas y col., 2000), (Jouvet, 1999), se ha sugerido que la disfunción de la neurotransmisión serotoninérgica y los trastornos en el sueño asociados a la depresión mayor estarían relacionados.

En el presente trabajo de investigación se presentarán estudios en ratas y ratones orientados hacia la caracterización de la interacción entre los sistemas de CRH y de neurotransmisión serotoninérgica en el sistema nervioso central. Además, se presentarán estudios sobre la relación de la neurotransmisión de la serotonina en el hipocampo y los estados de sueño y vigilia. Por lo tanto, a lo largo de la siguiente introducción se describirán los sistemas de la serotonina y CRH y la regulación del ciclo de vigilia-sueño.

1.1- Serotonina

1.1.1- Biosíntesis

La historia de la serotonina, 5-hidroxytriptamina (5-HT), comienza en los años 30, con la caracterización de una sustancia producida en células del intestino que poseía efectos sobre la motilidad intestinal, de ahí su primer nombre "enteroamina". En 1948, a través del estudio de factores sanguíneos de hipertensión, se identificó y purificó una sustancia en el "suero" con efectos sobre el "tono" de los vasos sanguíneos, "serotonina" (Rapport y col., 1948). Un par de años más tarde, la serotonina y la enteroamina, fueron identificadas como la misma sustancia. En 1953, serotonina fue detectada en el cerebro de mamíferos, y dado su carácter hidrofílico, y en consecuencia, su incapacidad para cruzar la barrera hematoencefálica, se dedujo su síntesis neuronal. De esta manera, la serotonina, ingresó en el campo de la neurociencia e instauró su rol como neurotransmisor (revisión histórica (Whitaker-Azmitia, 1999)).

No todas las células que contienen 5-HT son capaces de sintetizarla. Por ejemplo, las plaquetas solo pueden acumular 5-HT que toman del plasma mediante un mecanismo de transporte activo. En el SNC las neuronas sintetizan 5-HT, aunque dicha producción representa solamente un 1 - 2 % de la cantidad total de 5-HT en el cuerpo. El paso inicial para la síntesis de 5-HT en el SNC es el transporte del aminoácido triptofano desde la sangre hacia el cerebro a través de una proteína transportadora. La principal

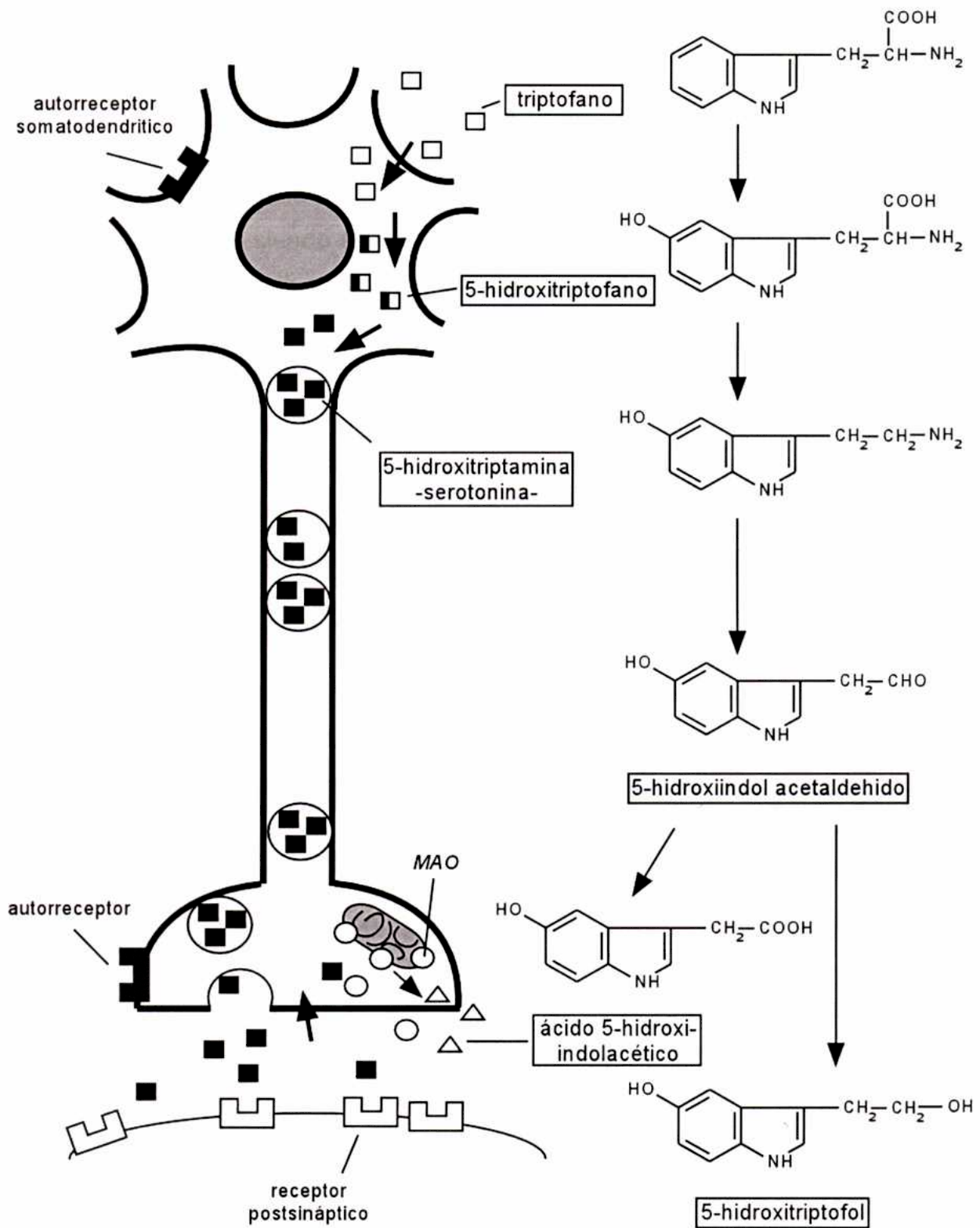


Figura1: diagrama de una neurona serotoninérgica mostrando los pasos de la biosíntesis de la serotonina.

fuelle de este aminoácido son las proteínas incorporadas a través de la dieta. La entrada de triptofano al cerebro esta relacionada no solamente con su concentración en sangre, sino también con los niveles relativos de otros aminoácidos, con los cuales compite por la proteína transportadora. La serotonina es formada a partir de la hidroxilación de triptofano a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por medio de la enzima triptofano hidroxilasa, siendo éste el paso limitante en la biosíntesis. En condiciones fisiológicas normales, esta enzima se encuentra en un estado no saturado, por lo tanto, un aumento en la concentración de triptofano a través de la dieta estimularía la síntesis de 5-HT. De todas maneras, el hecho de que un aumento en la síntesis implique un incremento en la liberación de serotonina, es todavía un tema controvertido. 5-HTP es rápidamente decarboxilado a 5-HT y transportado dentro de vesículas sinápticas hacia las dendritas y terminales (*Figura 1*).

Por otro lado, luego de su liberación, 5-HT es inactivada principalmente a través de su recapturación por proteínas transportadoras de 5-HT en la membrana presináptica. Una vez dentro de las neuronas serotoninérgicas, el neurotransmisor puede ser re-almacenado en vesículas, o bien, metabolizado primero a 5-hidroxi-indolacetaldehído, para ser degradado rápidamente al ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) a través de la monoaminaoxidasa mitocondrial (MAO) (Frazer y Hensler, 1994), (Marsden, 1991). 5-HIAA puede ser también catabolizado, aunque en menor proporción, a 5-hidroxitriptofol por medio de la actividad de una aldehído reductasa.

1.1.2- Localización

Los cuerpos neuronales que contienen 5-HT se encuentran restringidos en grupos discretos localizados a lo largo de la línea media del tronco cerebral. Sus proyecciones, sin embargo, alcanzan casi todas las áreas del SNC. En 1964, Dahlstrom y Fuxe usando una técnica de histofluorescencia, observaron que la mayoría de los somas que contienen 5-HT se encuentran en cuerpos celulares agrupados. Estos autores describieron originalmente nueve grupos de cuerpos neuronales conteniendo 5-HT, los cuales fueron designados como B1 a B9, y corresponden en su mayor parte a los núcleos del rafe (Dahlstrom y Fuxe, 1964).

tabla 1

	grupo de cuerpos celulares conteniendo serotonina	estructura anatómica
grupo con proyecciones hacia la médula espinal	B 1	núcleo del rafe pálido; médula ventrolateral caudal
	B 2	núcleo del rafe oscuro
	B 3	núcleo del rafe magnus; médula ventrolateral rostral; núcleos reticulares intermedios
	B 4	núcleo del rafe oscuro (parte dorsolateral)
grupo con proyecciones hacia el cerebro anterior	B 5	núcleo del rafe medio (parte caudal)
	B 6	núcleo del rafe dorsal (parte caudal)
	B 7	núcleo del rafe dorsal (parte rostral)
	B 8	núcleo del rafe medio (parte rostral); núcleo lineal caudal; núcleo del pontis oralis
	B 9	núcleo del pontis oralis; región suprallemniscal

Tabla 1: Clasificación de los grupos celulares serotoninérgicos y su correspondiente estructura anatómica (Frazer y Hensler, 1994).

1.1.3- Proyecciones aferentes y eferentes

La mayor proyección aferente de los núcleos de neuronas serotoninérgicas consiste en la proyección proveniente de los mismos núcleos del rafe. Conexiones entre los núcleos del rafe dorsal (NRD) y medio (NRM), y entre los grupos B9, B1 y B3 han sido descritas (*Figura 2*). El resto de las proyecciones aferentes no serotoninérgicas provienen de otras estructuras cerebrales, entre ellas, la sustancia negra y el área tegmental ventral (proyecciones dopaminérgicas), el núcleo vestibular superior (proyecciones colinérgicas), locus coeruleus (inervación noradrenérgica), núcleo del tracto solitario (adrenérgicas) y el área periacueductal gris con diferentes neuropéptidos. Otras aferencias consisten en las proyecciones desde el hipotálamo, principalmente el área preóptica media y el hipotálamo lateral, el tálamo y otras estructuras límbicas del proencéfalo tal como la habénula lateral (Jacobs y Azmitia, 1992).

La mayoría de los grupos de cuerpos neuronales serotoninérgicos caudales (B1-B4)

proyectan hacia la médula espinal, a través de dos vías principales, una ventromedial hacia el asta ventral motora y otra lateral hacia la sustancia gris central de la médula. Por otra parte, los grupos de cuerpos neuronales serotoninérgicos rostrales proyectan principalmente hacia el cerebro anterior. Mediante distintas técnicas se han identificado básicamente dos proyecciones mayores ascendentes, la vía periventricular dorsal y la vía tegmental ventral. Ambas vías convergen en el hipotálamo caudal, donde se unen en el fascículo proencefálico medial, junto a axones de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas. Las proyecciones ascendentes desde los núcleos del rafe hacia las estructuras del cerebro anterior se encuentran organizadas de manera topográfica. Mientras que las proyecciones hacia el hipocampo y septum (estructuras límbicas) provienen principalmente del NRM, aquellas que se dirigen hacia el estriado provienen mayoritariamente del NRD, pero, por ejemplo, ambos núcleos envían sus proyecciones hacia la neocorteza. A su vez, la parte rostral del NRD proyecta hacia el estriado y la corteza, mientras que la porción caudal, junto con neuronas del NRM, proyectan al hipocampo. La amígdala recibe inervación de ambos núcleos (Jacobs y Azmitia, 1992), (Azmitia y Segal, 1978), (Steinbusch, 1984), (Marsden, 1991).

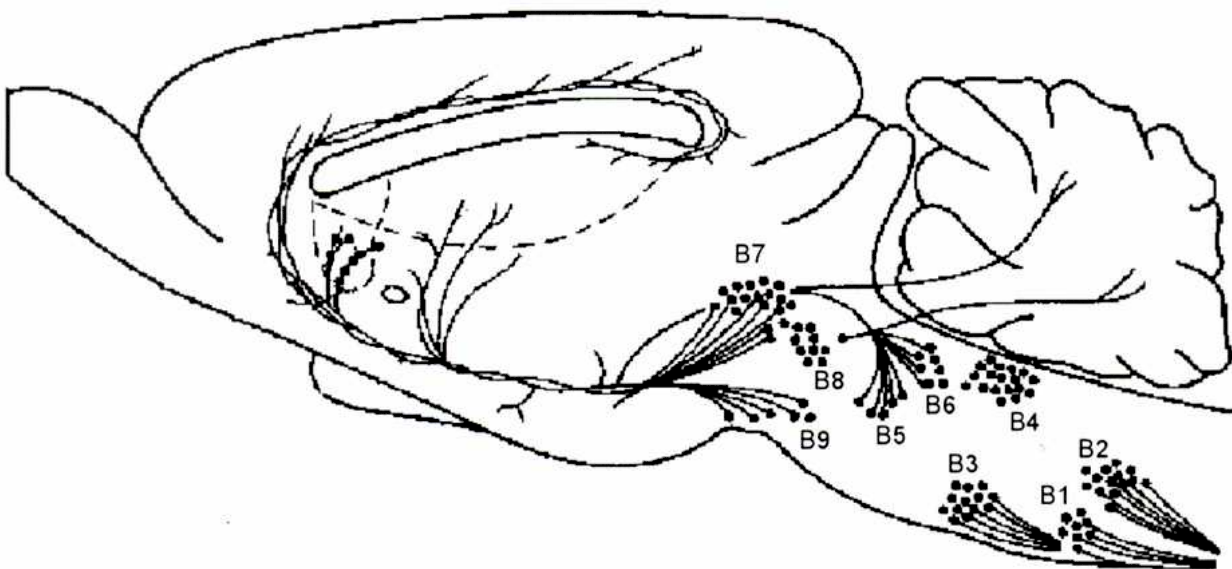


Figura 2: Diagrama esquemático ilustrando la distribución de las principales vías serotoninérgicas en el SNC de rata. B1-B9, núcleos de celulares serotoninérgicos. Adaptado de Marsden, 1991.

1.1.4- Receptores de serotonina

Hasta el momento, en mamíferos, se encuentran identificados 14 subtipos de receptores de 5-HT, los cuales han sido clasificados en siete familias, 5-HT₁₋₇, sobre la base de sus características estructural, funcional y farmacológicamente distintas (*Tabla 2*) (Hoyer y col., 1994), (Barnes y Sharp, 1999). En su mayoría, los receptores de 5-HT están conformados por siete dominios transmembrana, acoplados a una proteína G metabotrópica, aunque una de las familias, los receptores 5-HT₃, consiste en un canal de iones ligando-dependiente. Otra característica importante de los receptores de 5-HT

tabla 2

receptor	distribución
5-HT _{1A}	hipocampo, amígdala, septum, corteza entorrinal y cingulata, hipotálamo, núcleos del rafe
5-HT _{1B}	ganglios basales, hipocampo (ARNm)
5-HT _{1D}	ganglios basales, hipocampo, corteza, núcleos del rafe y núcleo accumbens (ARNm)
5-HT _{1E}	corteza entorrinal, caudado putamen, hipocampo, amígdala
5-HT _{1F}	corteza cingulata y entorrinal, estriado, hipocampo, bulbo olfatorio, NRD
5-HT _{2A}	corteza, estriado, hipocampo, núcleo accumbens, bulbo olfatorio, núcleo caudado
5-HT _{2B}	cerebelo, septum lateral, hipotálamo dorsal, amígdala media.
5-HT _{2C}	Plexo coroideo, corteza, hipotálamo, hipocampo, núcleo accumbens, amígdala, ganglios de la base, septum, central grey, médula espinal
5-HT ₃	hipocampo, corteza entorrinal, amígdala, núcleo accumbens, tracto solitario, nervio trigémino, médula espinal, nervio vago
5-HT ₄	hipocampo, estriado, bulbo olfatorio, sustancia negra
5-HT _{5A}	hipocampo, hipotálamo, corteza, tálamo, estriado, bulbo, médula
5-HT _{5B}	hipotálamo, hipocampo, habénula, NRD, bulbo olfatorio, corteza entorrinal y piriforme
5-HT ₆	estriado, bulbo olfatorio, núcleo accumbens, hipocampo
5-HT ₇	corteza, septum, tálamo, hipotálamo, hipocampo, amígdala, colículos superior

Tabla 2: Clasificación de los receptores de serotonina presentes en el sistema nervioso central (Frazer y Hensler, 1994); (Barnes y Sharp, 1999), (Hoyer y col., 1994).

es su distribución precisa y generalmente limitada a determinadas áreas cerebrales. Varios subtipos de receptores de serotonina están localizados postsinápticamente, donde modulan el flujo de iones para provocar la despolarización (receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ y 5-HT₄) o la hiperpolarización neuronal (receptores 5-HT_{1A}). Algunos subtipos de receptores de 5-HT (receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, y posiblemente 5-HT_{1D}) se encuentran en el soma, dendritas o terminal de las mismas neuronas serotoninérgicas, donde tienen un rol de autorregulación neuronal. Mientras que otros receptores (receptores 5-HT_{1B,D}, 5-HT_{2A,C}, 5-HT₃ y 5-HT₄) se pueden localizar también en las terminales nerviosas donde parecerían cumplir una función de heteroreceptores, regulando la liberación de neurotransmisores (Barnes y Sharp, 1999).

1.1.5- Funciones fisiológicas y comportamentales de serotonina

La serotonina ha sido involucrada en la regulación de un amplio rango de procesos fisiológicos y comportamentales, tales como la regulación cardiovascular y respiratoria, la termorregulación, la regulación endocrina y de los ritmos circadianos, el ciclo de vigilia-sueño, el apetito, la agresión, el comportamiento sexual, la actividad motora, la sensibilidad al dolor y los procesos de aprendizaje y memoria. Por lo tanto, no es de extrañar que las alteraciones del sistema serotoninérgico influyen un amplio rango de desórdenes psiquiátricos. Entre dichos desórdenes se incluyen la depresión y ciertos desórdenes de ansiedad (pánico, obsesión compulsiva y fobia social), esquizofrenia y anorexia nerviosa. Además, las alteraciones en la función de la 5-HT han sido asociadas con el comportamiento agresivo, el abuso de sustancias, el control obsesivo y problemas de falta de atención. Dada la amplia variedad de acciones reguladoras de 5-HT y los objetivos planteados en el presente trabajo de investigación, solo será analizada la participación de 5-HT en tres áreas: a) la regulación neuroendocrina, considerando la interacción de 5-HT con el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), y en particular con la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) (ver a continuación y también sección 1.2.5); b) el comportamiento y su implicancia en enfermedades psiquiátricas relacionadas con el estrés (ver apartados correspondientes); y c) el sueño (secciones 1.3.3 y 1.3.4).

Regulación neuroendocrina: la 5-HT, junto a otros neurotransmisores, participa en el control hipotalámico de la secreción hipofisiaria de las hormonas adrenocorticotrofina

(ACTH), prolactina y de la hormona de crecimiento. Los precursores de 5-HT o las drogas que estimulan su liberación, producen un aumento en la secreción de CRH, así como también de vasopresina, y en consecuencia, un aumento de la secreción de ACTH. Por otro lado, también se ha demostrado que 5-HT tiene un efecto directo sobre la liberación de ACTH en la hipófisis anterior. Esta acción conlleva a un incremento en los niveles de corticosterona (ver sección 1.2.3.1). Los subtipos de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} estarían involucrados en los efectos de 5-HT sobre el eje HPA (Barnes y Sharp, 1999). Por otro lado, se ha demostrado que un aumento en los niveles de corticosterona, resultado de la activación del eje HPA, reduce los niveles de los receptores 5-HT_{1A} en regiones específicas del hipocampo (Meijer y de Kloet, 1998), (Fernandes y col., 1997), (Watanabe y col., 1993). Por el contrario, el tratamiento con drogas que estimulan los niveles de 5-HT, produce un aumento de los niveles de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo (Hery y col., 2000), (Reul y col., 1993), área a través de la cual la corticosterona ejerce una retroalimentación negativa sobre el eje HPA (ver sección 1.2.3.1). Esto sugiere una importante participación de 5-HT en la regulación de las respuestas hormonales al estrés. Sin embargo, el rol exacto que la 5-HT desempeñaría en la regulación de la respuesta de CRH frente al estrés, no ha sido aún dilucidado.

Efectos comportamentales: Una de las primeras evidencias que asoció la neurotransmisión serotoninérgica con la actividad comportamental surgió de estudios en los cuales se manipuló la biosíntesis de la 5-HT. En animales, la administración de triptofano provoca un síndrome distintivo y complejo que comprende movimientos tónicos y repetitivos, e involucra temblor, rigidez, contracción de los miembros posteriores y sacudidas de la cabeza o del cuerpo. Este síndrome de serotonina se ha observado también en humanos, principalmente en pacientes a los cuales se les administra drogas relacionadas con la 5-HT.

Por otro lado, estudios electrofisiológicos demostraron una correlación entre la actividad de las neuronas serotoninérgicas y el estado comportamental del animal, presentándose una actividad neuronal elevada durante los momentos de vigilia, y una disminución gradual de la misma a medida que el animal reduce su actividad y entra en los distintos estados del sueño (Jacobs, 1991), (Jacobs y Fornal, 1993). Además, estos estudios indicaron también que la actividad neuronal en el núcleo del rafe dorsal no

responde a estímulos ambientales, tales como la temperatura o el ruido. Por otro lado, la 5-HT participaría en la facilitación de movimientos tónicos o de patrones comportamentales repetitivos, por ejemplo, los movimientos bucales-orales, como masticar, morder, lamer o el aseo en animales. Todos estos estudios sugieren que la actividad de las neuronas serotoninérgicas está relacionada con el estado comportamental o de actividad del animal, y además, contribuyen al concepto de que la actividad principal de la 5-HT está asociada con la facilitación de la respuesta motora y con una posible supresión del proceso de información sensorial durante el comportamiento motor (Jacobs y Fornal, 1995), (Jacobs y Azmitia, 1992).

Por otra parte, estudios de microdiálisis demostraron también una alta correlación entre los niveles extracelulares de 5-HT y la actividad comportamental del animal. Además, se observó que la liberación de 5-HT puede ser alterada por una amplia variedad de estímulos externos (Linthorst y col., 1994), (Linthorst y col., 1995), (Linthorst y col., 1996). Sin embargo, los cambios en la secreción de la 5-HT en respuesta a estímulos estresantes varían de acuerdo a la naturaleza del estímulo o el área específica en estudio (Kirby y col., 1995), (Kirby y col., 1997), (Linthorst y col., 1995).

1.1.6- Neurotransmisión serotoninérgica y depresión mayor

Desórdenes afectivos o de estado de ánimo, como la depresión mayor, aparecen frecuentemente asociados con diferentes alteraciones bioquímicas en los sistemas de neurotransmisión y neuroendocrinos (Kaplan y col., 1994). Alteraciones en la neurotransmisión de serotonina estarían implicadas en varios de los síntomas de la depresión mayor, como por ejemplo, cambios en el estado de ánimo, el apetito, el sueño, la actividad, las disfunciones sexuales y cognitivas, e inclusive en el suicidio. Una disminución en la actividad del sistema serotoninérgico ha sido reportada en pacientes depresivos. Esto es atribuible a disfunciones en puntos críticos de la neurotransmisión de 5-HT, como por ejemplo una menor disponibilidad de triptofano, deficiencias en la síntesis, liberación, recapturación o metabolismo, un menor número de receptores o una modificación en la transducción de señales de los receptores serotoninérgicos. Estas observaciones han dado lugar al desarrollo de la hipótesis de serotonina como factor involucrado en la patofisiología de la depresión (Maes y Meltzer, 1995); (Mann, 1999).

Algunos estudios han encontrado en pacientes con depresión mayor una reducción en

los niveles de 5-HIAA (metabolito de 5-HT propuesto como índice de la actividad neuronal) en el líquido cefalorraquídeo (Traskman-Bendz y col., 1984). Sin embargo, el grado de reducción en los niveles de 5-HIAA no correlaciona con el grado de severidad de la depresión. Por otro lado, estudios post-mortem del sistema nervioso de pacientes depresivos señalan cambios en las concentraciones de los receptores de 5-HT, un incremento de los autorreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos en el NRD (Stockmeier y col., 1998) y un aumento de los receptores 5-HT_{2A} en la corteza frontal. A su vez, la disminución de los niveles de 5-HT mediante la inhibición de la enzima triptofano hidroxilasa o la reducción de triptofano en la dieta, precipita la aparición de los síntomas depresivos en pacientes en remisión (Delgado y col., 1990), (Staley y Malison, 1998).

Sin embargo, una de las observaciones más contundentes que apoya la hipótesis de serotonina como factor de la depresión, es que la mayoría de las drogas antidepresivas afectan el sistema serotoninérgico (Blier y de Montigny, 1999), (Marsden, 1991), (Kaplan y col., 1994). A finales de la década del 50, se encontró, fortuitamente, un efecto terapéutico antidepresivo en drogas utilizadas contra la tuberculosis, como por ejemplo iproniazida e imipramina (Blier y de Montigny, 1999). Hasta ese momento el único tratamiento efectivo para la depresión mayor era someter al paciente a descargas electroconvulsivas. Sin embargo, se requirieron varios años para llegar a demostrar que los efectos antidepresivos de esas drogas podían deberse a la interferencia de las mismas con el catabolismo de las monoaminas y con el aumento, en consecuencia, de las concentraciones cerebrales de 5-HT y NA. Las primeras drogas comerciales para el tratamiento de la depresión consistieron en inhibidores de la enzima MAO (MAOIs). Más tarde aparecieron las drogas antidepresivas tricíclicas (TCAs), las cuales comparten la propiedad de bloquear la recaptación de NA y 5-HT, aunque con diferencias en su potencia. Los inhibidores específicos de la recaptación de 5-HT (SSRIs: citalopram, fluoxetina, paroxetina) o de NA (maprotilina, oxaprotilina) fueron desarrollados últimamente y su eficacia como drogas antidepresivas también fue demostrada (Mann, 1999); (Mongeau y col., 1997). Algunos antidepresivos actúan, a su vez, directamente sobre los receptores de 5-HT o NA (buspirona, gepirona). A pesar del rápido efecto bioquímico que estas drogas ejercen sobre el sistema serotoninérgico, se requiere de un tratamiento a largo plazo, 2 a 3 semanas, para obtener una eficacia clínica (Kaplan y col., 1994).

La participación de los autorreceptores 5-HT_{1A} en la patología de la depresión ha sido sugerida sobre la base de evidencias experimentales, en las cuales el tratamiento crónico con antidepresivos produjo una reducción en la respuesta electrofisiológica de los autorreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos, sin disminuir la sensibilidad de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos en el hipocampo (Romero y col., 1996), (Jolas y col., 1994). Diversos estudios autorradiográficos y de microdiálisis han sugerido una disminución en el número de los autorreceptores 5-HT_{1A}. Esta reducción provocaría un aumento progresivo en la actividad de la serotonina, lo cual mediaría el efecto antidepresivo de la droga (Gardier y col., 1996). Es interesante observar que la administración repetida de descargas electroconvulsivas induce un aumento en los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos en el hipocampo, efecto similar al ejercido por las drogas antidepresivas tricíclicas (Blier y de Montigny, 1999).

1.1.7- Neurotransmisión serotoninérgica rafe-hipocampo

Basándose en amplias evidencias neuroanatómicas, se ha establecido que la innervación serotoninérgica del hipocampo proviene de los núcleos del rafe medio y dorsal (*Figura 3*). Las proyecciones que surgen del NRD presentan axones finos, pequeñas varicosidades a lo largo de los mismos y se ramifican ampliamente; estos axones inervan principalmente el hipocampo ventral. Las proyecciones provenientes del NRM son también axones finos que forman ramificaciones con axones característicos y presentan varicosidades grandes redondas u ovaladas; estas proyecciones inervan básicamente el hipocampo dorsal (Azmitia y Segal, 1978). Estudios electrofisiológicos en animales anestesiados demostraron que la estimulación de los NRD y NRM provoca la liberación de 5-HT en el hipocampo (McQuade y Sharp, 1995), mientras que estudios en animales concientes demostraron que la estimulación eléctrica de estos núcleos produce una disminución de los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo dorsal (Mokler y col., 1998). Ambas aferencias provenientes del NRD y NRM terminan selectivamente sobre el soma y dendritas de subpoblaciones específicas de interneuronas GABAérgicas en el hipocampo, las cuales inervan, a su vez, a las células del giro dentado y las neuronas piramidales (Freund y col., 1990). Por otro lado, se ha observado una densa innervación recíproca, inhibitoria y probablemente mediada por 5-HT y/o GABA, entre los NRD y NRM (Vertes y Kocsis, 1994), (Vertes y col., 1999). De esta forma la liberación de serotonina en el hipocampo implicaría también una

interacción entre ambos núcleos del rafe (Mokler y col., 1998).

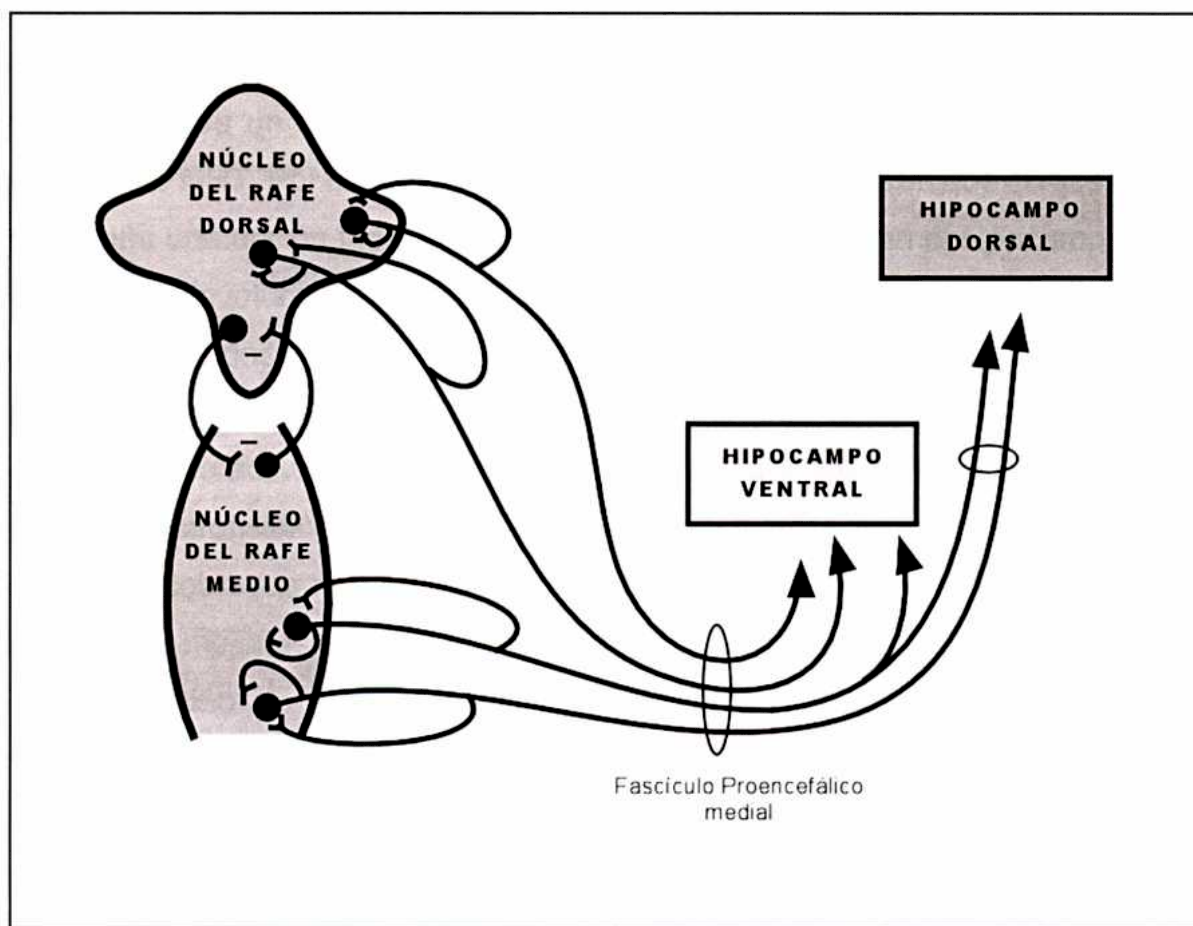


Figura 3: Esquema del sistema de neurotransmisión serotoninérgica del rafe-hipocampo. Adaptado de Mokler y col., 1998.

El sistema serotoninérgico rafe-hipocampal estaría controlado, a su vez, por mecanismos de autorregulación de la secreción. Por un lado, la actividad de las neuronas serotoninérgicas en los NRM y NRD se encuentra bajo el control de los autorreceptores somatodendríticos $5-HT_{1A}$ y $5-HT_{1D}$ (Pineyro y col., 1995). La estimulación de los receptores $5-HT_{1A}$, mediante la administración intra-rafe del agonista 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralin (8-OH-DPAT), produce una reducción de los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo dorsal, siendo esta reducción más marcada cuando el NRM es inyectado (Bonvento y col., 1992), (Kreiss y Lucki, 1994). El incremento de los niveles extracelulares de 5-HT producido, por ejemplo, por la inhibición de la actividad de la proteína involucrada en la recaptación de 5-HT, activaría los autorreceptores somatodendríticos en los núcleos del rafe, provocando una retroalimentación inhibitoria sobre la actividad neuronal y, en consecuencia, sobre la

liberación de 5-HT en las regiones terminales. Otro mecanismo de regulación involucra a los autorreceptores ubicados en las terminales presinápticas, 5-HT_{1B} (en roedores) o 5-HT_{1D} (en otras especies). La estimulación de estos receptores en las terminales sinápticas activa un mecanismo de autoinhibición que genera una reducción en la secreción de 5-HT. Por otro lado, estudios recientes demostraron que el receptor 5-HT₃ desempeña una acción facilitadora en la liberación de 5-HT en el hipocampo, aunque el mecanismo involucrado, así como, la localización celular de dichos receptores no han sido aún definidos (Mongeau y col., 1997). Por último, estos mecanismos de autorregulación controlan también la síntesis de serotonina, por ejemplo, a través de la regulación de la actividad de la enzima triptofano hidroxilasa.

Estudios electrofisiológicos demostraron que la 5-HT posee efectos inhibitorios y excitatorios sobre las neuronas hipocampales (Barnes y Sharp, 1999). La respuesta postsináptica mejor estudiada es la mediada por los receptores 5-HT_{1A} que produce una hiperpolarización de la membrana neuronal a través de una proteína G_{i/o}, sin participación de la adenilato ciclasa (Nicoll y col., 1990). La 5-HT presenta también efectos excitatorios por supresión de canales de potasio, sin embargo los subtipos de receptores involucrados y los mecanismos de transducción implicados no han sido develados hasta el momento.

1.2- Sistema de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH)

La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) es el factor más importante en la regulación e integración de los cambios producidos en los sistemas nervioso, endocrino e inmune en respuesta al estrés (Owens y Nemeroff, 1991), (Dunn y Berridge, 1990). La CRH lleva a cabo la coordinación de las respuestas endocrinas, autonómicas y comportamentales al estrés a través de su acción en el SNC (como neurotransmisor), así como en la periferia (como hormona). La acción de CRH está mediada por dos tipos de receptores: tipo 1 (CRH-R1) y tipo 2 (CRH-R2). De este último, dos isoformas han sido identificadas: CRH-R2 α y CRH-R2 β (Chalmers y col., 1996), (Dieterich y col., 1997), (De Souza, 1995). Además, los efectos de CRH dentro del SNC y en la periferia están limitados anatómicamente y temporalmente por una proteína de unión de alta afinidad para CRH (CRH-BP), que influiría sobre los niveles de CRH libre disponible para la activación de los receptores (Behan y col., 1993). Recientemente un nuevo péptido

relacionado con CRH fue aislado, urocortina (Ucn) (Vaughan y col., 1995), el cual interacciona también con CRH-BP y los receptores de CRH, aunque su rol en el SNC no ha sido aún definido.

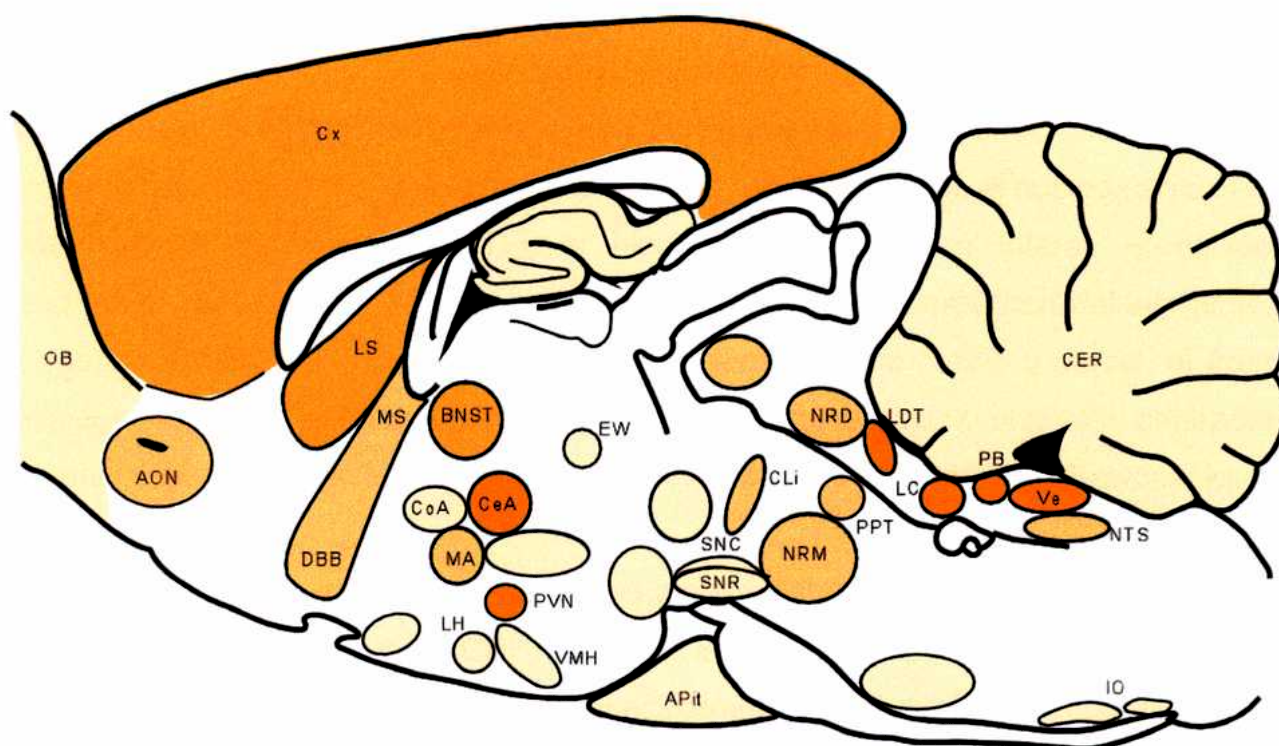
1.2.1- CRH y urocortina (Ucn)

CRH: A mediados de 1950, estudios de distintos grupos coincidieron en la existencia de un factor derivado del hipotálamo capaz de provocar la secreción de la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) en la hipófisis. Este factor fue llamado hormona liberadora de corticotrofina (CRH) debido a su capacidad para estimular la secreción de ACTH. A pesar de que CRH fue el primer factor hipotalámico en ser reconocido, no fue sino hasta 1981 que se lo aisló y caracterizó (Vale y col., 1981). CRH es un péptido de 41 aminoácidos que presenta una alta homología entre distintas especies de mamíferos (hombre, rata, oveja, cerdo, cabra, vaca) y es el principal factor endógeno liberador de la adrenocorticotrofina, aunque otros factores también participan en dicha regulación (por ejemplo: vasopresina, catecolaminas, etc.).

Ucn: Otros péptidos relacionados con CRH han sido identificados también en vertebrados inferiores, como por ejemplo, sauvagina, aislada de la piel de anfibio, y urotensina, aislada en peces. Estos péptidos fueron considerados homólogos de la CRH hasta que dos nuevos péptidos aún más cercanos a CRH fueron identificados en las mismas clases de vertebrados. Este hecho sugirió la existencia de múltiples péptidos relacionados con la CRH también en mamíferos. En 1995, Vaughan y col. identificaron en mamíferos un nuevo péptido miembro de la familia de CRH (Vaughan y col., 1995). El mismo presenta una homología del 63 % con urotensina y del 45 % con CRH, de ahí su nombre de urocortina (Ucn). Este nuevo péptido fue clonado en ratas, e inmediatamente después en humanos (Donaldson y col., 1996), difiriendo ambos tan solo en dos aminoácidos. Estos resultados indican que existen, por lo menos, dos líneas evolutivas de los péptidos integrantes de la familia de CRH en mamíferos, uno relacionado con CRH cuya línea se puede remontar hasta la clase de peces, y otro origen relacionado con urotensina/urocortina también presente en peces (Lovejoy y Balment, 1999).

1.2.1.1- Localización

Estudios histológicos detectaron la expresión de CRH en la región parvocelular del



AON	núcleo olfatorio anterior	HIP	hipocampo	NTS	n. del tracto solitario
APit	hipófisis anterior	IO	n. inferior olive	OB	bulbo olfatorio
BLA	amígdala basolateral	IP	n. interpedicular	PAG	área periacueductal gris
BNST	n. rojo de las terminaciones estriales	LC	locus coeruleus	PB	n. parabranchial
CeA	amígdala central	LDT	n. laterodorsal del tegmento	PPT	n. pedúnculo pontino
CER	cerebelo	LH	lateral hipotálamo	PVN	n. paraventricular
CLi	n. cuadal lineal	LS	septum lateral	R	n. rojo
CoA	amígdala cortical	LSO	n. lateral superior olive	SNC	sust. negra pars comp.
Cx	corteza	MA	amígdala media	SNR	sust. negra pars retic.
DBB	banda de Broca	MS	septum medio	SO	n. supraóptico
EW	n. Edinger-Westphal	NRD	n. del rafe dorsal	Ve	n. vestibular
		NRM	n. del rafe medio	VMH	hipotálamo ventromedial

Figura 4: Esquema de la distribución de CRH en el SNC de rata. Los datos sobre la localización y densidad (indicado por el gradiente en la coloración) de la inmunoreactividad de CRH se basan en los trabajos expuestos en esta sección.

núcleo paraventricular del hipotálamo, área que envía proyecciones hacia la eminencia media, donde CRH es secretada al sistema portal. Mediante esta vía, CRH alcanza la hipófisis anterior y estimula la liberación de ACTH, desencadenando la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) (ver eje HPA, sección 1.2.3.1) (Vale y col., 1981), (Sawchenko y Swanson, 1985). Sin embargo, la expresión de CRH no está confinada solamente al hipotálamo. Su distribución dentro del SNC es amplia (*Figura*

4). Neuronas inmunoreactivas a CRH fueron localizadas a lo largo de la neocorteza, con alta densidad en las regiones prefrontal y cingulata (Swanson y col., 1983). La CRH ha sido también localizada en varias áreas involucradas en el control de funciones autonómicas, como por ejemplo, el núcleo central de la amígdala, el núcleo rojo de las terminaciones estriatales (BNST), el hipocampo, el septum lateral, el núcleo accumbens, los núcleos talámicos posteromediales, núcleo laterodorsal del tegmento, la sustancia negra, el locus coeruleus, los núcleos del rafe medio y dorsal, el área periacueductal gris, el bulbo olfatorio, los núcleos parabrachiales, el núcleo del tracto solitario y el cerebelo (Merchenthaler, 1984), (Morin y col., 1999), (Sawchenko y Swanson, 1985).

Por otro lado, la Ucn presenta también una amplia distribución en el SNC (*Figura 5*), pero con un patrón diferente a CRH. En ratas, la expresión del ARNm de Ucn ha sido localizada en áreas de la neocorteza y principalmente en el núcleo Edinger-Westphal (Vaughan y col., 1995), el cual forma parte de la porción parasimpática del núcleo oculomotor. Otras áreas cerebrales que presentan una moderada expresión del ARNm de Ucn son el hipocampo, los ganglios basales, el septum medio, los núcleos medio y cortical de la amígdala, los núcleos paraventricular (PVN) y ventromedial del hipotálamo, colículos superiores, el núcleo rojo, la sustancia negra y la corteza cerebral (Wong y col., 1996). Otros estudios reportaron también la presencia de Ucn en cuerpos neuronales del núcleo laterodorsal del tegmento, el núcleo del rafe dorsal y el área periacueductal gris (Kozicz y col., 1998) mientras que solo unos pocos cuerpos neuronales y fibras conteniendo Ucn han sido identificadas en el hipotálamo (Morin y col., 1999). Además, una densa red de fibras inmunoreactivas a Ucn fue observada en el septum lateral (Kozicz y col., 1998); (Morin y col., 1999). En un estudio reciente, células inmunoreactivas a Ucn han sido detectadas en la hipófisis anterior humana, sugiriendo un rol paracrino o autocrino en la producción y/o secreción de ACTH (Iino y col., 1997).

Una comparación directa de la inmunoreactividad de CRH y Ucn en el SNC de la rata, revela una mayor cantidad de cuerpos neuronales y fibras positivas para CRH en relación con Ucn (Morin y col., 1999). Asimismo, la limitada superposición en la distribución de CRH y Ucn en el SNC de la rata, sugeriría que ambos neuropéptidos desempeñarían distintos roles fisiológicos.

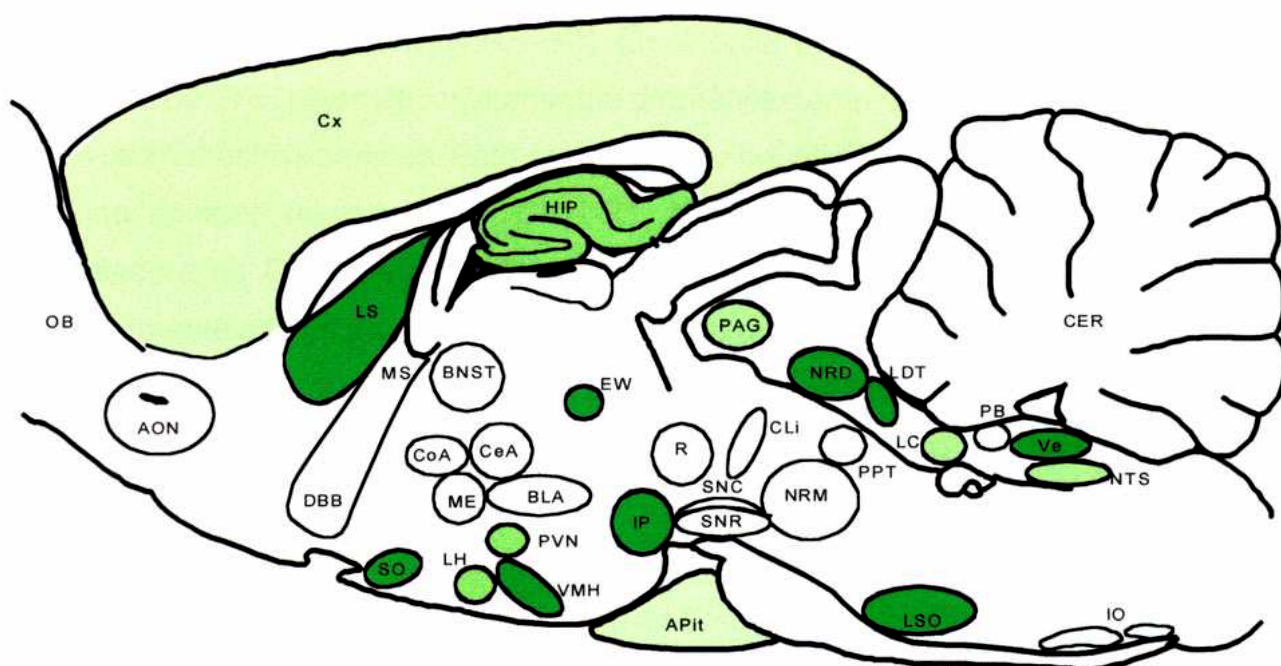


Figura 5: Esquema de la distribución de Ucn en el SNC de rata. Los datos sobre la localización y densidad (indicado por el gradiente en la coloración) de la inmunoreactividad de Ucn se basan en los trabajos expuestos en esta sección.

1.2.2- Receptores y proteína de unión a CRH

Receptores: Hasta el presente, se han clonado dos tipos diferentes de receptores de CRH, CRH-R1 (Chang y col., 1993) y CRH-R2 (Lovenberg y col., 1995), los cuales presentan una homología del 70 % entre sí. La estructura de ambos receptores consiste en una proteína con siete dominios transmembrana acoplados a la adenilato ciclasa a través de una proteína G (De Souza, 1995); (Grigoriadis y col., 1996); (Dieterich y col., 1997). Actualmente se conocen para CRH-R2 dos isoformas distintas, tanto en rata como en humanos: CRH-R2 α y CRH-R2 β . En roedores, CRH-R2 α se expresa exclusivamente en el SNC, mientras que CRH-R2 β se expresa predominantemente en la periferia. En cambio, en humanos, ambos subtipos de receptores fueron encontrados en el SNC (Chalmers y col., 1996).

CRH-BP: En plasma, la CRH se encuentra usualmente unida a una proteína transportadora, lo que provoca que en condiciones normales los niveles plasmáticos de CRH resulten casi indetectables. Esta proteína, de 322 aminoácidos, fue originalmente purificada y clonada a partir del plasma humano (Potter y col., 1991) y recibió el nombre

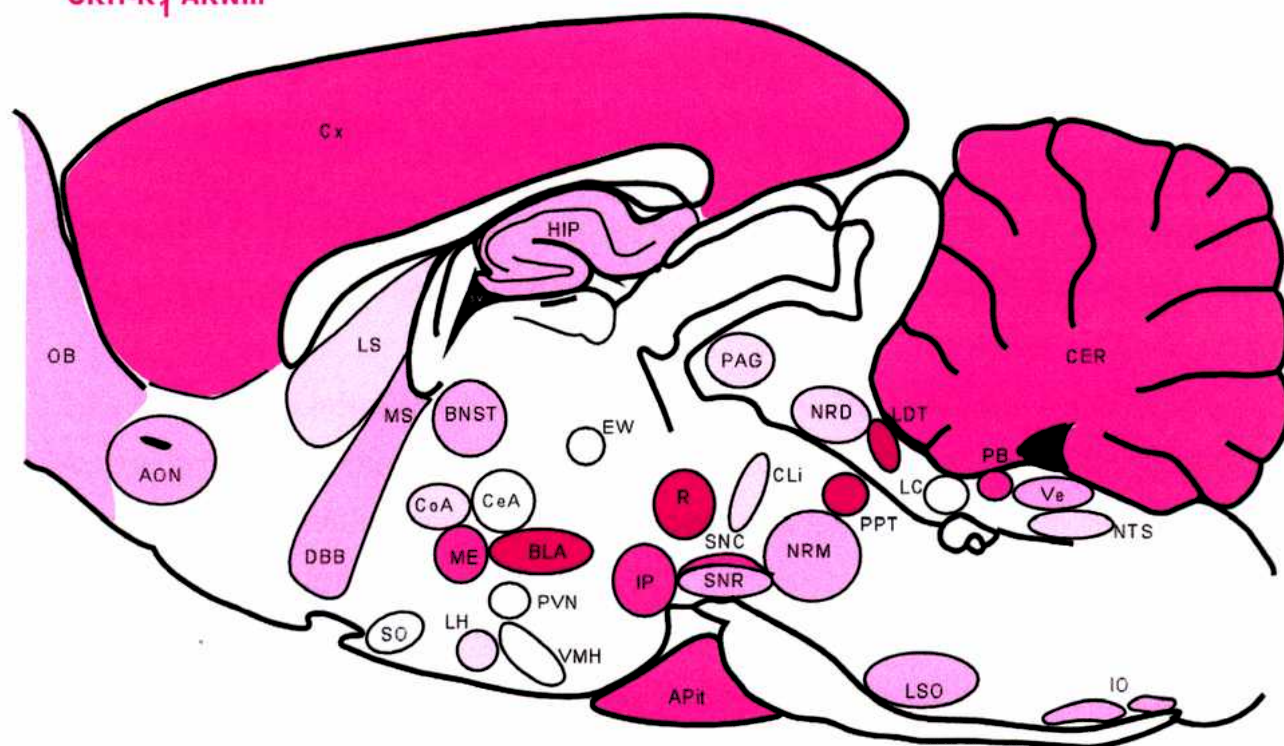
de proteína de unión de CRH (CRH-BP). En el tercer trimestre del embarazo humano, los niveles de CRH plasmáticos aumentan dramáticamente, sin embargo los niveles de ACTH permanecen normales. Esto se debe a que la CRH-BP plasmática se une a CRH con una afinidad mayor que el CRH-R1, bloqueando de esta manera la acción estimuladora de CRH sobre ACTH. La habilidad de CRH-BP de unirse e inactivar funcionalmente a CRH representa un mecanismo modulador adicional de la función de esta hormona, aunque su rol no ha sido completamente elucidado (Behan y col., 1993). Sin embargo, un estudio reciente de Behan y col. propone la utilización de un ligando específico de la CRH-BP como tratamiento del deterioro cognitivo de la enfermedad de Alzheimer. Esta estrategia provocaría un aumento de los niveles de CRH en el SNC en forma localizada, a través de la disociación de CRH de la CRH-BP (Behan y col., 1995).

1.2.2.1- Localización

CRH-R1 y CRH-R2 presentan distintos patrones de distribución neuroanatómica, con muy poca superposición en su expresión (*Figura 6*). La expresión del ARNm de CRH-R1 se presenta predominantemente en la neocorteza, en los núcleos laterodorsal del tegmento y pedunculopontino, el núcleo basolateral de la amígdala, el cerebelo y en los sistemas sensoriales. Existe también una alta expresión de este receptor en la hipófisis anterior. La expresión de CRH-R2 ha sido localizada mayoritariamente en el PVN, el septum lateral, los núcleos cortical y medio de la amígdala y los núcleos del rafe. Una expresión mixta de ambos receptores ha sido observada en el bulbo olfatorio, el hipocampo, la corteza entorrinal, el BNST y el área periacueductal gris (Chalmers y col., 1995), (De Souza, 1995), (Bittencourt y Sawchenko, 2000). Esta distribución heterogénea de ambos receptores sugeriría para cada uno de ellos roles funcionales distintos, mediando, por consiguiente, efectos diferenciales de CRH.

A pesar de la alta homología entre la CRH-BP humana y de rata, la distribución anatómica de esta proteína difiere entre ambas especies. En humanos, la CRH-BP se encuentra abundantemente en tejidos como el hígado, la placenta y el cerebro, mientras que en rata solo se encuentra en el cerebro y la hipófisis (Potter y col., 1991). CRH-BP muestra una amplia distribución en el SNC y se expresa predominantemente en la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, el bulbo olfatorio y en áreas del tronco cerebral, particularmente en los núcleos del rafe y en la formación reticular (Behan y col., 1996a). Sin embargo, la expresión de la CRH-BP no ha sido detectada en el núcleo

CRH-R₁ ARNm



CRH-R₂ ARNm

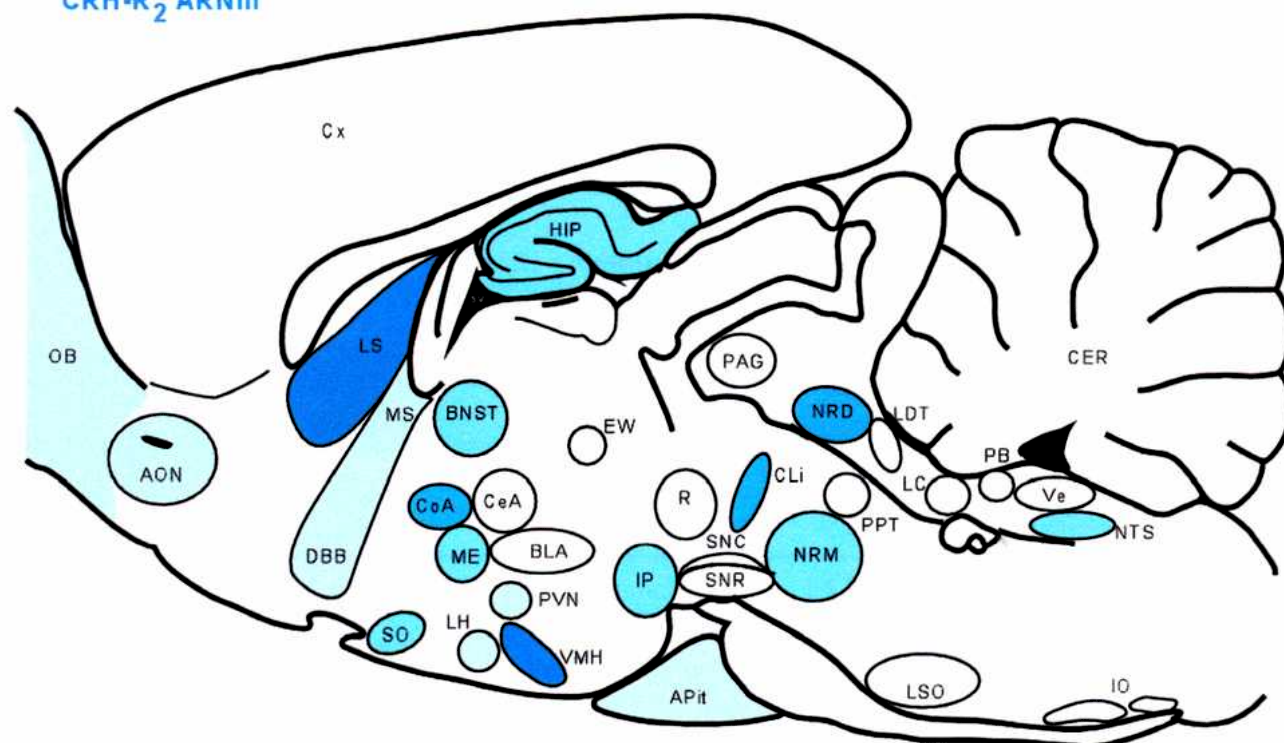


Figura 6: Esquema de la distribución de los receptores de CRH. Los datos sobre la expresión del ARNm de CRH-R1 y CRH-R2 se basan en los trabajos expuestos en esta sección. La intensidad de color indica la densidad de expresión del ARNm observada en estos núcleos.

paraventricular del hipotálamo, mientras que una alta expresión ha sido observada en la hipófisis, donde participaría de manera paracrina en la regulación de la respuesta endocrina al estrés. La colocalización de CRH y CRH-BP ha sido descripta principalmente en el bulbo olfatorio, el septum lateral, el BNST y el núcleo central de la amígdala. Sin embargo, una muy débil colocalización fue encontrada en la corteza, donde la CRH-BP se expresa abundantemente (Behan y col., 1996b).

1.2.2.2- Afinidades entre los péptidos componentes de la familia de CRH

La Ucn es un fuerte estimulador de los receptores de CRH. Sin embargo, Ucn presenta una afinidad aproximadamente 10 veces mayor que CRH por las dos isoformas de CRH-R2 (*Tabla 3*) (Donaldson y col., 1996). Ucn y CRH poseen un efecto similar en la inducción de los niveles de AMPc en células transfectadas con CRH-R1, mientras que células que expresan CRH-R2 α y CRH-R2 β acumulan entre 10 y 20 veces más AMPc en respuesta a la estimulación de Ucn en comparación con CRH. Por otro lado, CRH-BP humana muestra una afinidad similar para la Ucn y la CRH (Donaldson y col., 1996), (Vaughan y col., 1995). Sin embargo, recientemente se describió que Ucn presenta una tasa de disociación de la CRH-BP más lenta que CRH, lo cual sugeriría una mayor efectividad de la CRH-BP para inactivar funcionalmente a Ucn (Henriot y col., 1999).

tabla 3

Péptido	CRH-R1 humano	CRH-R2 α rata	CRH-R2 β ratón	CRH-BP humano
CRH rata/humana	0,95 nmol/L	13 nmol/L	17 nmol/L	0,21 nmol/L
Ucn h	0,41 nmol/L	1,8 nmol/L	1,5 nmol/L	0,22 nmol/L
Ucn r	0,16 nmol/L	0,58 nmol/L	0,41 nmol/L	0,12 nmol/L

tabla 3: Afinidades relativas de CRH y Ucn por los distintos subtipos de receptores y la proteína de unión a CRH. La constante de disociación de los péptidos fue calculada a partir de la unión a células CHO transfectadas con los receptores o la CRH-BP. Datos tomados de Donaldson y col. (Donaldson y col., 1996).

1.2.3- Efectos de CRH y Ucn

Las situaciones de estrés de origen físico, fisiológico, o bien inmunológico, producen una disrupción en la homeostasis del organismo, provocando un amplio espectro de cambios dentro de los sistemas nervioso, endocrino e inmune. La CRH ha sido implicada en la regulación de distintos procesos comportamentales y fisiológicos, los cuales comparten una misma función: la adaptación de las respuestas comportamentales, autonómicas e inmunes al estrés (Owens y Nemeroff, 1991). Como se describió previamente, Ucn presenta una alta afinidad por ambos receptores de CRH, por lo tanto, varios de los efectos comportamentales y fisiológicos de su administración central son cualitativamente similares a los producidos por CRH. Sin embargo, dada la alta densidad de expresión e innervación de Ucn en áreas que presentan casi exclusivamente el CRH-R2, y la mayor afinidad de Ucn por este receptor en comparación con CRH, se ha sugerido que Ucn es el ligando endógeno del CRH-R2. Basados en la distribución heterogénea del ARNm de CRH-R1 y CRH-R2 en el SNC, un rango de efectos neuroendocrinos y comportamentales de CRH y/o Ucn pueden ser asociados particularmente a cada uno de los receptores. Varios métodos son actualmente utilizados para el estudio de la participación diferencial de CRH-R1 y CRH-R2 en la modulación de las acciones de CRH y Ucn, como por ejemplo, el bloqueo de los receptores usando antagonistas selectivos o no selectivos, la utilización de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra uno de los receptores, la generación de ratones transgénicos deficientes de CRH-R1 o CRH-R2 y la comparación de los efectos producidos por la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de CRH y Ucn, debido a la mayor afinidad de Ucn por CRH-R2.

1.2.3.1- Efectos endocrinos. Eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA)

En mamíferos, la respuesta endocrina al estrés esta mediada por el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Durante el estrés, la síntesis de CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo aumenta y CRH es liberada desde las terminales nerviosas al sistema de vasos portales hipotálamo-hipofisiario en la eminencia media (Owens y Nemeroff, 1991). CRH es generalmente considerado el activador primario del eje HPA, aunque otros factores endógenos participan también en la modulación de la actividad del eje (vasopresina, noradrenalina) (Turnbull y col., 1999a). Cuando el péptido alcanza la hipófisis anterior desencadena una cascada de eventos intracelulares

que provocan el aumento de la expresión del gen de pro-opiomelanocortina (POMC) y la liberación de los péptidos derivados de este gen: la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) y β -endorfina (Vale y col., 1981). La ACTH provoca, a su vez, la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en primates y corticosterona en roedores) en la corteza adrenal (*Figura 7*). Dos tipos de receptores de glucocorticoides han sido identificados en el SNC, los receptores de mineralocorticoides (MR, tipo I) y los receptores de glucocorticoides (GR, tipo II). La corticosterona se une a ambos tipos de receptor pero con una afinidad 10 veces mayor para los MR (Reul y de Kloet, 1985). La distribución de MR en el SNC esta restringida a estructuras límbicas, por ejemplo, hipocampo, septum y amígdala, mientras que GR se encuentra distribuido a lo largo de todo el SNC, presentando una alta densidad en estructuras límbicas (hipocampo, septum), en las neuronas parvocelulares del PVN y en neuronas monoaminérgicas ascendentes del tronco cerebral (Herman y col., 1989). Durante una situación de estrés, los niveles de corticosterona pueden aumentar hasta unas 100 veces con respecto a su nivel basal. Basados en resultados experimentales, en la diferente afinidad por los glucocorticoides y en la distinta distribución neuroanatómica de MR y GR, se ha sugerido que los GR mediarían la retroalimentación negativa frente a una situación de estrés, mientras que los MR mediarían un tono inhibitorio del hipocampo sobre el eje HPA (Reul y col., 2000). De esta manera, se ha sugerido que la función de adaptación del eje HPA es críticamente dependiente del mecanismo de retroalimentación negativa de los glucocorticoides, y que esta regulación no estaría limitada solamente a la activación del eje HPA en respuesta al estrés, sino también a la actividad circadiana del eje (Jacobson y Sapolsky, 1991). Las tres vías sugeridas a través de las cuales los glucocorticoides ejercen una acción moduladora de la activación del eje HPA son: 1) una retroalimentación inhibitoria a nivel del PVN y de la hipófisis anterior; 2) una retroalimentación positiva a nivel de la amígdala central y la parte dorsal del PVN; y 3) otro circuito de retroalimentación negativa a través del hipocampo ventral, el cual proyecta hacia el BNST (Owens y Nemeroff, 1991), (Gray y Bingaman, 1996).

La acción de CRH sobre la activación del eje HPA a través de la estimulación de la secreción de ACTH, es mediada por el CRH-R1 (por lo menos en roedores) debido a la expresión predominante de este receptor en la glándula hipófisis. En cambio, ambos receptores estarían involucrados en los efectos centrales que dan lugar a la estimulación de CRH, vía el núcleo central de la amígdala, el BNST, el PVN y el

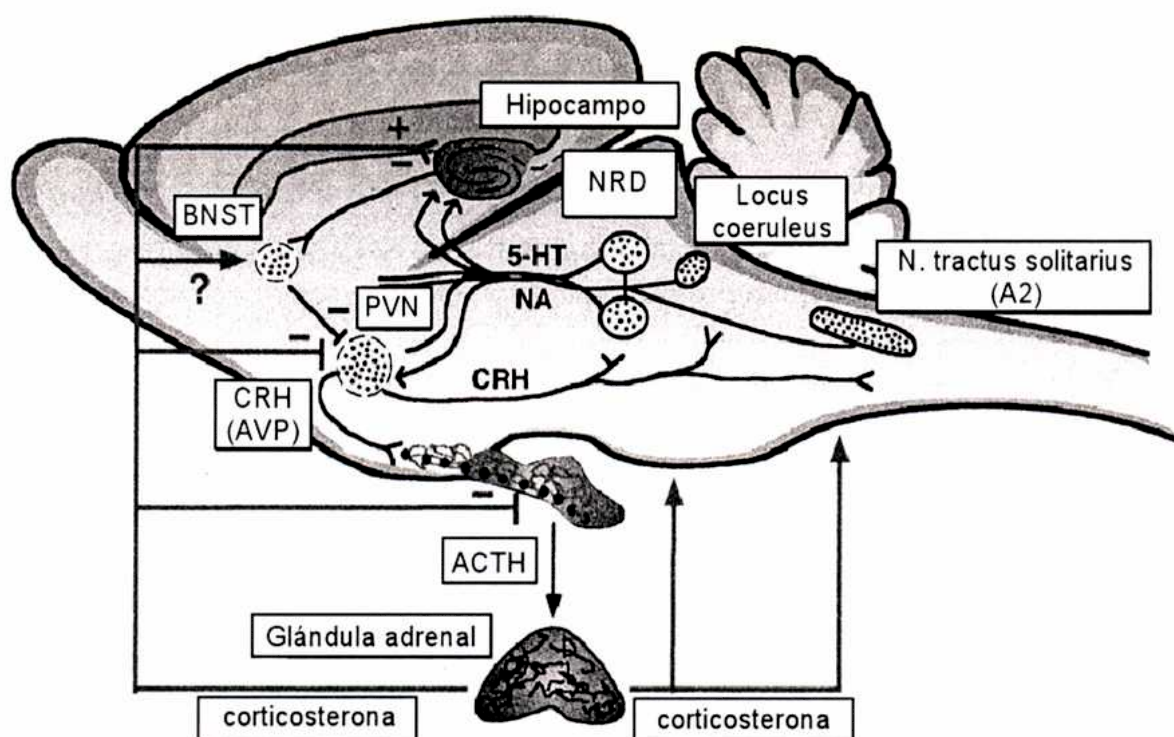


Figura 7: Esquema del eje hipotálamo-pituitario-adrenal y los mecanismos reguladores de su actividad. BNST, núcleo del las terminaciones estriatales; NRD, núcleo del rafe dorsal; PVN, núcleo paraventricular.

hipocampo (Chalmers y col., 1995). El rol del CRH-R1 en la regulación del eje HPA ha sido confirmado a través de estudios en dos líneas de ratones deficientes del receptor de CRH tipo 1 (Timpl y col., 1998), (Smith y col., 1998). En condiciones basales, ambos modelos de ratones deficientes de CRH-R1 presentan niveles de corticosterona marcadamente reducidos, mientras que la concentración de ACTH no difiere de niveles de los ratones de cepa salvaje (Timpl y col., 1998), (Smith y col., 1998). La participación en la estimulación de la secreción de ACTH de otros factores endógenos, como vasopresina, explicaría esto último (Turnbull y col., 1999a). Sin embargo, frente a una situación de estrés, como la natación forzada (Timpl y col., 1998) o la restricción física (Smith y col., 1998), los niveles de ACTH no aumentan y la respuesta de los niveles de corticosterona permanece reducida en los ratones deficientes del receptor en comparación con los ratones de cepa salvaje. Estos resultados indican el requerimiento del CRH-R1 en la respuesta del eje HPA al estrés.

Por otro lado, la administración sistémica de Ucn produce una mayor estimulación de

ACTH en comparación con la administración de CRH (Vaughan y col., 1995), (Asaba y col., 1998). Resultados similares se han obtenido también *in vitro* (Vaughan y col., 1995), (Asaba y col., 1998), (Ozawa y col., 1998). Sin embargo, tanto los niveles basales de ACTH como su respuesta frente a un estímulo estresante, pueden ser atenuados por anticuerpos anti-CRH, mientras que los anticuerpos anti-Ucn carecen de efecto. Esto sugeriría que CRH es el mediador fisiológico predominante en la secreción de ACTH tanto en condiciones basales como en respuesta al estrés (Turnbull y col., 1999b).

1.2.3.2- Efectos sobre los sistemas nervioso autónomo e inmune

Frente a un estímulo estresante, además de la activación del eje HPA, el sistema nervioso autónomo responde rápidamente para la adaptación del cuerpo a la respuesta de "lucha" o "huída". La CRH desempeña un importante rol en la coordinación de estas respuestas al estrés. Experimentalmente se ha observado que la administración i.c.v de CRH produce la activación del sistema nervioso simpático y la inhibición del sistema nervioso parasimpático. Estos efectos provocan, entre otros, un aumento en los niveles de glucosa plasmática, la tasa cardíaca y la presión arterial, así como una inhibición de las funciones digestivas (Brown y Fisher, 1985), (Brown y col., 1982). Esta activación y supresión de las dos ramas del sistema nervioso autónomo se debe a la acción directa de CRH en el SNC, ya que su administración periférica no produce dichos efectos.

Por otro lado, la CRH participa en la regulación del sistema inmune, ejecutando, en parte, los efectos supresores del estrés sobre este sistema. En respuesta a una inflamación, infección o injuria, el sistema inmune responde inmediatamente mediante la secreción de citoquinas, las cuales son liberadas en el tejido afectado, así como también, a la circulación general. Este proceso provoca la activación de los mecanismos de defensa del sistema inmune y además, la activación del eje HPA, la cual resulta en un aumento de los niveles de glucocorticoides plasmáticos (Besedovsky y col., 1986), (Del Rey y col., 1987). Los glucocorticoides juegan un rol esencial en la regulación de los procesos de defensa del organismo, ya que mediante la activación de un mecanismo de retroalimentación negativa, producen efectos antiinflamatorios e inmunosupresores que previenen la respuesta exagerada de los mecanismos de defensa, la cual podría ser perjudicial para el organismo (Munck y col., 1984), .

Estudios previos demostraron que la administración central, pero no periférica, de CRH produce una supresión dosis dependiente de la actividad de las células killer del bazo de la rata, la cual es mediada por el sistema nervioso autónomo (Irwin y col., 1990). Sin embargo, se ha demostrado que la CRH es producida también por células del sistema inmune, actuando así localmente en sitios de inflamación, donde desempeñaría una acción autocrina o paracrina (Karalis y col., 1991). Los receptores de CRH han sido encontrados en células del sistema inmune, como por ejemplo monocitos, linfocitos T presentes en la circulación sanguínea y macrófagos del bazo (Brouxhon y col., 1998). Además, la CRH estimula la proliferación *in vitro* de células mononucleares periféricas sanguíneas humanas, la expresión del receptor de IL-2 en células T activadas y la producción de IL-1 e IL-2 (revisión: (Owens y Nemeroff, 1991)).

1.2.3.3- Efectos comportamentales

La administración i.c.v. o intracerebral de CRH o Ucn en áreas específicas, produce una amplia variedad de efectos comportamentales, los cuales dependen del estado basal comportamental y del estrés del animal (Dunn y Berridge, 1990). En animales no estresados, en condiciones de alerta normal y en un medio ambiente familiar, la administración i.c.v. de CRH y Ucn produce una activación comportamental dosis dependiente que incluye el aumento de la actividad locomotora, olfateo y aseo (Diamant y de Wied, 1991). Dicha activación no es observada cuando CRH es administrada en forma sistémica, ni tampoco es bloqueada por la hipofisectomía, sugiriendo que estos efectos comportamentales son mediados por la acción de CRH en el SNC, independientemente de la activación del eje HPA (Eaves y col., 1985). En cambio, cuando el animal es expuesto a un medio ambiente novedoso, la administración i.c.v. de CRH o Ucn genera un patrón comportamental similar al observado cuando el animal es expuesto a una situación de estrés: reducción de la exploración, la alimentación y el comportamiento sexual (Dunn y Berridge, 1990). Por lo tanto, la misma dosis i.c.v. que produce una marcada activación comportamental en un medio ambiente familiar, genera una supresión de la misma en un medio ambiente desconocido, presumiblemente estresante. Roedores tratados con CRH i.c.v. muestran un comportamiento de ansiedad en la prueba de campo abierto (Sutton y col., 1982), (Dunn y Berridge, 1990). La Ucn comparte también estos efectos ansiogénicos de CRH, supuestamente mediados por el CRH-R1 (Jones y col., 1998), (Moreau y col., 1997).

Por otro lado, diversos estudios utilizando antagonistas selectivos, oligonucleótidos antisentido o ratones genéticamente deficientes de los receptores de CRH, sugirieron que la inducción de ansiedad por parte de CRH estaría mediada por el CRH-R1 (para revisión ver (Steckler y col., 1999), (Smagin y Dunn, 2000). Además, varias estructuras cerebrales implicadas en procesos emocionales, tales como el miedo, la ansiedad y el pánico, presentan una alta expresión del CRH-R1, como por ejemplo, la amígdala, el BNST, la corteza prefrontal y cingulata, y el área periacueductal gris (Coplan y Lydiard, 1998). Los ratones deficientes de CRH-R1 muestran un reducido comportamiento ansioso en la prueba de campo abierto y en el test de transición luz-oscuridad (Timpl y col., 1998), (Smith y col., 1998). Dicha reducción en el comportamiento ansioso no es revertido con la substitución de glucocorticoides (Smith y col., 1998), lo cual sugiere que la carencia de un CRH-R1 funcional está involucrada en dichos cambios comportamentales. Por otra parte, ratones con disfunción del CRH-R2 presentan un mayor comportamiento ansioso frente a distintos tests comportamentales (Kishimoto y col., 2000), (Bale y col., 2000), (Coste y col., 2000). En base a estas evidencias, se ha propuesto que el CRH-R2 mediaría las respuestas comportamentales ansiolíticas, mientras que CRH-R1 estaría involucrado en las respuestas ansiogénicas.

Otras acciones comportamentales asociadas con un estado de estrés y que son provocadas por la administración i.c.v. de CRH y Ucn, incluyen la reducción en la ingesta de alimento en ratones y ratas privados previamente o no de alimento (Heinrichs y Richard, 1999), y la disminución del comportamiento sexual (revisiones: (Dunn y Berridge, 1990), (Koob y Heinrichs, 1999), (Koob, 1999), (Song y col., 1995).

Por otro parte, la expresión selectiva del CRH-R2 α en los núcleos del septum lateral, PVN, hipotálamo ventromedial y los núcleos del rafe, implicaría a este receptor en las acciones autonómicas, comportamentales y anoréxicas de CRH y Ucn. Debido a la diferencia de afinidad entre CRH y Ucn con respecto al CRH-R2, los efectos de estos neuropéptidos sobre la ingestión de alimento han sido estudiados y comparados. Spina y col. demostraron que la Ucn posee una mayor potencia en comparación con CRH, en producir efectos anoréxicos en animales privados de alimento (Spina y col., 1996). Sin embargo otros autores han observado una potencia similar entre ambos péptidos (Jones y col., 1998), (Smagin y col., 1998), (Heinrichs y Richard, 1999). La administración de oligonucleótidos antisentido contra el CRH-R2 provocó una reducción de la supresión en la ingestión de alimento producidas por CRH y Ucn i.c.v. (Smagin y

col., 1998). Los ratones deficientes de CRH-R2 muestran un comportamiento de alimentación basal normal aunque manifiestan una reducida ingesta luego de la privación de alimentos (Bale y col., 2000).

1.2.4- El sistema de CRH y la depresión mayor

Estudios previos han reportado que los pacientes con depresión mayor presentan una elevada concentración de cortisol en plasma, así como también una respuesta aberrante de ACTH y cortisol a la administración de dexametasona (un glucocorticoide sintético). Ambos resultados, hipercortisolemia y la respuesta anormal a la prueba de dexametasona, sugirieron la hipótesis de una hiperactividad del eje HPA asociada a la depresión mayor (revisiones (Holsboer, 1999), (Nemeroff, 1996), (Arborelius y col., 1999). Además, cuando los pacientes son tratados con medicamentos antidepresivos, descargas electroconvulsivas o durante la espontánea remisión, la función del eje HPA retorna a una actividad normal. Adicionalmente, se han detectado niveles elevados de CRH en el fluido cefalorraquídeo (Nemeroff y col., 1984), un aumento del número de células que expresan CRH en el PVN y un incremento en los niveles del ARNm de CRH en el hipotálamo, lo cual indicaría una hipersecreción de CRH en pacientes depresivos (Raadsheer y col., 1995), (Raadsheer y col., 1994). Una reducida densidad del receptor de CRH en la corteza frontal ha sido observada en pacientes que padecían de depresión mayor, lo cual podría explicarse como una respuesta compensatoria a los altos niveles de CRH en dichas regiones cerebrales (Nemeroff y col., 1988). Estas evidencias sugieren que una disfunción del eje HPA podría desempeñar un rol causal en el desarrollo y curso de la depresión mayor, y que la misma podría estar relacionada con: a) una hipersecreción de CRH y en consecuencia una reducción compensatoria de los receptores de CRH en la hipófisis y otras áreas cerebrales, y b) una disminución en la sensibilidad a la retroalimentación negativa por los glucocorticoides, como consecuencia de una posible disminución de los receptores GR o MR en el hipocampo, provocada, a su vez, por una exposición sostenida a altas concentraciones de glucocorticoides (revisiones: (Holsboer, 1989), (Nemeroff, 1996), (Arborelius y col., 1999), (Holsboer, 1999)).

Considerando las evidencias clínicas y experimentales, varios autores han propuesto el bloqueo de la acción de CRH mediante antagonistas de sus receptores, como una estrategia terapéutica antidepresiva. Por otra parte, la asociación del CRH-R1 con el

comportamiento ansioso ha generado el estudio de antagonistas específicos de este receptor como posibles drogas antidepresivas (Holsboer, 1999).

1.2.5- Efectos de CRH sobre el sistema serotoninérgico rafe-hipocampo

Como se describió previamente, CRH desempeña un rol importante en la coordinación de las respuestas autonómica y comportamental al estrés (Owens y Nemeroff, 1991), (Dunn y Berridge, 1990). Uno de los mecanismos a través del cual la CRH controlaría dichos cambios fisiológicos y comportamentales sería mediante su acción sobre distintos sistemas neuromoduladores, entre ellos el sistema serotoninérgico. Por otro lado, se ha demostrado que estímulos relacionados con el estrés aumentan la neurotransmisión serotoninérgica en los núcleos del rafe dorsal y medio (Adell y col., 1997), (Maswood y col., 1998) y en regiones proencefálicas límbicas, especialmente en respuesta a estímulos intensos, incontrolables e impredecibles (Maswood y col., 1998), (Amat y col., 1998). Estos resultados avalan la hipótesis de que el estrés estimula el aumento de la neurotransmisión serotoninérgica mediante la acción de CRH sobre subpoblaciones neuronales que conforman el sistema serotoninérgico.

Una alta densidad de cuerpos neuronales y axones inmunoreactivos a CRH, así como la expresión del ARNm de CRH y Ucn, han sido localizadas en neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe (Lowry y col., 2000), (Kirby y col., 2000) (Merchenthaler, 1984), (Ruggiero y col., 1999), (Morin y col., 1999), (Bittencourt y col., 1999). Además, la expresión de CRH-R1 y CRH-R2 ha sido detectada también en los núcleos del rafe (De Souza, 1995), (Bittencourt y col., 1999). Estas evidencias neuroanatómicas sugieren la participación de CRH y/o Ucn en la regulación del sistema serotoninérgico. En un trabajo reciente, Linthorst y col. demostraron que la administración crónica de CRH en el SNC produce una disminución de la respuesta de 5-HT hipocampal frente al estrés, marcando así la importancia de la interacción entre ambos sistemas (Linthorst y col., 1997). Es importante remarcar que el hipocampo es un área límbica que desempeña un rol destacado en el proceso de la información sensorial, como también, en la coordinación de las respuestas autónomas, neuroendocrinas y comportamentales a estrés (Risold y Swanson, 1996), funciones que se encuentran marcadamente afectadas en los desórdenes psiquiátricos asociados a estrés.

1.3- El sueño

El sueño y la vigilia son dos estados comportamental y fisiológicamente bien definidos que ocurren normalmente a tiempos restringidos del día. El ciclo de alternancia entre los estados de sueño y vigilia es uno de los ritmos biológicos mas prominentes y profundos. Sin embargo, aproximadamente 60 años atrás, el sueño era considerado solo como un estado pasivo en el cual el cerebro se desactivaba. El desarrollo de técnicas no invasivas para el estudio de la actividad bioeléctrica cerebral, así como estudios experimentales en animales, permitieron caracterizar al sueño como un proceso de amplia actividad neurológica y fisiológica. Mientras que el comportamiento consciente de la vigilia presenta una función sensorial-motora activa y deliberada con el entorno, el sueño esta determinado por una desconexión perceptiva con el medio y reducidos niveles de actividad motora.

Basados en el concepto de que los estados de la vigilia y el sueño resultan de la competencia de diferentes mecanismos cerebrales que promocionan y median cada uno de estos estados, Borbely y Dann propusieron una teoría sobre dos procesos que interaccionarian para regular los ciclos de vigilia-sueño: 1) un proceso circadiano, que se entrena de acuerdo al ciclo de luz-oscuridad y promueve la vigilia durante la fase activa del ciclo y permite el sueño durante la fase de reposo; 2) un proceso homeostático en el cual la necesidad de sueño se acumula durante la vigilia y se disipa durante el sueño. A este último proceso, se lo puede considerar como la acumulación, durante la vigilia, de posibles sustancias promotoras del sueño. Además un tercer mecanismo controlaría la alternación ultradiana entre los distintos estados del sueño (Borbely, 1998).

1.3.1- Estados del sueño

El sueño es un fenómeno periódico, fácilmente reversible, caracterizado por una marcada actividad neurológica y fisiológica, con desconexión perceptiva con el medio ambiente y reducción casi absoluta de la respuesta motora. Por otro lado, las características comportamentales, postura corporal, alerta, umbral a estímulos sensoriales y respuesta motora, varían de una manera cíclica durante cada período del sueño. Muchos de estos cambios pueden ser observados directamente. Sin embargo, el hallazgo de un método no invasivo durante el sueño (polisomnografía), capaz de

analizar la actividad fisiológica cerebral permitió el avance de los estudios. Mediante la disposición de electrodos sobre el cuero cabelludo para la medición de la actividad eléctrica del cerebro, electroencefalograma (EEG), se describieron dos fases distintas fundamentales del sueño, el sueño lento (SL) y el sueño REM (sREM). Cada uno de estos estados del sueño se encuentra definidos por características específicas en la actividad cerebral, el tono muscular y la actividad autonómica, que los hace distinguibles entre sí y con el estado de vigilia (Hobson, 1999b).

1.3.1.1- Arquitectura del sueño

Sueño lento (SL) o no-REM: En humanos, el sueño lento se subdivide en cuatro estadios precisos basados en las características del EEG, aunque arbitrariamente definidos.

El estadio 1 es un período de transición entre la vigilia y el sueño, y se caracteriza por un EEG con actividad rápida y de baja amplitud. Este estadio puede observarse en los individuos despiertos muy relajados o con somnolencia. Hay movimientos oculares lentos y la actividad del EMG se mantiene, aunque disminuida. Luego de algunos minutos en el estadio 1, se alcanza el estadio 2. Este estadio es considerado como el comienzo del sueño real, definido por ondas particulares como los husos del sueño y los complejos K. Los husos de sueño consisten en oscilaciones de 14 - 15 Hz, que ocurren sobre un trasfondo de actividad rápida y de baja amplitud junto a ondas lentas de 3 - 6 Hz. Durante este estadio, estímulos débiles logran despertar fácilmente al individuo. El estadio 3, definido junto con el estadio 4 como sueño lento o de onda lenta, se caracteriza por un EEG con ondas muy lentas sincronizadas de 0,5 - 2 Hz y de gran amplitud. Persisten los husos de sueño y el sueño aquí es de una profundidad intermedia. Finalmente, el estadio 4 se encuentra asociado a grandes ondas lentas de 0,5 - 4,5 Hz, sin la presencia de husos. Este estadio es de sueño profundo, con un elevado umbral para despertar (*Figura 8*).

Durante SL aumenta la actividad del sistema nervioso parasimpático y disminuye la actividad del sistema simpático, provocando una reducción en la tasa metabólica, la frecuencia cardiaca, la frecuencia respiratoria y la presión arterial. Además se produce la activación de determinados sistemas neuroendocrinos. Más del 95 % de la secreción diaria de la hormona de crecimiento, así como las hormonas de maduración sexual, son secretadas por la hipófisis principalmente durante el SL (para revisión ver (Zee y Turek,

1999)).

Sueño REM (sREM): Se define por una serie de características poligráficas de presentación tónica, como la actividad rápida y de baja amplitud desincronizada del EEG, el ritmo theta (ondas de 6 - 9,5 Hz) hipocampal y la atonía muscular, y por fenómenos fásicos como los movimientos oculares rápidos (que confieren el nombre a esta etapa del sueño) y pequeñas contracciones musculares ocasionales. Este estado, denominado sueño REM (*rapid eye movement*: movimiento rápido de ojos), recibe también los nombres de sueño paradójico o desincronizado, debido a que la actividad cerebral durante este estado es alta, semejante al estado de vigilia, pero con una total paralización del cuerpo y una inhibición de estímulos sensoriales. Cambios posturales preceden y siguen cada episodio sREM. El movimiento de los ojos, pequeñas contracciones musculares intermitentes y la erección del pene en primates, caracterizan el estado de sREM. Además, durante este estado, la respiración se torna irregular, y la respuesta a los niveles de oxígeno y dióxido de carbono se modifica. Asimismo, la tasa cardíaca aumenta y se vuelve más variable, mientras que la presión sanguínea muestra picos transitorios. Por otro lado, uno de los aspectos fascinantes del sueño REM es que se encuentra asociado con la actividad onírica (Zee y Turek, 1999).

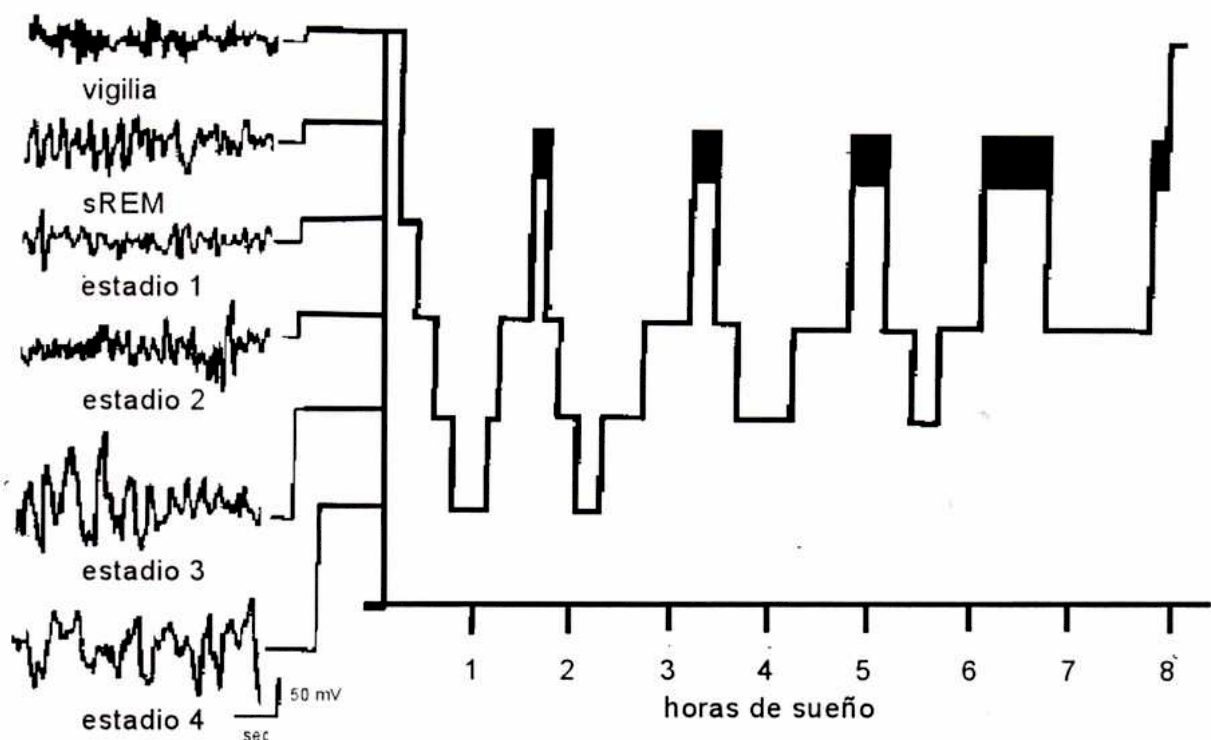


Figura 8: Ejemplo de la organización del sueño en humano durante la noche. A la izquierda, patrones característicos del EEG para cada estado de vigilancia.

En condiciones normales, el sueño comienza con el SL y luego de éste se pasa al sREM. En humanos, el primer episodio de sREM ocurre luego de aproximadamente 70 -100 minutos de SL. A medida que la noche progresa, los episodios de sueño REM incrementan en duración, con cada ciclo sucesivo de aproximadamente 90 minutos, mientras que la duración de los episodios de SL decrece. En consecuencia, la arquitectura normal del sueño en un sujeto adulto joven consiste, aproximadamente, en 4 ciclos alternados de sueño lento y sREM (Hobson, 1999).

1.3.1.2- Sueño en ratas

Las ratas son animales de hábitos nocturnos, con una gran actividad comportamental durante la noche o fase oscura, y mayoritariamente reposo durante el día o fase luminosa (*Figura 9*). Los criterios utilizados para la clasificación de los distintos estados comportamentales de la rata varia entre los distintos autores. Aunque algunos grupos consideran el SL en ratas como un estado más o menos homogéneo, otros estudios sugieren que el SL puede ser subdividido en dos o más estadios. Básicamente (y es el criterio utilizado en este trabajo de investigación) es posible reconocer, en rata, cuatro estados comportamentales distintos: vigilia, SL (incluyendo SL-1 y SL-2 del trabajo de Neckelmann y col.), sueño preREM o de transición y sueño REM (Neckelmann y Ursin, 1993), los cuales comparten en gran medida las características del EEG en humanos. Por otra parte, el análisis de frecuencias, que representa la densidad de potencia medida para cada banda de frecuencia del EEG, permite la caracterización de los estados de vigilancia de acuerdo a frecuencias específicas (*Tabla 4*). Por otro lado, la

tabla 4

Estado de vigilancia	actividad	banda de frecuencias
Sueño lento (SL)	DELTA	0,5 - 4 Hz
	SIGMA	11 - 14 Hz
Sueño REM	THETA	6 - 9,5 Hz
vigilia	THETA	6 - 9,5 Hz

Tabla 4: Actividades y bandas de frecuencias características de los distintos estados del ciclo vigilia-sueño (basado en (Lancel, 1993)).

actividad de onda lenta (0,5 - 4,5 Hz) del EEG en rata, característica del SL, ha sido propuesta como un indicador del nivel de "presión del sueño", ya que aumenta en función del período de vigilia precedente (Borbely y col., 1984), (Lancel, 1993).

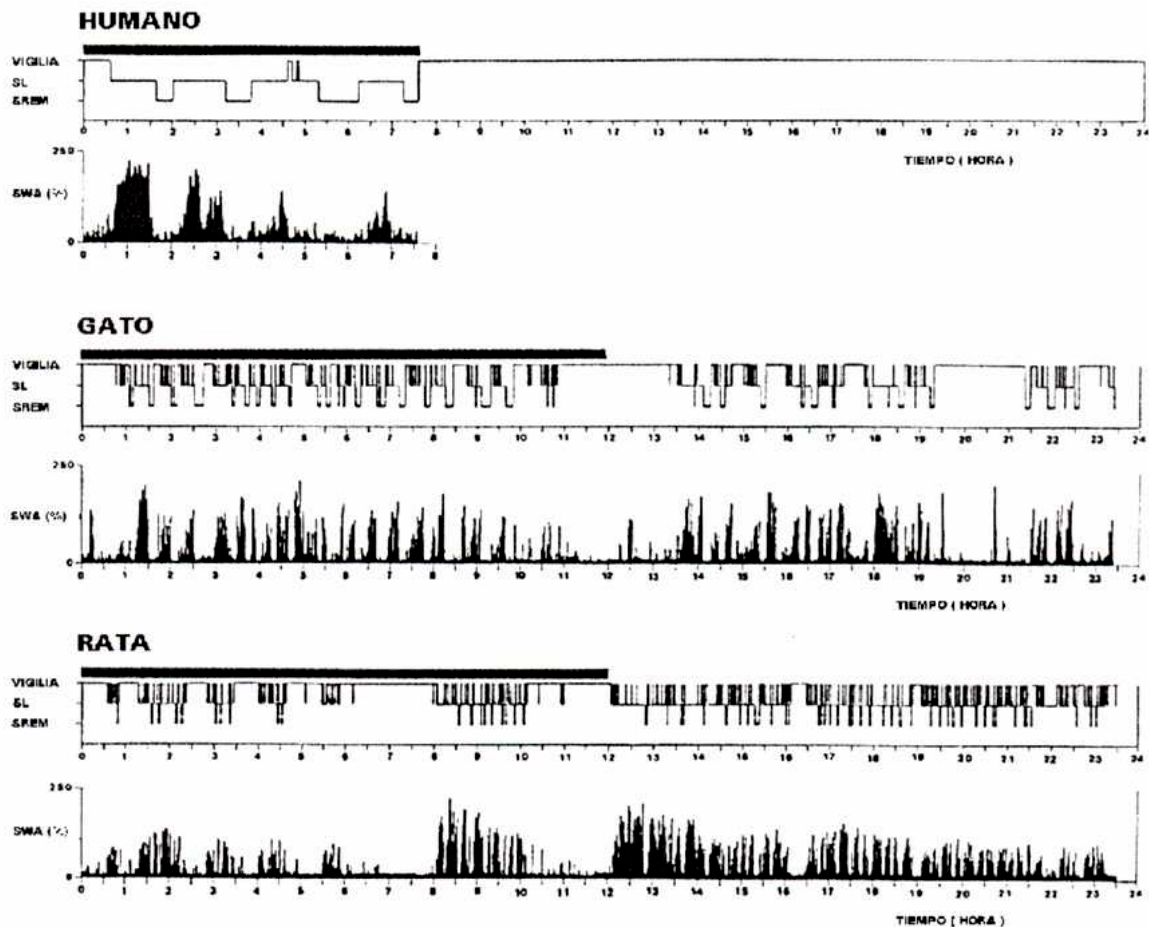


Figura 9: Figura comparativa de la distribución de los estados de vigilia y el curso temporal de la actividad de onda lenta del EEG (SWA, 0,5 - 4,5 Hz) durante el sueño en humano, gato y rata a lo largo de un periodo de 24 horas. La barra negra superior en cada diagrama indica la fase oscura del ciclo luz/oscuridad. Adaptado de Lancel, 1993.

En la rata, los ciclos de vigilia-sueño se presentan con una frecuencia irregular y la repetición de los estados de vigilia carece también de regularidad entre ciclos (Timolaria y col., 1970). Los ciclos pueden ocurrir en forma completa desde el comienzo o empezar con breves episodios de SL seguidos de períodos de vigilia, alcanzándose el sREM solo luego de varios ciclos incompletos. De todas maneras, es posible observar una tendencia opuesta en la duración de SL y sREM a lo largo del día. Así, mientras la

cantidad de sREM aumenta progresivamente, la actividad de onda lenta del SL decrece (Borbely y col., 1984). Por otro lado, la variabilidad en la duración de los estados dentro de un ciclo completo es muy amplia, aunque en promedio el estado de vigilia representaría aproximadamente un 20 % del ciclo, SL un 60 %, sueño preREM un 7 % y sREM alrededor de un 14% (Timo-laria y col., 1970). La duración de cada ciclo completo también varía ampliamente, con un promedio de 16 minutos, aunque ciclos completos de tan solo 3 minutos pueden ser ocasionalmente observados.

1.3.2- Funciones del sueño

La necesidad del sueño y las consecuencias de la privación del mismo son claramente conocidas. Resulta evidente que una inadecuada calidad y cantidad de sueño tiene un profundo impacto en el estado de alerta, y en la performance física y neurofisiológica, así como en la salud del individuo. Sin embargo, no se ha alcanzado aún la completa comprensión de la función del sueño.

El estudio del rol del SL es un área de gran interés, ya que luego de la privación de sueño, la recuperación es caracterizada por un aumento en la actividad de onda lenta durante el SL, así como también un incremento en la cantidad de SL, indicando que este proceso satisface una necesidad fisiológica esencial. Por otro lado, el SL parecería desempeñar un importante rol en la modulación de la actividad del sistema inmune a través del aumento de interleuquinas y del factor de necrosis tumoral (Krueger y col., 1999). Además, la secreción de varias hormonas, como la hormona de crecimiento, prolactina y cortisol están asociadas con el sueño (van Cauter y Spiegel, 1999).

Se han postulado varias teorías sobre la función del sREM, una de ellas incluye el mantenimiento del sistema de catecolaminas en el SNC. Otra teoría es la modulación del comportamiento emotivo, el estado de ánimo y el procesamiento de la información, así como la facilitación del proceso de aprendizaje y memoria (Buzsaki, 1998). Varios trabajos han reportado un aumento en el sREM luego de una tarea de aprendizaje, como también, que la supresión del sREM perjudica la retención (Smith, 1985). También se ha propuesto que durante sREM se "desaprendería" cierta información irrelevante. En apoyo a la teoría del rol de sREM en la consolidación de la memoria en humanos, un estudio sobre una tarea de aprendizaje de percepción indica un mejor perfil o performance en sujetos con una noche de sueño normal, en comparación con sujetos privados de sREM (Karni y col., 1994).

1.3.3- Bases neuronales del sueño

Los primeros pasos en la investigación de las bases neuronales del sueño son los estudios de Bremer en los años 30, en gatos, en los cuales examinó los efectos producidos por las transecciones a distintos niveles en el tronco encefálico sobre la actividad del EEG. Dependiendo del nivel anatómico de la transección, el cerebro aislado siguió mostrando activación electrofisiológica y estado de alerta a pesar de la desconexión de la mayor parte de la entrada sensorial. Sin embargo, W.R. Hess fue quien propuso que el sueño y la vigilia son procesos activos del cerebro. Mediante la técnica de implantación crónica de electrodos intracerebrales en gatos, demostró que la estimulación eléctrica del sistema tálamo-cortical a bajas frecuencias producía todos los signos comportamentales del sueño natural. Mas aún, Moruzzi y Magoun (1949) descubrieron que la formación reticular (FR) desempeña un rol importante en la producción y mantenimiento del estado de vigilia. Estos estudios permitieron iniciar el reconocimiento de las estructuras involucradas en la regulación del ciclo vigilia-sueño (revisión (Hobson, 1999)).

1.3.3.1- Formación reticular y neurotransmisores asociados

La mayoría de los núcleos neuronales que constituyen la FR tienen aferencias específicas y eferencias sumamente organizadas. La FR está conformada por pequeños grupos de neuronas que se proyectan ramificadamente hacia partes distantes del cerebro y de la médula espinal, los cuales pueden ser identificados por su contenido de neurotransmisores específicos.

Las neuronas noradrenérgicas (designadas como los grupos A1 - A7 por Dahlstrom y Fuxe) están localizadas en el tronco y médula dos grupos principales (Dahlstrom y Fuxe, 1964). Uno de ellos es el grupo lateral del tegmento, supuestamente implicado en la regulación hipotalámica y el control motor. De este grupo, la sección más caudal de neuronas (A1 - A3) proyecta hacia el tronco, el hipotálamo y áreas del cerebro anterior, mientras que los grupos rostrales (A5 y A7) proyectan caudalmente hacia el tronco encefálico y la médula espinal. El segundo grupo principal de neuronas noradrenérgicas es el locus coeruleus (LC) (A4 y A6), el cual proyecta caudalmente hacia regiones sensoriales del tronco encefálico y de la médula espinal, como también hacia la corteza cerebelar, el tálamo dorsal y la corteza cerebral.

El otro grupo de núcleos de la FR involucrado en el control de los estados de vigilancia,

son los grupos neuronales que contienen acetilcolina (Ach). Dos grupos de estructuras colinérgicas participan en la regulación del ciclo de vigilia-sueño. El primer grupo consiste en los núcleos pontinos, el núcleo laterodorsal del tegmento (LDT) y el núcleo pedúnculo-pontino (PPT). Las neuronas colinérgicas de estos núcleos proyectan hacia la FR, el hipotálamo, el tálamo y el cerebro anterior basal. El otro grupo de neuronas colinérgicas consiste en el núcleo de la banda diagonal y el complejo sustancia innominata-núcleos de la base, los cuales proyectan hacia áreas límbicas, incluyendo el hipocampo y la neocorteza.

El sistema serotoninérgico fue detallado previamente y su relación con el ciclo de vigilia-sueño será detallada en el apartado 1.3.4.

Al contrario de las neuronas moduladoras que producen noradrenalina (NA), 5-HT y Ach, las neuronas en la FR que están involucradas con la integración sensorial-motor producen típicamente glutamato o bien GABA como neurotransmisores.

Basados en las distintas características y propiedad bioeléctricas de estos dos tipos de neuronas de la FR, las moduladoras y las integradoras, se ha propuesto que estas representarían las bases neuroanatómicas del sueño de cuya interacción recíproca resultaría la alternancia de los estados de SL - sREM.

1.3.3.2- Modelo generalizado del ciclo de vigilia-sueño

La población de neuronas aminérgicas del tronco cerebral contiene "neuronas marcapasos" que descargan eléctricamente a un ritmo espontáneo durante la vigilia y responden a estímulos mediante un aumento de la actividad, mientras que reducen su actividad entre estímulos y al comienzo del sueño. Por el contrario, las neuronas colinérgicas no presentan un ritmo de descargas espontáneas (marcapasos) aunque si responden a los estímulos presentes durante la vigilia. De esta forma, durante la vigilia el cerebro se encuentra con una alta actividad de los sistemas noradrenérgicos y serotoninérgicos, mientras que el sistema colinérgico solo reacciona frente a los estímulos correspondientes. Al comienzo del sueño, la actividad espontánea de las neuronas aminérgicas disminuye y da lugar al desarrollo de los husos de sueño y las ondas lentas características del EEG de SL. A medida que se avanza en el SL, la actividad de los NRD y LC disminuye gradualmente, al mismo tiempo que la actividad de las neuronas colinérgicas comienza a aumentar. Al comienzo del sREM, el sistema aminérgico se encuentra completamente en silencio, mientras que el sistema colinérgico

se encuentra completamente activado. El efecto resultante neto, confirmado por la medición de la actividad neuronal y la liberación de neurotransmisores, es un cambio desde un medio aminérgico durante la vigilia a un medio colinérgico durante el sREM (Hobson, 1999b).

1.3.3.3- Sueño lento

El área indispensable para la aparición de los husos de sueño, característicos del SL, es el núcleo reticular del tálamo, que actúa de marcapasos, haciendo que el sistema tálamo-cortical oscile en esa frecuencia. Las neuronas GABAérgicas del núcleo reticular del tálamo son las que descargan en forma espontánea en la frecuencia de los husos del sueño (Steriade y col., 1993). Neurotransmisores tales como Ach, NA, 5-HT y glutamato provenientes de impulsos ascendentes del tronco del encéfalo pueden modificar la actividad eléctrica de las células talámicas, suprimiendo la generación de los husos. Cuando la inhibición de estas proyecciones ascendentes desaparece, el tálamo pasa a un estado de oscilación rítmica.

Por otro lado, durante el SL aparecen en el EEG las características ondas lentas, dentro de la banda delta (0,5 - 4,5 Hz). Las ondas lentas van reemplazando progresivamente a los husos según se va profundizando el sueño. El elemento fundamental para la expresión de las ondas lentas es la corteza cerebral, especialmente la región orbito-frontal.

Estructuras facilitadoras del SL han sido descriptas en la parte caudal del tronco del encéfalo, entre ellas, el núcleo del tracto solitario, cuya estimulación eléctrica a baja frecuencia produce sincronización del EEG y conducta de sueño. También el LC puede considerarse como un integrante regulador del SL (Steriade y col., 1993).

Las regiones preóptica y del hipotálamo anterior en el proencéfalo basal han sido también implicadas en la generación del SL (Sherin y col., 1996), desempeñando un rol inhibitorio del sistema reticular ascendente, activo durante la vigilia. Por otra parte, en la región preóptica hay neuronas que descargan a la frecuencia delta, en relación con las ondas observadas durante el SL (Gallopin y col., 2000).

1.3.3.4- Sueño REM

Usando técnicas de transección, lesión y estimulación neuronal, el grupo de Jouvet describió que el sistema de control del sREM se encuentra localizado en el tronco

cerebral. La atonía muscular característica del sREM se produce por la suspensión de la descarga de las motoneuronas. La región crítica para la generación de la atonía muscular sería el núcleo locus coeruleus. La lesión bilateral de este núcleo en el gato produce la desaparición de atonía muscular y provoca una conducta motora activa durante el sREM (Jouvet, 1967). Por otro lado, la FR pontina sería la estructura encargada, mediante sus conexiones, de generar los movimientos oculares característicos de sREM. Estudios electrofisiológicos y de microdiálisis, han demostrado un aumento en la neurotransmisión de Ach en los núcleos pontinos (LDT y PPT) durante la vigilia y el sREM. De igual forma, se ha observado un aumento en la liberación de Ach en el tálamo durante el sREM en comparación con el SL, lo que indica que el aumento de Ach endógena sería clave en la inducción fisiológica del sREM en concordancia con el modelo de interacción recíproca propuesto por McCarley y Hobson (McCarley y Hobson, 1975), (Hobson y col., 1975), (Hobson, 1992). Este modelo actualizado propone que las neuronas colinérgicas del LDT y el PPT son desinhibidas por una reducción gradual de la descarga de proyecciones serotoninérgicas y noradrenérgicas provenientes del NRD y el LC, respectivamente, durante el periodo de SL precedente al sREM. Esta desinhibición del LDT y el PPT produce la estimulación de las neuronas de la FR, las cuales, a su vez, generan los eventos característicos del sREM. El reclutamiento de la actividad de las neuronas del LDT y PPT se ve además facilitado por una proyección excitatoria retrógrada de la FR. Esta interacción recíproca da lugar a un proceso de retroalimentación positiva para la generación del sREM. La reducción de la actividad del NRD y el LC durante el sREM podría darse por la autoinhibición de las mismas neuronas de ambos núcleos o bien por una inhibición GABAérgica proveniente de la FR o bien del área preóptica (*Figura 10*) (McCarley y col., 1995).

1.3.4- La serotonina y el ciclo de vigilia-sueño

La serotonina ha sido uno de los primeros neurotransmisores involucrados en la regulación de la fisiología del ciclo de vigilia-sueño. De los primeros estudios realizados en las décadas del 60 y 70, surgieron resultados que permitieron postular a la 5-HT como la responsable de la generación del sueño. Jouvet y col. demostraron que lesiones de los núcleos del rafe en gatos provocaban un prolongado insomnio (10 a 15 días), con una correlación positiva entre el tamaño de la lesión y la pérdida de sueño

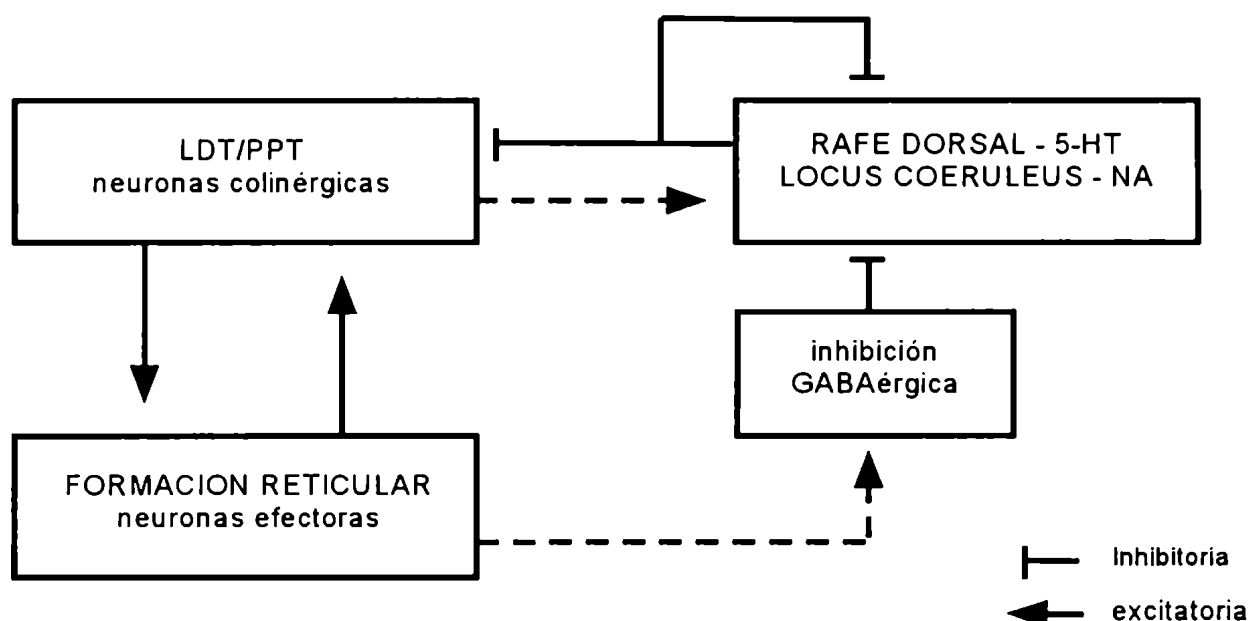


Figura 10: Modelo de interacción recíproca para el control del sREM propuesto por McCarley y col. (McCarley, 1995).

(revisión (Jouvet, 1999)). Además, el bloqueo de la biosíntesis de 5-HT mediante la administración de p-clorofenilalanina (PCPA) en ratas produce una marcada reducción en el SL, mientras que la administración de triptofano restituye el sueño (Borbely y col., 1981). De esta forma, y sobre la base de varios estudios electrofisiológicos y de lesiones específicas en el SNC, surgió la idea de que 5-HT es el neurotransmisor del sueño, el cual induciría el inicio del sueño a través de la inhibición de los centros activadores de la vigilia. Basado en esta idea, Jouvet propuso la teoría monoaminérgica del sueño y la vigilia: 5-HT sería la responsable de la activación del sueño, mientras que las catecolaminas lo serían para la vigilia (Jouvet, 1972).

Sin embargo, varios estudios demostraron un rol más complejo de 5-HT en la regulación del sueño. Las evidencias más contundentes en contra de 5-HT como el neurotransmisor responsable del sueño, fueron las provenientes del estudio de la actividad de descarga eléctrica de las neuronas del rafe. Estas neuronas muestran una mayor actividad celular durante la vigilia, una reducción en la actividad durante el SL y una completa supresión durante el sREM (McGinty y Harper, 1976), (Trulson y Jacobs, 1979), (Puizillout y col., 1979). Estos resultados fueron confirmados mediante estudios de microdiálisis, en los cuales cambios en los niveles extracelulares de 5-HT en el NRD a lo largo del ciclo de vigilia-sueño fueron observados en gatos y ratas (Portas y col.,

1998), (Portas y col., 1996), (Portas y McCarley, 1994). Altos niveles de 5-HT fueron detectados durante la vigilia y una reducción de los mismos durante el SL, siendo esta disminución aun mayor durante el sREM. Por lo tanto, la actividad neuronal y la liberación de 5-HT en el NRD estarían activamente moduladas tanto durante los estados del sueño como durante la vigilia. Como se mencionó anteriormente, las neuronas serotoninérgicas del rafe presentan, además de los autorreceptores de 5-HT, receptores de dopamina, GABA, NA y de neuropéptidos (Jacobs y Azmitia, 1992). Por lo tanto, proyecciones provenientes del tronco cerebral o del área preóptica ventrolateral conteniendo dichos neurotransmisores regularían la actividad neuronal del NRD.

Por otro lado, la descripción de la amplia familia de receptores de 5-HT explicaría los diversos efectos experimentales de 5-HT sobre el sueño y la vigilia. Por ejemplo, la administración sistémica de un agonista del receptor de 5-HT_{1A} aumenta el estado de vigilia, mientras que la administración local de la misma droga en el NRD incrementa el sREM, indicando así, que los diferentes efectos de la manipulación del sistema serotoninérgico dependerían de la participación diferencial de receptores pre- y postsinápticos (Portas y col., 2000).

1.3.4.1- El sueño y la neurotransmisión serotoninérgica hipocampal

La relación entre los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo y el estado comportamental ha sido descripta en ratas y ratones por Linthorst y col. (Linthorst y col., 1995), (Linthorst y col., 1994), (Linthorst y col., 2000). Estos trabajos señalan un mayor nivel de 5-HT hipocampal durante un comportamiento activo del animal en comparación con el estado de reposo.

Por otro lado, en varias especies de mamíferos no primates el hipocampo es la base neuroanatómica generadora de la actividad theta de la corteza que ocurre durante comportamientos específicos, como ser la atención, la actividad exploratoria, etc., cuando el animal se encuentra despierto, así como también durante el sREM. Se ha propuesto la presencia de al menos dos generadores de la actividad theta del hipocampo, uno localizado en la región de las células piramidales del área CA1, dependiente de señales colinérgicas y serotoninérgicas, y un segundo núcleo localizado en el stratum moleculare del giro dentado, dependiente principalmente de señales colinérgicas (Leung, 1998). Así, la 5-HT poseería un efecto inhibitorio sobre los generadores hipocampales de la actividad theta (Marrosu y col., 1996), lo que estaría

de acuerdo con el aumento de la actividad theta durante el sREM, cuando las neuronas serotoninérgicas del rafe se encuentran prácticamente en silencio. Por lo tanto, la actividad theta observada durante la vigilia se debería a activaciones colinérgicas. Por otra parte, se ha sugerido también la posibilidad de que solamente un pequeño grupo específico de neuronas serotoninérgicas modula la actividad theta hipocampal. Una subpoblación de neuronas serotoninérgicas que presentan una reducida actividad durante la vigilia, ha sido identificada en el NRD, mostrando, además, actividad en la frecuencia theta (Veasey y col., 1997). Desde esta perspectiva, 5-HT modularía la actividad theta durante la vigilia y el sREM.

1.3.5- El sueño y la depresión mayor

Los pacientes con depresión mayor presentan trastornos en el sueño, los cuales son prominentes durante los episodios agudos, aunque pueden continuar durante el período de remisión. Aproximadamente las dos terceras partes de los pacientes con depresión presentan algún tipo de insomnio, como dificultad en dormirse, despertar frecuentemente durante la noche, despertar temprano por la mañana, y además, una marcada fatiga durante el día. Por el contrario, aproximadamente un 15 % de los pacientes se quejan de un exceso de sueño, principalmente aquellos con depresión bipolar que experimentan el período depresivo.

Estudios polisomnográficos realizados en pacientes depresivos señalaron cuatro anomalías generales:

- *perdida de la continuidad del sueño*: comparado con sujetos controles de la misma edad, los pacientes con depresión muestran una prolongada latencia en el inicio del sueño, un aumento del número de veces que se despierta durante la noche, un despertar temprano por la mañana, y una disminución en la eficacia y el tiempo total de sueño.
- *disminución del sueño lento*: los pacientes depresivos presentan una reducción del porcentaje de SL con respecto al sueño total, una disminución de la amplitud en el espectro de potencia de la actividad delta.
- *aumento del sueño REM*: caracterizado por un aumento en el porcentaje de sREM, y un incremento de los movimientos oculares durante sREM.
- *alteraciones en las características temporales del sueño*: tales como la aparición temprana del sREM (reducción de la latencia del sREM) y el aumento en la duración del

primer período de sREM.

De todos los parámetros señalados, la reducción en la latencia del sREM es considerada como un posible marcador para el diagnóstico de la depresión mayor. Sin embargo, no todos los trastornos mencionados se presentan en todos los pacientes depresivos (Kaplan y col., 1994), (Benca, 1996). La variabilidad en la sintomatología estaría, a su vez, influida por la edad, sexo y el subtipo de depresión.

Como se mencionó previamente, varias de las drogas antidepresivas producen un aumento en los niveles de la transmisión monoaminérgica en el SNC. Debido a la importancia de los sistemas monoaminérgicos del tronco encefálico en la regulación del sREM, varios agentes antidepresivos producen marcados efectos en la arquitectura del sueño. Los efectos más evidentes son la supresión del sREM, que incluye la prolongación de su latencia y la reducción del tiempo total en sREM.

Varias teorías y modelos han sido desarrollados para la explicación de los trastornos presentes en el sueño de pacientes depresivos, aunque ninguno de ellos logra explicar totalmente las observaciones clínicas. Se ha propuesto que los desórdenes depresivos se originarían por un aumento relativo en la actividad del sistema colinérgico comparado con el aminérgico, ya que Ach está involucrada en la inducción del sREM y la inhibición del SL. Otros mecanismos propuestos incluyen un aumento en la presión del sREM, una deficiencia en el proceso homeostático del sueño, o un adelanto en la fase del ciclo del sueño (Benca, 1996), (Buysse y col., 1999).

1.3.6- Privación del sueño

La privación del sueño es utilizada frecuentemente como una metodología para el estudio de la regulación del sueño. Estudios en humanos y animales de experimentación, demostraron que la privación de sueño por 24 horas provoca un aumento en la amplitud de las ondas lentas (actividad delta) en el SL durante el período de recuperación, que puede estar acompañado por un incremento en el sREM. Sin embargo, los efectos de la supresión del sueño diferirían de acuerdo al método o manipulación del animal utilizado, su condición estresante, el período total de vigilia forzada y la selectividad de la privación (Rechtschaffen y col., 1999), (Garcia-Garcia y col., 1998). Por otro lado, se observó en gatos, que la recuperación de los estados del sueño varía dependiendo de la fase del ciclo luz-oscuridad en que se llevo a cabo el procedimiento de privación del sueño (Lancel y col., 1991). No obstante, el aumento de

la duración total del sueño luego de la privación del mismo es asumido como una regulación homeostática del sueño y representa una compensación del sueño perdido. Por otro lado, la ausencia de sueño por una noche es una situación experimentada por todos. Sujetos normales que son privados del sueño presentan fatiga y deterioro cognitivo. Por el contrario, la privación total o parcial del sueño por una noche puede producir efectos antidepresivos en pacientes con depresión mayor. Aproximadamente un 60% de los pacientes depresivos muestran una respuesta transitoria a los efectos antidepresivos de una noche de vigilia forzada. Dicho efecto consiste en alrededor de un 30 % de mejora en la sintomatología, la cual comienza a observarse durante las primeras horas de la mañana (Kuhs y Tolle, 1991), (Wirz-Justice y Van den Hoofdakker, 1999). Por el contrario, en pacientes con depresión bipolar la privación de sueño precipita frecuentemente los episodios de manía. Sin embargo, el punto débil de la privación del sueño como una herramienta terapéutica antidepresiva es que luego del subsiguiente período de sueño, ya sea como siesta o durante la noche siguiente, se produce una recaída en la sintomatología. Los efectos de la supresión selectiva del sREM en pacientes depresivos también resulta en una mejora clínica y sus efectos son aparentemente más prolongados. Varios estudios han sugerido el tratamiento conjunto de privación parcial de sueño en serie con drogas antidepresivas, lo cual ayudaría a un efecto antidepresivo persistente (Buysse y col., 1999), (Benca, 1996).

Es interesante destacar que estudios en animales demostraron efectos de la privación del sueño sobre distintos sistemas de neurotransmisores (Demet y col., 1999). Así, en gatos, la actividad celular de las neuronas serotoninérgicas del NRD aumenta durante el período de vigilia forzada (Gardner y col., 1997), mientras que, en ratas, se observó que la privación de sueño produce una reducción del efecto inhibitorio de las drogas que bloquean la recaptación de 5-HT sobre la actividad eléctrica de las neuronas del NRD, lo cual indica cambios en los niveles de los autorreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos (Maudhuit y col., 1996), (Prevot y col., 1996).

1.4- Resumen

En las diferentes secciones presentadas en esta introducción se señala que:

- La 5-HT participa en la regulación de un amplio rango de procesos fisiológicos y comportamentales mediante la acción sobre su vasta familia de receptores.
- Las alteraciones en la neurotransmisión serotoninérgica han sido implicadas en desórdenes psiquiátricos asociados a estrés, como la depresión mayor.
- La CRH es un factor importante en la regulación e integración de las respuestas endocrinas, autonómicas, inmunes y comportamentales al estrés. Ucn, un péptido de la familia de la CRH, recientemente descubierto, también participa en dichas funciones aunque su rol en el SNC no ha sido aún establecido.
- Las funciones de CRH y Ucn son mediadas por dos tipos de receptores CRH-R1 y CRH-R2, los cuales tendrían una participación diferencial en la modulación de las acciones de ambos neuropéptidos.
- Una disfunción del eje HPA, representada por una hipersecreción de CRH y/o alteraciones en la expresión de los receptores de CRH y glucocorticoides, ha sido involucrada en el desarrollo y curso de la depresión mayor.
- Las áreas proencefálicas y del tronco cerebral participan en la generación y la modulación del sueño lento y el sueño REM.
- Los trastornos en el sueño forman parte de la sintomatología de la depresión mayor. La privación total o parcial del sueño ha demostrado tener efectos antidepresivos en pacientes con depresión mayor.

2- OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

Basados en la hipótesis de la existencia de una interacción entre los sistemas de CRH y de neurotransmisión serotoninérgica, y la presunción de que dicha interacción podría tener implicancias en la disfunción de estos sistemas, así como también, en trastornos del sueño asociados con la depresión mayor, los objetivos generales planteados en el presente trabajo de tesis fueron los siguientes:

1. Caracterizar la interacción entre la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo y el sistema central de CRH.
2. Establecer la relación entre la neurotransmisión de serotonina en el hipocampo y los estados comportamentales de vigilia-sueño, y los efectos de la privación de sueño sobre la misma.

2.1- Modelo experimental

Para llevar a cabo los objetivos planteados se utilizaron como modelos experimentales ratas y ratones implantados con una sonda de microdiálisis en el hipocampo, técnica que permitió estudiar simultáneamente el curso temporal de las respuestas de la neurotransmisión serotoninérgica, endocrina y comportamental en animales con libre movimiento en sus propias jaulas. Para el estudio de los efectos de la disfunción del receptor de CRH tipo 1, se utilizaron ratones deficientes del gen del CRH-R1. En tanto que ratas implantadas simultáneamente con electrodos para el registro de las señales del EEG/EMG y temperatura cerebral, mas una sonda de microdiálisis en el hipotálamo, fueron utilizadas para el estudio de la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo y los estados de vigilancia del animal.

2.2- Objetivos específicos

- 1- Caracterizar los efectos de CRH y Ucn sobre la neurotransmisión de 5-HT hipocampal y su metabolito 5-HIAA, en ratas.
- 2- Estudiar la acción de CRH y Ucn sobre la activación del eje HPA mediante la

- determinación de los niveles centrales de corticosterona libre en ratas.
- 3- Establecer los efectos de CRH y Ucn sobre la actividad comportamental en ratas.
 - 4- Analizar los efectos de CRH y Ucn sobre la expresión de c-fos en el SNC de la rata como un parámetro de la activación neuronal.
 - 5- Determinar los efectos de la adrenalectomía sobre los cambios producidos por CRH en los niveles de la 5-HT y el 5-HIAA hipocampal y en el comportamiento en ratas.
 - 6- Estudiar los efectos de la deficiencia del gen del CRH-R1, en ratones, sobre la neurotransmisión de 5-HT hipocampal, 5-HIAA, activación del eje HPA y comportamiento en condiciones basales.
 - 7- Analizar los efectos de la deficiencia del CRH-R1 en ratones, sobre los cambios en los niveles extracelulares de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo y la actividad comportamental en respuesta al estrés por natación forzada.
 - 8- Establecer un método para la medición de neurotransmisores y electroencefalografía (EEG) simultánea: método combinado de microdiálisis/EEG in vivo en ratas.
 - 9- Estudiar la relación entre la 5-HT hipocampal y el ciclo de vigilia-sueño en ratas.
 - 10- Analizar los efectos de la privación de sueño sobre la neurotransmisión de 5-HT en el hipocampo y la activación del eje HPA en ratas.

3- MATERIALES Y METODOS

3.1- Animales

En el presente trabajo se utilizaron ratas machos Wistar, adquiridos en Charles Rivier Wiga (Sulzfeld, Alemania). Las ratas fueron mantenidas en un número de cuatro por jaula bajo condiciones estándar de luz, temperatura (22-23°C) y humedad (40-60%). El ciclo de luz-oscuridad fue de 12:12 horas, con las luces encendidas a partir de las 7:30 horas. El alimento y el agua fueron disponibles *ad libitum*. Luego de cuatro días del arribo de los animales y de la adaptación de estos al nuevo entorno, cada una de las ratas comenzó a ser manipulada (handling) diariamente por un período de cinco minutos. Esta manipulación se llevó a cabo hasta el día del experimento y de esta forma se buscó adaptar al animal al contacto con el experimentador y evitar así durante el experimento, la influencia de un entorno extraño en los resultados. Los animales presentaron un peso entre los 210 - 240 gramos al momento de la operación.

Los ratones deficientes del gen del receptor de CRH tipo 1 (CRH-R1) fueron desarrollados y criados en el bioterio del Instituto Max Plack de Psiquiatría, Munich, Alemania (Timpl y col., 1998). Esta cepa de ratones fue establecida mediante la eliminación de las secuencias codificadoras de las regiones transmembrana V, VI y VII, del dominio para el acople a la proteína G y de la parte final citoplasmática del gen del CRH-R1, por lo tanto, la ausencia de esta región provoca un receptor no funcional (Timpl y col., 1998). Para obtener la progenie F1, se cruzaron quimeras con ratones de las cepas 129/Ola y CD1. De la cruce de los híbridos F1 se obtuvieron ratones homocigotas (-/-) y heterocigotas (-/+) del receptor suprimido, así como también ratones de cepa salvajes (+/+). Estos animales, que constituyen la filial F2, fueron los utilizados para llevar a cabo los experimentos. El genotipo de cada animal fue determinado mediante el análisis de la presencia o ausencia de fragmentos de restricción del ADN (ácido desoxiribonucleico) específicos utilizando la técnica de Southern-blot (Timpl y col., 1998). Los ratones fueron mantenidos en un número de seis por jaula bajo condiciones estándar de luz, temperatura y humedad, y con libre acceso al alimento y al agua. El ciclo de luz-oscuridad fue de 12:12 horas, con luz desde las 6:00 horas. Al momento de la cirugía los animales tenían entre 12 -16 semanas de vida y contaban con un peso corporal de aproximadamente 38 gramos. Luego de la operación los

animales fueron transportados al cuarto experimental, con condiciones similares a las del bioterio. Para poder estudiar el comportamiento nocturno del animal, tres luces rojas (20 - 30 lux) fueron encendidas diariamente en el cuarto experimental durante la fase oscura del ciclo luz - oscuridad.

3.2- Cirugías

Todas las cirugías fueron llevadas a cabo con halotano como anestésico general (2-4% vol.; Hoechst, Francfort, Alemania), administrado a través de una máscara fijada a la barra incisal, y la administración s.c. de atropina (0,05 ml/100 gramos peso de una dilución 5%; Braun, Melsungen, Alemania). Los animales anestesiados fueron colocados en un aparato estereotáxico (Stoelting, Woodale, Illinois, EE.UU.), con una barra incisal específica para ratones o ratas, según el caso correspondiente, situada a -3,3 mm para las ratas y a 0 mm para los ratones. A través de una pequeña incisión en la piel, la superficie del cráneo fue expuesta y el bregma localizado. Las coordenadas fueron determinadas de acuerdo al atlas de Paxinos & Watson (Paxinos y Watson, 1982) para ratas y Franklin & Paxinos (Franklin y Paxinos, 1997) para ratón. El bregma fue considerado como cero absoluto.

Luego de la cirugía los animales fueron alojados individualmente en jaulas especiales de plexiglás transparente (largo x ancho x alto = 25 x 25 x 35 cm) con orificios en las paredes que permite a los animales ver, oír y olerse unos a otros. El alimento y el agua fueron disponibles *ad libitum*.

3.2.1- Implantación de cánulas-guías para la inyección intracerebroventricular (i.c.v.) y para microdiálisis

Las cánulas-guías para i.c.v. fueron construidas a partir de una sonda de polietileno con un diámetro interno y externo de 0,4 y 0,8 mm respectivamente, y con una longitud total de 12 mm (con una muesca sobresaliente a los 4 mm, utilizada como tope durante la implantación). Las cánulas fueron bloqueadas por un vástago de acero inoxidable de la misma longitud, el cual fue removido sólo en el momento de la inyección.

Para la implantación de la cánula-guía dentro del ventrículo lateral izquierdo se escogieron, de acuerdo al atlas de Paxinos & Watson, las siguientes coordenadas: A: -0,3 mm; L: 1,4 mm. Un orificio fue taladrado en el cráneo para permitir la implantación de la cánula, introduciéndose la misma 4 mm por debajo de la superficie del cráneo

(Brakkee y col., 1979).

Para los experimentos donde se utilizó la técnica de microdiálisis, una cánula-guía para la sonda de microdiálisis (CMA/12, CMA/Microdialysis, Estocolmo, Suecia) fue implantada sobre el hipocampo dorsal. Las coordenadas escogidas según el atlas de Paxinos & Watson fueron: A: -5,2 mm; L: -5,0 mm; V: -4,0 mm (Linthorst y col., 1995). Correspondientes vástagos (CMA/12) bloquearon las cánulas hasta el momento de la implantación de la sonda, durante el día experimental 0. La sonda de microdiálisis fue introducida a través de la cánula-guía, con la membrana de microdiálisis (4 mm de longitud) por debajo del extremo inferior de la cánula, quedando así localizada en el hipocampo ventrolateral.

Ambas cánulas, para microdiálisis e inyección i.c.v., fueron fijadas al cráneo mediante cuatro tornillos y acrílico dental (Paladur, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemania).

3.2.2- Implantación de una cánula-guía para microdiálisis en ratón

Los animales fueron implantados con una cánula-guía de acero inoxidable de 0,4 mm y 0,7 mm de diámetro interno y externo respectivamente, y con una longitud de 14 mm según se describió previamente (Linthorst y col., 1995). La cánula fue ubicada sobre el hipocampo dorsal usando las coordenadas: A: -2,5 mm; L: 3,4 mm; V: 2,4 mm. Además, una pequeña clavija fue adherida al cráneo para permitir la conexión del animal al sistema de articulación giratoria para líquidos para microdiálisis. Tanto la cánula-guía como la clavija fueron inicialmente fijadas al cráneo mediante una gota de pegamento instantáneo, seguido luego de acrílico dental. La herida fue suturada con hilo quirúrgico.

3.2.3- Implantación de cánula-guía para microdiálisis y electrodos para el registro de EEG/EMG/T_{cer}

La cánula-guía para la sonda de microdiálisis fue implantada según se detalló previamente. Al mismo tiempo, las ratas fueron implantadas con cuatro tornillos (3 mm de largo y 0,8 mm de diámetro; Schrauben Preisinger, Alemania) para el registro epidural del electroencefalograma (EEG) según fue descrito por Lancel y col. (Lancel y col., 1995). La posición de los electrodos fue la siguiente: corteza frontal: A: 3,9 mm; L: ± 2 mm; corteza occipital: A: -6,4 mm; L: 4 mm y A: -7,4 mm, L: -3 mm). Dos tornillos-electrodos fueron insertados dentro de la musculatura del cuello del animal para el registro del electromiograma (EMG). Para registrar la temperatura cerebral (T_{cer}), un termistor (10K 3 MCD 1, resistencia a 25°C = 10k Ω , 0,457 mm de diámetro, 3,18 mm

de largo, Betatherm Thermistors, Galway, Irlanda) fue colocado entre el cráneo y la duramadre. Los tornillos-electrodos fueron conectados a un enchufe con 8 entradas (largo x ancho x alto = 8 x 2 x 4,5 mm) mediante alambre aislado (longitud: 17 y 24 mm para los electrodos de EEG y EMG respectivamente) (*Figura 11*). El termistor también fue conectado al enchufe, el cual fue fijado al cráneo con un tornillo adicional yacrílico dental junto a los electrodos y la cánula-guía para microdiálisis.

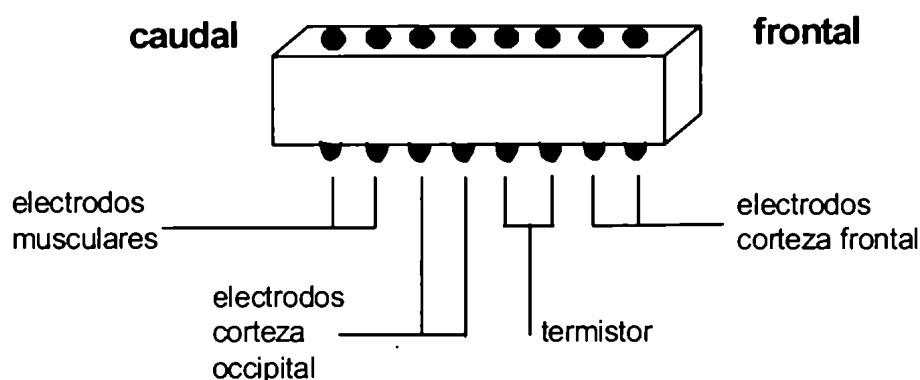


Figura 11: esquema del enchufe y electrodo para el registro de las señales de EEG/EMG y Tcer.

3.2.4 - Adrenalectomía

Las ratas fueron adrenalectomizadas (ADX) bilateralmente con el fin de eliminar la presencia de corticosterona endógena. Los animales controles fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico pero sin la extracción de las glándulas adrenales. Luego de la adrenalectomía los animales fueron mantenidos con 0,9 % de NaCl disuelto en agua corriente como bebida, para evitar una descompensación en el equilibrio salino sodio-potasio de los fluidos extracelulares como consecuencia de la falta de aldosterona. Para verificar la correcta y completa extirpación de las glándulas adrenales, el nivel de corticosterona plasmática fue determinado al finalizar el experimento. Los niveles de dicha hormona fueron medidos mediante un radioinmunoensayo, como se detalla más adelante. No se encontraron niveles detectables de la hormona en ninguno de los animales adrenalectomizados.

3.3- Técnicas

3.3.1- Técnica de microdiálisis

3.3.1.1- Principio teórico

La técnica de microdiálisis permite el estudio bioquímico del medio extracelular de tejidos en organismos vivos. En el cerebro, la técnica de microdiálisis ofrece la posibilidad de detectar los eventos químicos que ocurren en un área específica.

La sonda de microdiálisis está diseñada imitando al principio funcional de los capilares sanguíneos, presentando por lo general un sistema de doble cánulas para la entrada y salida del fluido de perfusión y una membrana semipermeable en su extremo (*Figura 12*) (Ungerstedt, 1991). Las propiedades físicas de la membrana semipermeable permite la libre difusión de pequeñas moléculas a través de sus poros debido a un gradiente de concentración entre ambos lados de la membrana (diálisis). Por lo tanto, cuando una solución salina fisiológica es perfundida lentamente a través de la sonda de microdiálisis, la solución se equilibrará con el líquido extracelular circundante a la membrana e incluirá de esta forma una proporción representativa del contenido molecular del fluido extracelular. Debido al límite de difusión de la membrana (5.000 - 20.000 Da), es posible recolectar solo pequeñas moléculas (por ejemplo 5-HT, cuyo peso molecular es de 176 Da), dejando en el medio extracelular a las proteínas y enzimas esenciales para la integridad celular. Por otro lado, la tasa de recuperación de una molécula (definida como la concentración obtenida en el dializado dividida por la concentración en la solución test) no solo depende del límite de difusión de la membrana, sino también de la superficie total de la misma, de la velocidad de flujo del fluido de perfusión y del coeficiente de difusión de la sustancia. Este principio de difusión a través de una membrana semipermeable es, a su vez, válido para la administración de sustancias, como drogas, desde el fluido de perfusión al medio extracelular, permitiendo así una administración farmacológica localizada.

3.3.1.2- Sistema de microdiálisis

Debido a los diferentes requisitos y condiciones de los distintos experimentos presentados en este trabajo, el sistema de microdiálisis debió ser adaptado para cada uno de ellos. Las características específicas de los sistemas de microdiálisis utilizados para los experimentos de administración i.c.v., de registro simultáneo de EEG/EMG/T_{cer}, y de microdiálisis en ratón, se detallan en los apartados correspondientes a cada

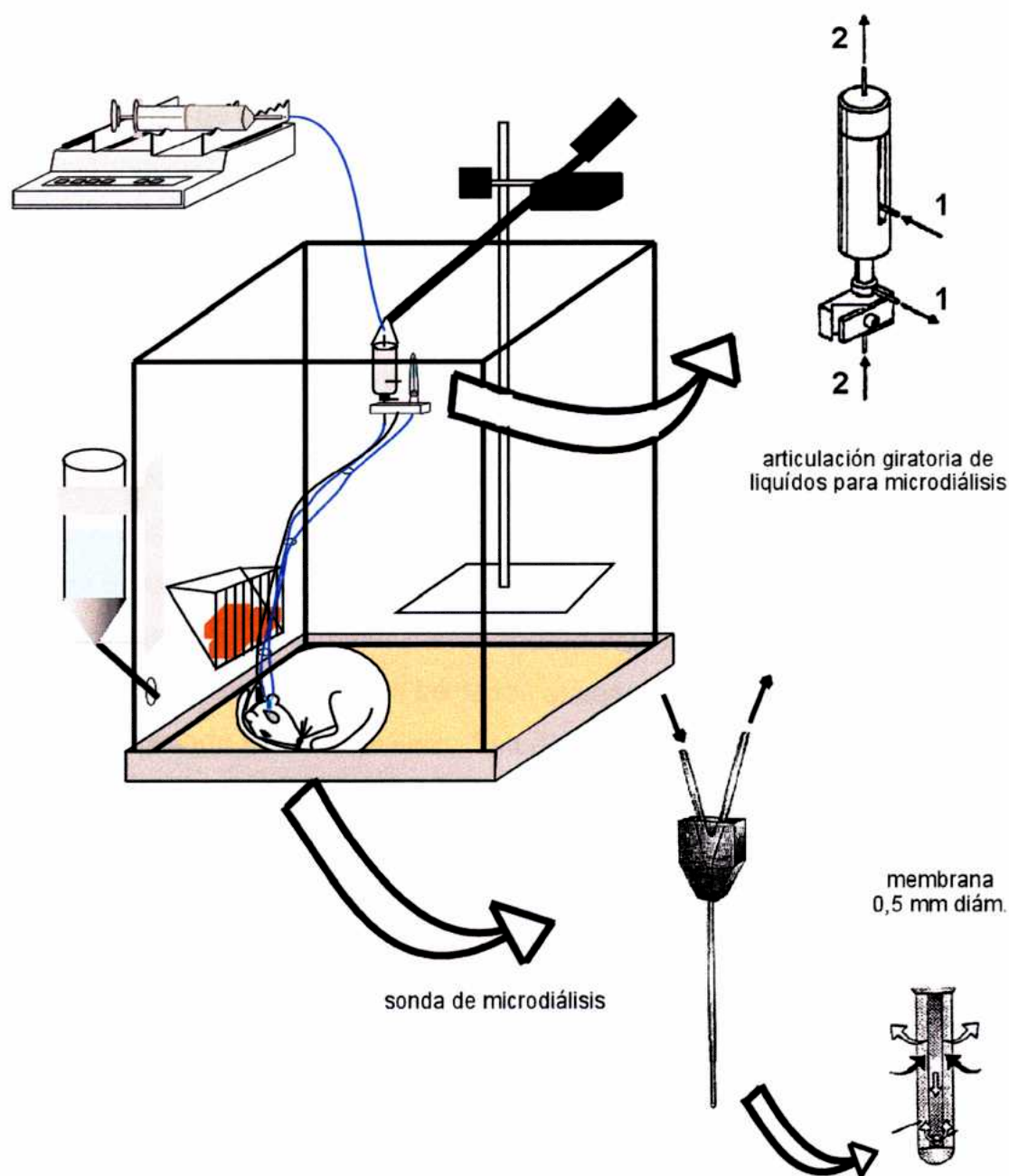


Figura 12: Esquema del sistema de microdiálisis para ratas. Detalle del sistema de articulación giratoria para líquidos para microdiálisis (figura tomada de Instech) y de la sonda y membrana de microdiálisis (figura tomada de CMA).

experimento. Sin embargo, la configuración general del sistema fue mantenida y es la que se detalla a continuación (*Figura 12*).

Se utilizaron sondas de microdiálisis CMA/12 para ratas (membrana de policarbonato, 4 mm de longitud, 0,5 mm de diámetro externo y un límite de difusión de 20.000 Da) y

CMA/11 para ratones (membrana de cuprofano, 3 mm de longitud y 0,24 mm de diámetro externo, con un límite de difusión de 6.000 Da) (CMA/Microdialysis, Estocolmo, Suecia). Las sondas fueron conectadas mediante tubos FEP (polímero de fluoretileno, volumen muerto: 1,2 µl/100 mm; CMA/Microdialysis, Estocolmo, Suecia) al sistema de doble canal (ratas) o de un canal (ratones) de la articulación giratoria para líquidos para microdiálisis (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, EE.UU.). Este sistema fue adosado a un brazo móvil unidireccional para ratas (CMA/Microdialysis, Estocolmo, Suecia), bidireccional para ratones (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, EE.UU.) o a un conmutador especial para el estudio de vigilia-sueño (ver mas adelante). Estas configuraciones permitieron el libre y normal movimiento del animal durante su conexión al sistema de microdiálisis. Todo el sistema de microdiálisis fue perfundido en forma constante con solución Ringer estéril y libre de pirógenos (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2,25 mM CaCl₂; Delta Pharma, Pfullingen, Alemania) con un flujo de 2 µl/min, mediante una bomba de microperfusión (CMA/Microdialysis, Estocolmo, Suecia). Para la inserción de la sonda, los animales fueron ligeramente anestesiados con halotano (3-5 minutos). Los experimentos fueron iniciados al segundo día (40-45 horas) luego de la inserción de la sonda de microdiálisis. Estudios previos demostraron que luego de este tiempo los niveles de 5-HT se encuentran en equilibrio y reflejan un 90-95% de la liberación neuronal (Linthorst y col., 1994). Muestras del dializado fueron recogidas manualmente o mediante un recolector automático refrigerado (Univentor 820, Malta) en pequeños tubos (300 µl de volumen, Axel Semrau, Sprockhövel, Alemania). En los experimentos de administración i.c.v. en ratas y de microdiálisis en ratones, una alícuota de 35 µl fue separada de cada muestra de dializado para la posterior medición de los niveles de corticosterona, mientras que al resto del dializado se le agregó ácido acético (concentración final 0,01 M) para su estabilización. Las muestras fueron medidas directamente o almacenadas a -80°C hasta la medición de serotonina, 5-HIAA o corticosterona mediante el correspondiente ensayo. El almacenamiento a -80°C no presentó efectos adversos sobre ninguna de las sustancias estudiadas. Estudios previos *in vitro* demostraron una tasa de recuperación (a 37 °C) para CMA/12 y CMA/11 de aproximadamente 40 % y 12,5 % respectivamente, para 5-HT, 5-HIAA y corticosterona indistintamente (Reul y col., 2000a).

3.3.2- Técnica de registro de EEG/EMG y clasificación de los estados de vigilancia

3.3.2.1- Estados de vigilancia

Basados en el registro de la actividad eléctrica de la corteza cerebral y de la actividad bioeléctrica muscular, y de sus características distintivas para cada uno de los estados de vigilancia, se clasificaron 4 distintos estados de vigilancia: vigilia, sueño lento (SL), fase de transición (preREM) y sueño REM. En la rata los ciclos de vigilia-sueño se presentan con una frecuencia irregular, pudiendo aparecer el ciclo completo (vigilia - SL - preREM - REM) al comienzo de la fase luminosa, o bien, breves períodos de SL seguidos de episodios de vigilia, alcanzando la fase del sueño REM recién luego de varios ciclos incompletos. La duración de cada estado de vigilancia varió entre animales y a lo largo del día, siendo la fase de sueño REM la de menor duración total, llegando muy ocasionalmente a episodios de 3 minutos de duración durante la primer parte del día. Es por esta razón que durante el estudio de la relación entre los niveles de serotonina en el hipocampo y los estados de vigilancia de la rata, se buscó reducir al mínimo posible la duración de las muestras de microdiálisis.

Los distintos estados de vigilancia fueron clasificados según el criterio propuesto por Neckelmann y Ursin (Neckelmann y Ursin, 1993), considerando las siguientes características:

Vigilia: predomina una actividad rápida, irregular y de bajo voltaje. Además, con clara presencia de actividad muscular (*Figura 13*).

Sueño lento: caracterizado por un destacado aumento en la amplitud, incremento de la actividad de ondas lentas (0,5 - 4,5 Hz) y por la presencia de husos de sueño, además de una marcada reducción de actividad en el EMG (*Figura 14*).

Sueño REM: predomina una actividad de EEG rápida y de bajo voltaje similar a la observada durante la vigilia, un aumento de la frecuencia theta (6 - 9,5 Hz) y una completa atonía muscular (*Figura 15*).

Sueño preREM: estado de transición entre el sueño lento y el sueño REM, caracterizado por la predominante presencia de husos de sueño de alta amplitud alternados con ondas theta.

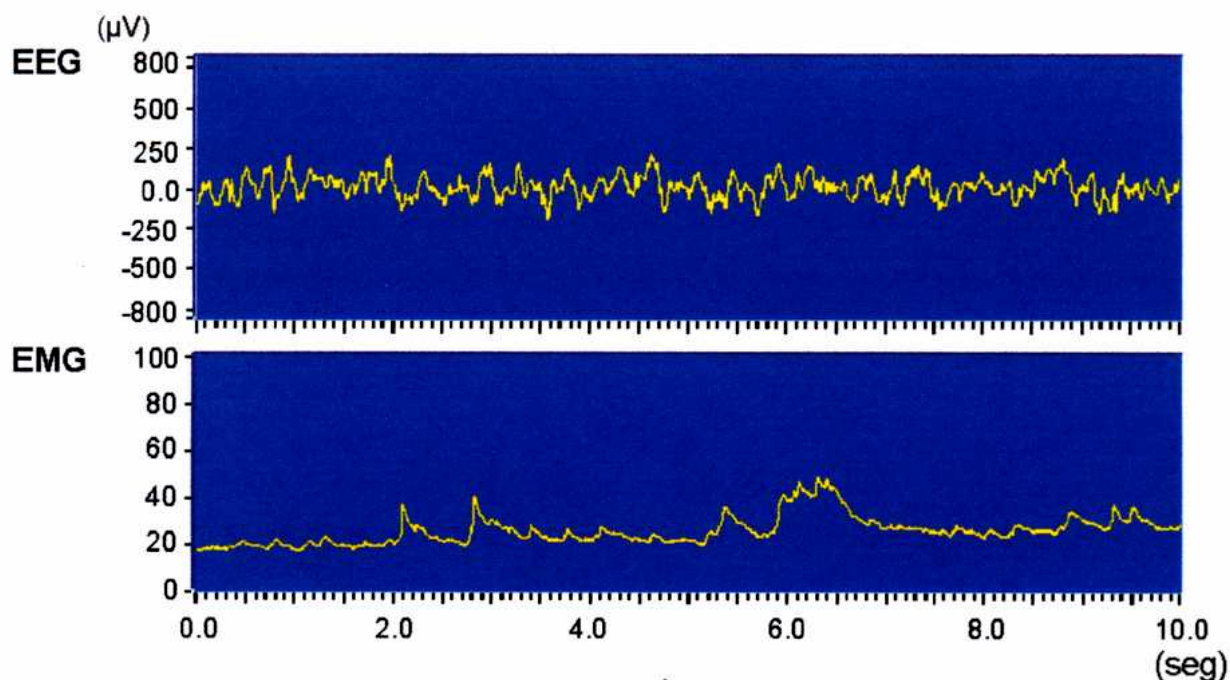


Figura 13: Ejemplo de un registro de EEG/EMG característico del estado de vigilia en ratas. Animales implantados con 4 electrodos para el registro epidural del EEG y 2 electrodos para en la musculatura del cuello para el seguimiento del EMG fueron utilizados. Detalles del registro de las señales se detallan en el apartado correspondiente.

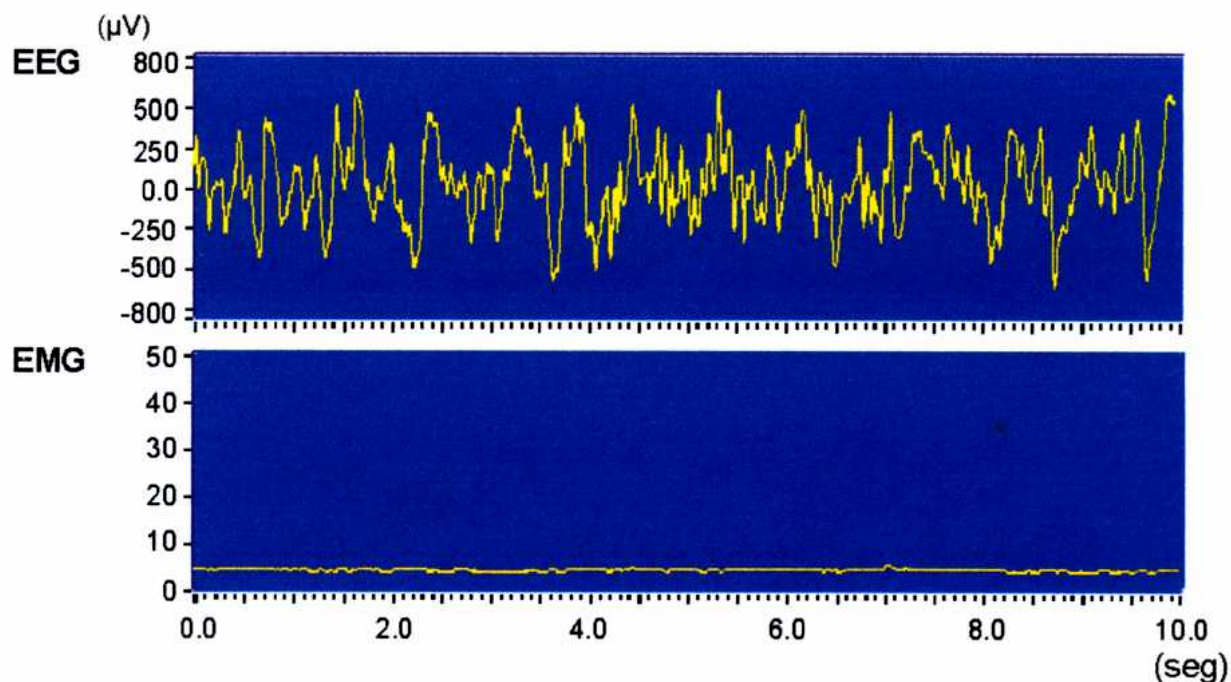


Figura 14: Ejemplo de un registro de EEG/EMG característico del estado de sueño lento en ratas. Detalles sobre el registro de las señales se detallan en el apartado correspondiente.

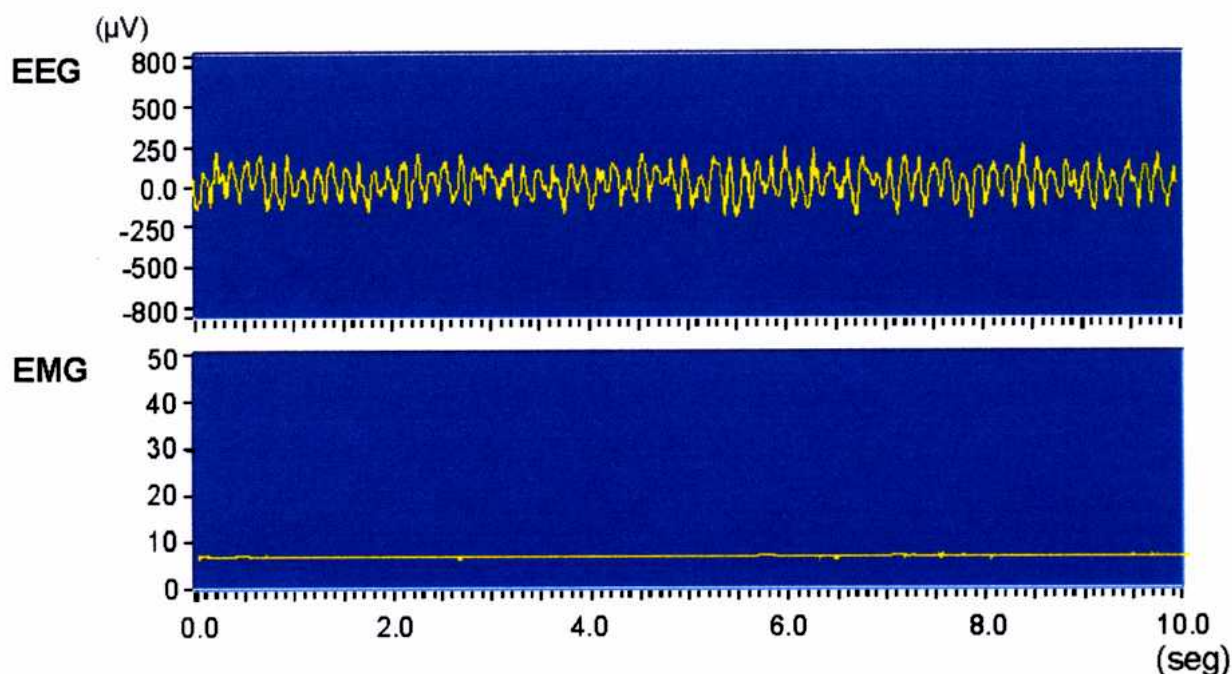


Figura 15: Ejemplo de un registro de EEG/EMG característico del estado de sueño REM en ratas. Detalles sobre el registro de las señales se detallan en el apartado correspondiente.

3.3.2.2- Registro de EEG/EMG

La señal del EEG fue derivada a partir de uno de los electrodos frontales y el electrodo occipital contralateral (la descripción de los electrodos e implantación de los mismos fue detalla previamente en cirugías). El otro electrodo occipital fue usado como electrodo de referencia. Las señales fueron transmitidas por cable desde el enchufe implantado en el animal hasta un conmutador rotatorio de mercurio (Dragonfly R&D, Silver Spring, MD, EE.UU.), el cual consiste en 12 canales circulares conteniendo mercurio (solo 8 son utilizados), sobre los cuales giran los pins que transportan la señal eléctrica proveniente de cada electrodo. Fijado al conmutador se encuentra, además, el sistema de articulación giratoria para líquidos para microdiálisis. Esta configuración fue desarrollada para permitir que los tubos del sistema de microdiálisis y el cable de registro conectados al animal puedan rotar suave y simultáneamente, y de esta forma, que el animal pueda moverse libremente.

Las señales de EEG y EMG fueron amplificadas y filtradas (EEG: pasa alto 0,3 Hz y pasa bajo 29 Hz, 48 dB/octavos; EMG: pasa alto 16 Hz y pasa bajo 3000 Hz, 6 dB/octavos). La señal rectificada e integrada del EMG, más las señales del EEG y la T_{cer} , fueron digitalizadas a una frecuencia de 64 Hz. El registro del EEG fue sometido

en forma directa a una rutina de transformación de Fourier y el espectro de potencia fue computarizado cada 2 segundos para las frecuencias entre 0,5 y 29 Hz, con intervalos de 0,5 Hz en el rango de frecuencias 0,5- y 4,5 Hz e intervalos de 1,0 Hz para las frecuencias más altas. El espectro de potencia fue finalmente promediado en períodos de 10 segundos. Luego de la adquisición de las señales y para permitir la clasificación manual de cada intervalo, el programa (S.E.A., Science & Enginnering Aplications, Colonia, Alemania) resumió en la pantalla períodos subsecuentes de 10 segundos de la señal del EEG, del EMG rectificado e integrado, del espectro de potencia y de la temperatura. Cada período de 10 segundos fue clasificado de acuerdo a las características del EEG y EMG en vigilia, SL, preREM y sREM. Períodos que presentaron artefactos o más de un estado conductual fueron omitidos del análisis espectral. Para el estudio temporal, el estadio de preREM fue incluido al SL, mientras que para el análisis espectral fue excluido.

3.3.3- Técnica de inmunohistoquímica

3.3.3.1- Principio teórico

La técnica de inmunohistoquímica proporciona la posibilidad de un acercamiento morfológico en la localización celular de determinados péptidos. El principio teórico utilizado para la localización específica de la proteína de interés (por ejemplo: receptores, hormonas, factores de transcripción, factores de crecimiento, etc.) se basa en el empleo de anticuerpos específicos (llamado también anticuerpo primario) para el reconocimiento y detección de epítopes o determinantes antigénicos de la proteína de interés. El nivel de detección de esta unión específica antígeno-anticuerpo puede ser amplificado a través de una cadena de reacciones que aumentan paso a paso el número de sitios de reacción, incrementando de esta forma la señal final (Hsu, 1990), (Swanson, 1988). Para esto se utiliza un sistema de biotina-avidina, mediante el cual los anticuerpos secundarios, acoplados a varias moléculas de biotina y capaces de reconocer distintos anticuerpos primarios dependiendo de su origen (por ejemplo: conejo, ratón, cabra, etc.), son incubados con el complejo avidina-peroxidasa. Avidina es una pequeña proteína con una alta afinidad por biotina, lo cual permite la formación de macro-complejos entre avidina, la enzima y los anticuerpos biotinilados. Luego de la adición de DAB (diaminobenzidina), un sustrato de la peroxidasa, un precipitado color marrón aparece en lugares donde el antígeno este presente (detectado por una cascada consistente en anticuerpo primario - anticuerpo secundario/biotina - avidina -

peroxidasa - sustrato). Para un mejor contraste e intensidad del color se añade níquel al DAB, dando lugar así a una coloración gris-negra (Reul y col., 2000a).

3.3.3.2- Protocolo

Para llevar a cabo esta técnica, los cerebros fueron cortados en forma coronal en secciones de 20 μm de espesor mediante el uso de un criostato y montadas sobre portaobjetos previamente cubiertos con poli-L-lisina. Los cortes fueron almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

El ensayo de inmunohistoquímica fue llevado a cabo de acuerdo a protocolos estándares. Brevemente, los cortes cerebrales fueron fijados en 4 % paraformaldehído por 20 minutos, siendo luego incubados en 0,6 % de H_2O_2 en H_2O destilada para la eliminación de la actividad de peroxidasas endógenas. La membrana celular fue permeabilizada con 0,2 % Triton y el bloqueo de sitios no específicos fue realizado con 5 % de suero ovino inactivado en buffer salino fosfato (PBS). Anticuerpos primarios anti-c-fos (Oncogene Research Products, Boston, MA, EE.UU.) diluidos 1:10.000 en 1 % de suero ovino/PBS fueron añadidos y la preparación fue incubada toda la noche a temperatura ambiente. Anticuerpos secundarios con biotina adherida, el complejo avidina-biotina-peroxidasa y el sustrato DAB/níquel (Vectastain Elite-ABC Kit y DAB Substrate, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) fueron usados de acuerdo a las instrucciones de la compañía. Luego de la deshidratación en etanol y de clarear en xylol, los cortes fueron finalmente montados con Roti-histokit (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) y cubiertos.

3.4- Protocolos experimentales

3.4.1- Experimentos de microdiálisis y administración i.c.v. de CRH y Ucn

3.4.1.1- Cronograma general

día	protocolo
-19	arribo de los animales
-15	comienzo de la manipulación diaria
-8	operación
-4	uso del collar para microdiálisis

día	protocolo
0	A- implantación de la sonda y conexión al sistema de microdiálisis B- adrenalectomía e implantación de la sonda de microdiálisis
2	experimento

3.4.1.2- Protocolo experimental

Luego de la cirugía, en la cual cánulas-guías para i.c.v. y para la sonda de microdiálisis fueron implantadas, los animales fueron trasladados al cuarto experimental, con condiciones similares a las del bioterio. Luego de cuatro días de recuperación, los animales fueron provistos de un collar plástico alrededor del cuello (CMA/Microdialysis, Estocolmo, Suecia) a través del cual fueron conectados al brazo móvil del sistema de microdiálisis durante el experimento. Cuatro días mas tarde, los animales fueron implantados con la sonda y conectados al sistema de microdiálisis (día experimental 0). Al segundo día luego de la implantación de la sonda, el experimento fue llevado a cabo, comenzando a las 9:00 horas (*Figura 16*). Cinco muestras de 30 minutos fueron recolectadas entre las 9:00 y 11:30 horas para la medición en condiciones basales (pre-inyección) de los niveles de 5-HT y corticosterona. A las 11:30 horas las ratas recibieron una inyección i.c.v. de solución salina estéril y libre de pirógenos, CRH (0,1; 0,3 o 1 µg/rata) o Ucn (0,03; 0,1; 0,3 o 1 µg/rata). El volumen total inyectado fue de 10 µl, administrado en un período de 60 segundos, luego de los cuales la aguja fue mantenida dentro de la cánula por otros 60 segundos para evitar el reflujo de la sustancia inyectada. Durante el procedimiento, el animal fue solo ligeramente retenido por el experimentador, sin ser removido de su jaula. Luego de finalizada la inyección, muestras de 30 minutos fueron recolectadas por otras 6 horas (11:30 - 17:30 horas). Los experimentos se llevaron a cabo en 4 animales simultáneamente y las muestras de dializado, recolectadas manualmente, fueron usadas para la determinación de los niveles extracelulares de 5-HT y 5-HIAA, y para la medición de la concentración de corticosterona libre. Durante todo el experimento la actividad comportamental del animal fue registrada como se describe en el apartado correspondiente.

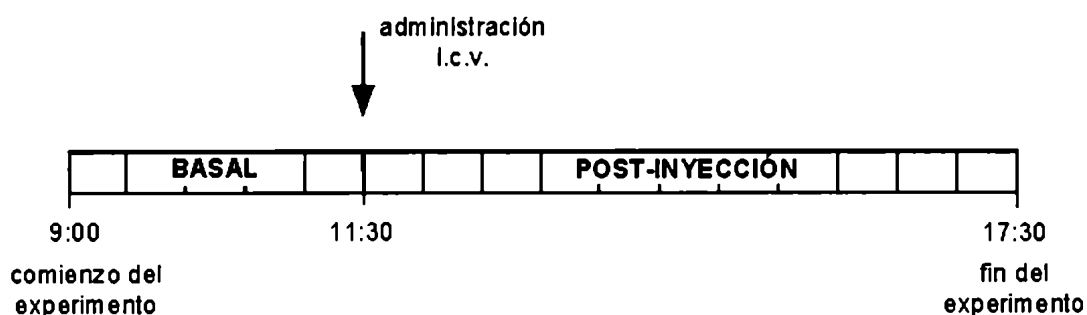


Figura 16: Protocolo experimental para los experimentos de administración i.c.v. de CRH y Ucn.

3.4.1.3- Administración i.c.v. de CRH en animales ADX

Previo a la inserción de la sonda de microdiálisis (día experimental 0), un grupo de animales fue adrenalectomizado para el estudio del rol de la corticosterona en los efectos producidos por CRH. Tanto las ratas ADX como las operadas-controles siguieron un protocolo experimental similar al descrito en el apartado anterior, recibiendo en este caso una dosis de 1 μ g de CRH i.c.v.

3.4.2- Experimentos de administración i.c.v. de CRH y Ucn para estudios de inmunohistoquímica

3.4.2.1- Cronograma general

día	protocolo
-18	arribo de los animales
-14	comienzo de la manipulación diaria
-10	operación
0	experimento

3.4.2.2- Protocolo experimental

Luego de diez días de la implantación de una cánula en el ventrículo lateral, la administración i.c.v. de los péptidos fue llevada a cabo. El experimento tuvo lugar entre las 8:00 y 11:30 horas, periodo en el cual se detectan, en ratas normales, los niveles basales de ACTH y de corticosterona. Tres grupos, de 6 animales cada uno, recibieron una inyección i.c.v. de solución salina estéril y libre de pirógenos, de CRH o Ucn (0,3

µg/rata, dosis elegida a partir de resultados previos). El volumen total inyectado fue de 10 µl, siendo administrado en un período de 60 segundos (procedimiento detallado previamente). Luego de finalizada la inyección, los animales permanecieron sin ser perturbados por 2 horas. Luego de ese período exacto, los animales fueron sacrificados en el cuarto adyacente, previo adormecimiento por 30 segundos en una cámara saturada de halotano. El cerebro fue rápidamente removido y luego del primer paso de congelación rápida y homogénea en isopentano (-40 °C), fue congelado sobre hielo seco (-80 °C). Los cerebros fueron almacenados a -80 °C hasta su utilización en el ensayo de inmunohistoquímica. Muestras de sangre fueron tomadas para la determinación de ACTH y corticosterona. La sangre proveniente del tronco fue recolectada en tubos de 10 ml cubiertos de EDTA (Sarstedt, Nürnberg, Alemania) para evitar la coagulación, y conteniendo 50 µl de Trasylol para evitar la degradación enzimática de ACTH (Bayer, Leverkusen, Alemania). Las muestras fueron mantenidas constantemente en hielo. La sangre fue centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos a 4 °C, luego de los cuales se procedió a alicuotar el plasma para la posterior medición de las hormonas. Las alícuotas fueron almacenadas a -80 °C.

3.4.3- Experimentos de microdiálisis en ratones deficientes del receptor de CRH tipo 1 (CRH-R1)

3.4.3.1- Cronograma general

día	protocolo
-7	operación
0	implantación de la sonda y conexión al sistema de microdiálisis
2	experimento en condiciones basales
3	experimento de estrés por natación forzada

3.4.3.2- Protocolo experimental

Luego de siete días de la implantación de la cánula-guía para microdiálisis, la sonda fue insertada lentamente en el hipocampo (día experimental 0) y los animales fueron conectados al sistema de microdiálisis y al brazo móvil mediante un alambre fijado a la

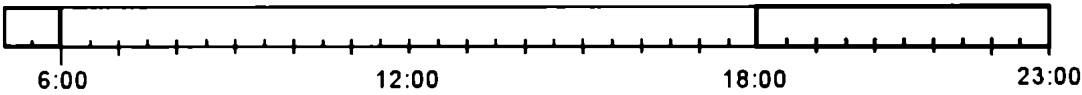
clavija adherida a su cabeza. Al segundo día luego de la implantación de la sonda de microdialisis, muestras de dializado, de 30 minutos de duración, fueron recogidas manualmente entre las 5:00 y 23:00 horas, para el estudio del ritmo circadiano de 5-HT y 5-HIAA hipocampal, y de corticosterona libre (*Figura 17*). Para esta última determinación, una alícuota de 35 μ l fue separada de cada muestra de dializado. Debido a los bajos niveles de corticosterona libre esperados en los ratones homocigotas (-/-) deficientes del CRH-R1, dos alícuotas de 30 minutos fueron unidas obteniéndose así un valor promedio de la hormona para un período de 60 minutos. Durante todo el experimento la actividad comportamental del animal fue registrada siguiendo un protocolo detallado más adelante.

Para evaluar el rol del CRH-R1 en la respuesta a estrés de 5-HT hipocampal, seis ratones de cada genotipo (+/+, +/- y -/- del gen del CRH-R1) fueron sometidos a natación forzada. Al tercer día luego de la inserción de la sonda, ocho muestras de 15 minutos de duración fueron recogidas entre las 9:00 y 11:00 horas para la determinación de los niveles basales de 5-HT y 5-HIAA. A continuación, los animales fueron sujetos a un procedimiento de natación forzada (11:00 - 11:10 horas; ver detalles más adelante), luego del cual otras diez muestras de dializado de 15 minutos fueron recolectadas (hasta las 13:40 horas) para estudiar los niveles post-estrés (*Figura 17*). La actividad comportamental del animal fue registrada durante todo el experimento. Los experimentos se llevaron a cabo en 4 animales simultáneamente.

3.4.3.3- Estrés por natación forzada

Los ratones fueron forzados a nadar por 10 minutos en un vaso de precipitado de 2 litros (diámetro interno 12,5 cm), conteniendo agua a 25 °C. La profundidad del agua fue de 11,5 cm lo cual impidió al ratón apoyarse con sus patas o cola en la base del recipiente. Luego de finalizado el procedimiento, los animales fueron cuidadosamente secados con una toalla y devueltos a sus correspondientes jaulas. Los ratones mostraron un período corto de natación (aproximadamente 2-4 minutos) luego del cual permanecieron principalmente flotando por el resto del ensayo.

día experimental 2: condiciones basales
recolección de muestras cada 30 minutos



día experimental 3
recolección de muestras cada 15/10 minutos

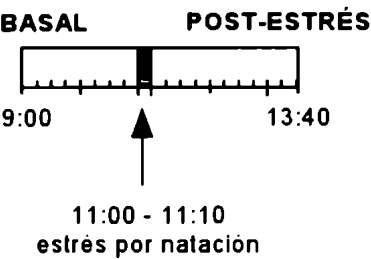


Figura 17: Protocolo experimental para el estudio con ratones knock-out del receptor de CRH tipo 1.

3.4.4- Estudios simultáneos de microdiálisis y de registro de EEG/EMG/Tcer

3.4.4.1- Cronograma general

día	protocolo
-25	arribo de los animales
-21	comienzo de la manipulación diaria
-14	operación
-4	conexión al sistema de registro de EEG
0	implantación de la sonda y conexión a los sistemas de microdiálisis y de registro de EEG
2	experimento en condiciones basales
3	experimento de privación del sueño

3.4.4.2- Sincronización de los sistemas de microdiálisis y de registro de EEG/EMG/T_{cer}

La configuración del sistema de microdialísis fue especialmente diseñada para este estudio. Para esta nueva disposición, las conexiones del sistema (tubos desde la bomba de perfusión hasta el recolector automático, pasando por la sonda implantada en el animal) pasaron a tener una longitud total de 4 metros. Esto provocó un incremento en la resistencia del sistema y en consecuencia fluctuaciones en el flujo de perfusión. Debido a que el objetivo del experimento fue observar los cambios en la neurotransmisión de serotonina en relación con el estado de vigilancia de la rata, fue necesario una precisa sincronización de ambos sistemas. Para esto, antes y después del experimento se determinó el flujo de perfusión real, mediante la medición del volumen exacto recolectado en períodos de 3 minutos. Este flujo varió entre 1,89 y 2,13 $\mu\text{l}/\text{min}$, el cual, junto al volumen muerto total entre la membrana de microdialísis y el sistema de recolección (tubos, canal del sistema giratorio para líquidos y la sonda), ayudó a establecer el tiempo exacto necesario para que el dializado que se genera en la sonda llegue al sistema de recolección. Este tiempo de desfase varió entre 13 - 14 minutos, los cuales fueron corregidos al tiempo real de recolección de las muestras, para así poder ajustar su sincronización con el registro de EEG/EMG/ T_{cer} . Estos tiempos fueron confirmados también, al finalizar el experimento, mediante la recolección de muestras de dializado provenientes de la inmersión de la sonda en una sustancia estándar.

3.4.4.3- Protocolo experimental para el estudio simultáneo de microdialísis-EEG/EMG/ T_{cer}

Por lo menos dos semanas fueron permitidas a los animales para la recuperación de la cirugía, en la cual se implantaron los electrodos para el registro de EEG, EMG y T_{cer} y la cánula-guía para microdialísis. Luego de dicho período, las ratas (dos por experimento) fueron trasladadas en sus propias jaulas a una caja de Faraday (largo x ancho x alto = 115 x 60 x 100 cm) y fueron conectadas al cable de registro para permitir su adaptación a las condiciones experimentales. Luego de cuatro días, los animales fueron ligeramente anestesiados con halotano para la inserción, a través de la cánula-guía, de la sonda de microdialísis en el hipocampo y la conexión simultánea a los sistemas de microdialísis y de registro de EEG/EMG/ T_{cer} . Para permitir el libre y normal comportamiento del animal, un conmutador rotatorio de mercurio fue utilizado para el registro de las señales eléctricas.

Los experimentos fueron llevados a cabo durante el segundo y tercer día luego de la

implantación de la sonda de microdialisis y la conexión al sistema de registro de EEG. Los experimentos fueron iniciados a las 7:30 horas, al comienzo de la fase de luz, y continuaron hasta aproximadamente las 19:00 horas. Las muestras de dializado fueron recolectadas cada 3 minutos (volumen total de cada muestra: 6 μ l) a través de un recolector automático refrigerado (Univentor 820, Malta) y almacenadas a -80 °C hasta la determinación de los niveles de 5-HT. Simultáneamente, el registro automático de las señales de EEG, EMG y T_{cer} fue llevado a cabo entre las 7:00 y 19:00 horas. Durante el segundo día, los animales ($n = 11$) no fueron perturbados en absoluto, desarrollándose así los estudios en condiciones basales. Durante el tercer día, los animales fueron separados en dos grupos. Un grupo control ($n = 5$) en el cual los animales fueron estudiados sin ser perturbados, y un grupo sometido al procedimiento de privación del sueño ($n = 6$). En este último grupo, los animales fueron privados del sueño por medio de la manipulación delicada durante un período de 4 horas (ver detalle más adelante), comenzando a las 7:30 horas.

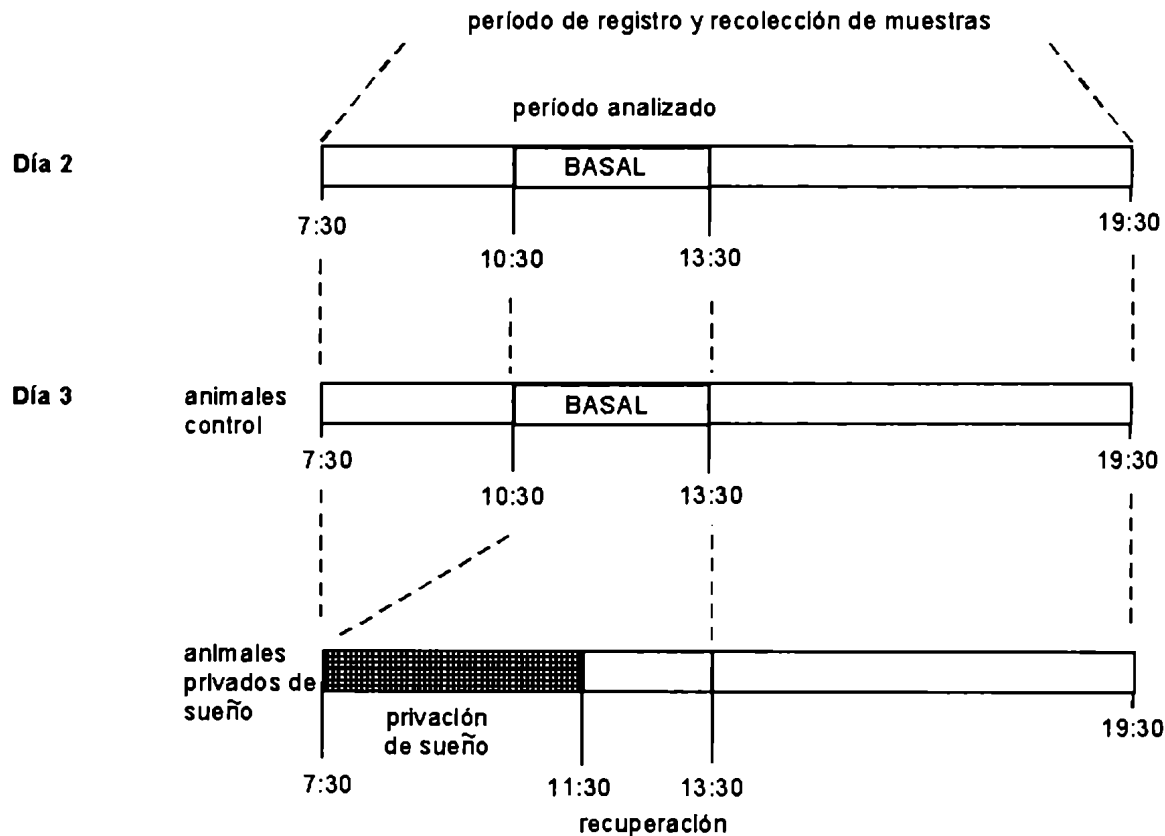


Figura 18: Protocolo experimental para el estudio de la relación de serotonina hipocámpal y el ciclo de vigilia-sueño, bajo condiciones basales y por privación de sueño.

3.4.4.4- Protocolo experimental para el estudio de la respuesta de corticosterona libre

En otra serie de experimentos, se buscó determinar los efectos de la privación del sueño sobre los niveles de corticosterona libre, como un parámetro de la activación del eje HPA, para lo cual fueron utilizados animales implantados únicamente con una cánula-guía para microdiálisis ($n = 6$). La preparación experimental e implantación del animal fue similar a la detallada previamente para los experimentos de administración i.c.v. y de microdiálisis.

Los experimentos fueron llevados a cabo durante el segundo y tercer día luego de la implantación de la sonda de microdiálisis, iniciándose a las 7:30 horas del segundo día (comienzo de la fase luminosa). Muestras de dializado fueron recolectadas en forma continua por 48 horas, siendo las mismas de 30 minutos de duración durante la fase luminosa y de 60 minutos durante la fase oscura. Las muestras fueron recogidas a través de un recolector automático refrigerado y almacenadas a -80°C hasta la determinación de los niveles de corticosterona.

Como se detalló previamente, durante el segundo día, los animales no fueron perturbados en absoluto, llevándose a cabo así el experimento en condiciones basales. En el tercer día, los animales fueron sometidos al procedimiento de la privación del sueño por medio de manipulación delicada (ver a continuación) durante un período de 4 horas, comenzando a las 7:30 horas (*Figura 19*).

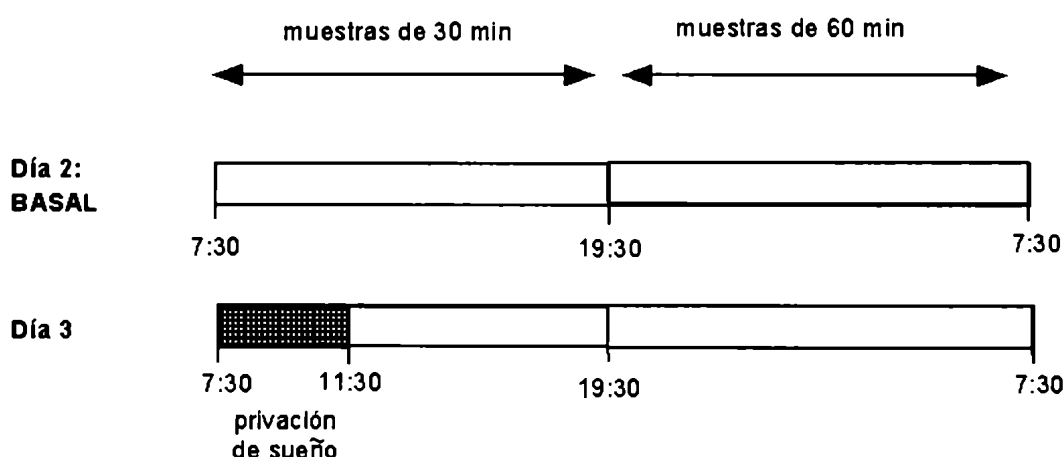


Figura 19: Protocolo experimental para el estudio del efecto de la privación de sueño sobre los niveles de corticosterona libre.

3.4.4.5- La privación del sueño por medio de manipulación delicada

Las ratas son animales de hábitos nocturnos, que duermen durante la mayor parte de la fase luminosa del ciclo de luz-oscuridad. Al tercer día, luego de la implantación de la sonda de microdiálisis, los animales fueron forzados a mantenerse despiertos por 4 horas, comenzando a partir del encendido de las luces, 7:30 horas. Esto se llevo a cabo mediante la introducción en la jaula de pequeños objetos para que el animal inspeccione o juegue, como por ejemplo lápices, trozos de papel o cartón o tubos de plástico. En ningún momento el animal fue tocado o manipulado. Inmediatamente después de finalizadas las 4 horas, los objetos fueron removidos, la jaula cerrada, dejándose al animal tranquilo.

El comportamiento del animal fue observado continuamente durante todo el procedimiento. Para evitar que se produjesen episodios de microsueño (estando el animal con los ojos abiertos), no se le permitió a la rata quedarse inmóvil por más de 5 segundos, siendo en este caso estimulada, inmediatamente, con un objeto o movimiento del aserrín de la jaula. La mínima actividad comportamental permitida fue olfatear.

3.5- Análisis comportamental

La actividad comportamental desarrollada por las ratas y ratones durante los experimentos fue registrada por observación directa. Cada 30 segundos el comportamiento del animal fue registrado, tomándose nota de la actividad desarrollada por la rata o el ratón en ese momento (unidad). El comportamiento observado fue categorizado de la siguiente manera:

- a- *reposo* o comportamiento no activo, que incluye al animal durmiendo, yaciendo o simplemente sentado.
- b- *aseo*, considera cuando el animal se limpia o se rasca.
- c- *ingestión*, de alimento, heces, y agua.
- d- *exploración*, comprende locomoción, olfateo, pararse en dos patas y excavación; en el caso de los ratones se incluyó también en esta categoría el colgarse de las barras del techo de la jaula.

En el caso de los experimentos con ratas se incluyó una categoría extra:

- e- *masticación*, movimiento repetitivo de las boca, como si estuviese comiendo pero sin alimento.

Por otro lado, para el análisis de la relación de la actividad comportamental y la concentración extracelular de 5-HT/5-HIAA, el comportamiento fue agrupado en reposo (ítem a) o activo (ítem b - e) y clasificado en tres categorías (Linthorst y col., 1997), (Linthorst y col., 1995):

"1" - cuando el número total de observaciones (en un período de 30 minutos, 60 unidades en total) de comportamiento activo fue $\leq 10\%$

"2" - el comportamiento activo fue $> 10\% - \leq 50\%$

"3" - la actividad fue $> 50\%$ del período.

Esta clasificación arbitraria permite tener una idea del estado comportamental del animal, siendo de poco activo (1), activo (2) o muy activo (3).

3.6- Determinación de 5-HT y 5-HIAA en muestras de dializado

Los niveles de 5-HT en las muestras de dializado, así como también los de su metabolito, 5-HIAA, fueron medidos sin previa purificación mediante el método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección electroquímica. Dos configuraciones distintas del equipo de HPLC fueron desarrolladas para poder obtener la sensibilidad requerida por cada condición experimental.

3.6.1- El sistema de HPLC para la determinación de 5-HT y 5-HIAA

Para la medición de 5-HT y 5-HIAA en muestras de 30 y 15 minutos de duración (experimentos de microdialisis y administración i.c.v. en ratas, y microdialisis en ratones), se utilizó un equipo de HPLC compuesto por una bomba (Millipore Corporation, Milford, MA, EE.UU.), un termostato para la columna de separación (Mistral, Spark Holland Instruments, Emmen, Holanda), una válvula de inyección Rheodyne (Rheodyne 7125, Rheodyne, Rhonert Park, CA, EE.UU.), un detector electroquímico (Antec Leyden, Zoeterwoude, Holanda), y un programa de adquisición de datos de cromatografía (Gynkosoftware, Dionex, Idstein, Alemania). 5-HT y 5-HIAA fueron separadas en una única corrida a través de una columna de separación (LC-18-DB, 150 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula 3 μm ; Supelco, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania) usando un flujo de 1 ml/min. La temperatura del termostato para la columna de separación fue fijado en 35 °C. La fase móvil consistió en 18% metanol, 75 mM sodio dihidrógeno fosfato (NaH_2PO_4), 0,25 mM, octyl sulfato de sodio ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_4\text{SNa}$) y 0,1 mM EDTA (pH 4,6). Las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA fueron cuantificadas por

detección electroquímica, con el potencial del detector fijado en los 600 mV contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl (Linthorst y col., 1994). Las cantidades de 5-HT y 5-HIAA en las muestras fueron calculadas en base a una curva estándar generada por la medición de 4 concentraciones estándares definidas. El límite de detección para 5-HT y 5-HIAA fue 0,5 - 0,8 y 1,0 fmol/25 µl de muestra respectivamente, considerando una relación señal/ruido igual a 3. La duración del cromatograma fue de aproximadamente 8 minutos.

3.6.2- Sistema de HPLC de alta sensibilidad

Como se explicó anteriormente, en el estudio de la relación entre los niveles de 5-HT en el hipocampo y los estados de vigilancia de la rata, se buscó reducir al mínimo posible la duración de las muestras de microdialísis. Esto significó una marcada reducción en el volumen de dializado recolectado y en consecuencia una reducción en los niveles de 5-HT a medir. A su vez, debido a que en primera instancia uno de los objetivos de este estudio era la medición directa de las muestras de dializado, fue necesario desarrollar una nueva configuración del HPLC que permita la separación de 5-HT en un corto cromatograma, así como también con una alta sensibilidad. El equipo de HPLC consistió en una bomba (Gynkotec, Dionex, Idstein, Alemania), un termostato y detector electroquímico (DECADE, Antec Leyden, Zoeterwoude, Holanda) y un programa de adquisición de datos de cromatografía (Gynkosoftware, Dionex, Idstein, Alemania). La serotonina fue separada, sin previa purificación, en una única corrida a través de una columna de separación (50 mm x 2,1 mm, tamaño de partícula 5 µm; Discovery C18; Supelco, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania) usando un flujo de 200 µl/min, temperatura del termostato de 30°C y con una presión de 30-35 bars. La fase móvil consistió en 18% metanol, 75 mM sodio dihidrógeno fosfato (NaH_2PO_4), 0,1 mM EDTA y 0,25 mM octyl sulfato de sodio (pH 4,6). 5-HT fue cuantificada por detección electroquímica con el potencial del detector fijado en los 550 mV contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl. La concentración de 5-HT en la muestra de dializado fue calculada en base a una curva estándar generada por la medición de 4 concentraciones estándares definidas. El límite de detección para 5-HT fue de 0,1 fmol/6 µl muestra, considerando una relación señal/ruido igual a 3. La duración total del cromatograma fue de 3 minutos (*Figura 20*).

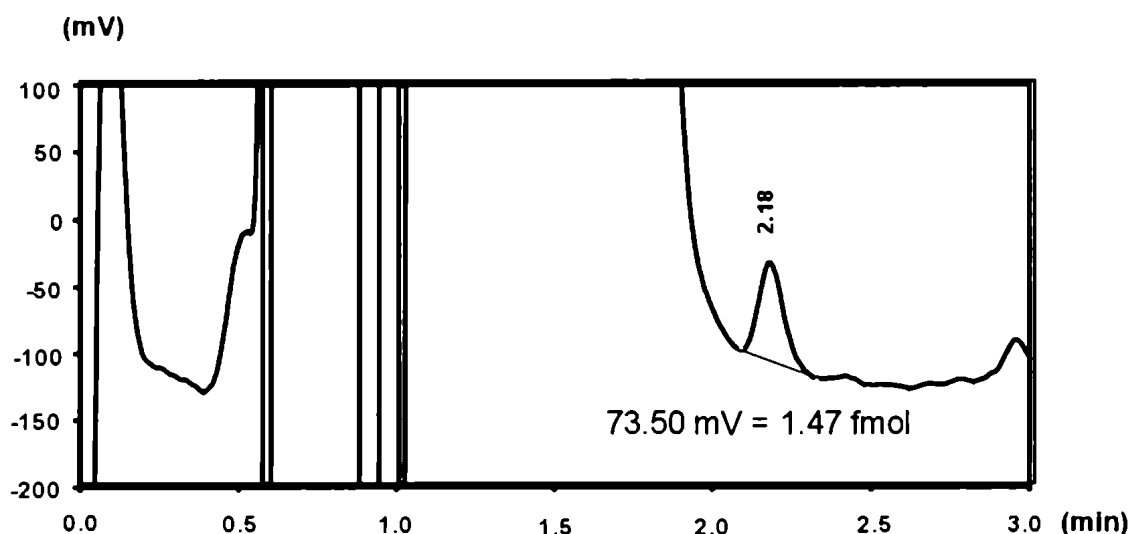


Figura 20: Ejemplo de un cromatograma. El pico de 5-HT está indicado por su tiempo de retención expresado en minutos.

Con esta configuración del HPLC fue posible comenzar estudios preliminares registrando las señales de EEG/EMG/ T_{cer} en simultáneo con la medición directa de 5-HT en muestras inyectadas cada 3 minutos. Lamentablemente, luego de unas 200 inyecciones continuas en el HPLC (10 horas experimentales), la presión del equipo comenzaba lentamente a aumentar, provocando serios cambios en el cromatograma. Se decidió finalmente, recoger las muestras de dializado a través de un recolector automático refrigerado y proceder manualmente a la inyección de las muestras en el HPLC.

3.7- Determinación de hormonas

3.7.1- ACTH

Los niveles de ACTH en plasma fueron medidos mediante un radioinmunoensayo (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, EE.UU.). Este ensayo se basa en la competencia entre una concentración establecida de antígeno (hormona) radiactivamente marcada (I^{125}) y el antígeno presente en la muestra por una cantidad limitada del anticuerpo correspondiente. De esta manera, la cantidad de antígeno marcado que se une al anticuerpo está determinado por la cantidad de antígeno no marcado. Para esto, las muestras, los estándares, los controles, el anticuerpo anti-ACTH y la hormona marcada radiactivamente fueron incubadas al menos por 16 horas a 4 °C. Luego de la

incubación, precipitación y centrifugación, la radioactividad presente en el precipitado (complejo antígeno-anticuerpo) fue medida a través de un contador gamma (Beckman, Fullerton, CA, EE.UU.) durante 2 minutos/muestra. La concentración de ACTH en las muestras de plasma fue calculada a partir de la curva estándar. El coeficiente de variación entre los ensayos fue 7 %, mientras el intra-ensayo fue 5 %, con un límite de detección de 2 pg/ml.

3.7.2- Corticosterona

Los niveles de corticosterona se midieron mediante el uso de un radioinmunoensayo (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, EE.UU.). Para la determinación de la corticosterona en plasma, una alícuota de 50 µl de las muestras de plasma diluido previamente 1:200 fue utilizada. Para la medición de la corticosterona en el medio cerebral extracelular, 30 µl de las muestras de dializado fueron utilizados sin previa dilución (Linthorst y col., 1995). Las muestras, estándares, controles y la hormona marcada radiactivamente con I^{125} fueron puestos en contacto con el anticuerpo anti-corticosterona. Luego de la incubación por 2 horas, precipitación y centrifugación, la radioactividad presente en el precipitado fue medida a través de un contador gamma durante 60 segundos/muestra. La concentración de corticosterona en las muestras de plasma fue calculada a partir de la curva estándar. Para la medición de corticosterona en las muestras de dializado una curva estándar especial fue construida. El coeficiente de variación entre- e intra-ensayos fue del 7 % y 4 % respectivamente, con un límite de detección de 0,001 µg/100 ml (Linthorst y col., 1995).

3.8- Histología y verificación de la adrenalectomía

Al finalizar los experimentos (salvo en el caso del experimento para inmunohistoquímica), los animales fueron sacrificados por medio de una sobredosis de pentobarbital (Narcoren, Rhone Merieux, Laupheim, Alemania) y los cerebros fueron removidos y depositados en una solución 4 % de formalina. Los cerebros fueron cortados horizontalmente en secciones de 50 µm de espesor usando un micrótopo con sistema de congelación (-20 °C) y montados sobre portaobjetos gelatinizados (solución de 0,7 %: 3,5 gr. gelatina; 0,25 gr. $KCr(SO_4) \cdot 12H_2O$, 500 ml agua destilada). Luego del secado, los cortes fueron teñidos mediante el protocolo para tinción de Nissl (tinción con violeta de cresilo: 230 ml de agua destilada, 50 ml de solución 10 % de ácido acético,

10 ml de solución de acetato de sodio 1 M, 1,5 gr. de acetato de violeta de cresilo). La localización neuroanatómica de la sonda de microdiálisis y/o cánulas i.c.v. fue verificada por inspección de los cortes bajo microscopio. Solo aquellos animales en donde se encontró una correcta posición de la sonda de microdiálisis y la cánula fueron considerados.

Para la verificación de la adrenalectomía, la presencia de corticosterona en plasma fue determinada mediante un radioinmunoensayo. Muestras de sangre fueron obtenidas mediante punción cardíaca inmediatamente luego del sacrificio de los animales.

3.9- Materiales

CRH de humano/rata y Ucn de rata fueron provistos por Bachem Biochimica (Heidelberg, Alemania). Los péptidos fueron disueltos en agua estéril y libre de pirógenos, conteniendo 0,05% de ácido ascórbico, alícuotados y almacenados a -80 °C para su posterior uso. Diluciones para la inyección i.c.v. fueron realizadas en solución salina estéril y libre de pirógenos. Los demás productos utilizados (para análisis o para el HPLC) fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania) o Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Alemania). En el caso de los productos adquiridos en otras compañías, los nombres de las mismas se detallan, entre paréntesis, al lado de los productos correspondientes.

3.10- Cálculos y análisis estadísticos

Todos los datos están presentados como medias $\pm$ ES. Todos los cursos temporales fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) con diseño de medidas repetidas, con tiempo como factor intra-sujeto. Como factores inter-sujetos fueron usados el tratamiento, dosis o genotipo. Si el análisis de ANOVA reveló un efecto significativo de uno de los factores o una interacción significativa entre ellos, un post-hoc test de T de Student (pareado o no-pareado) o test de rango múltiple de Duncan (en los casos apropiados) fueron realizados para determinar separadamente las diferencias entre los grupos. Un nivel de significación de $P < 0,05$ fue aceptado.

Para los experimentos de administración i.c.v. y microdiálisis en ratas, y de natación forzada en ratones las concentraciones basales de 5-HT y 5-HIAA fueron calculadas a partir del promedio de los valores de las muestras pre-inyección o pre-estrés en las

cuales los animales presentaron un estado comportamental 1 (poco activo). Las respuestas de 5-HT y 5-HIAA luego de un tratamiento (inyección i.c.v. o stress) fueron calculadas como la diferencias expresadas en porcentaje con respecto al valor basal de cada animal.

La máxima y la media de los niveles de 5-HT, 5-HIAA, corticosterona libre y actividad comportamental luego de la inyección de CRH y Ucn fueron estadísticamente evaluadas usando un ANOVA de dos vías, con neuropéptido y dosis como factores entre-sujeto, seguido de un test de rango múltiple de Duncan.

Los efectos de ADX sobre los cambios en los niveles de 5-HT y 5-HIAA producidos por la administración de CRH fueron analizados estadísticamente usando ANOVA de dos vías, con tratamiento y cirugía como factores entre-sujetos, seguido del test de Duncan. En el caso del análisis del patrón comportamental en las ratas tratadas i.c.v., para cada categoría comportamental, los resultados fueron expresados como la diferencia entre las unidades de actividad (60 unidades totales por cada muestra de 30 minutos) observadas en los animales tratados con CRH o Ucn y los animales controles.

En los experimentos con ratones bajo condiciones basales, las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA fueron expresadas como fmol/min. Debido a que durante el tercer día experimental la duración de la muestra que incluye el estrés por natación forzada (10 minutos) fue menor que la duración del resto de las muestras (15 minutos) y para mayor claridad, las concentraciones de 5-HT/5-HIAA fueron expresadas como porcentaje de las concentraciones basales (detallado previamente). Para el análisis de los cursos temporales de 5-HT y 5-HIAA en condiciones basales, el número de niveles intra-sujeto fue reducido mediante el promedio de resultados en intervalos de tiempo o fraccionando el período analizado, como se indica en las figuras. En los experimentos bajo condiciones basales, la actividad comportamental durante el período de luz/oscuridad fue calculada como la media de unidades de actividad por hora. Para analizar la relación de los niveles extracelulares de 5-HT/5-HIAA con el estado comportamental de los ratones se utilizó un análisis de varianza múltiple (MANOVA) con diseño de medidas repetidas. Este fue seguido por un test de T de Student pareado para determinar diferencias entre los niveles de 5-HT/5-HIAA para cada estado comportamental y entre los niveles durante los períodos de luz y oscuridad, mientras que un test de Duncan fue utilizado para determinar las diferencias entre genotipos.

Para el análisis de la actividad comportamental, se utilizaron todos los animales. Por problemas ocasionales con el HPLC o el radioinmunoensayo algunos valores se

perdieron y en consecuencia, el número para el análisis estadístico de los parámetros de corticosterona libre y 5-HT/5-HIAA fue menor.

En los experimentos sobre los niveles de 5-HT hipocampal y los estados de vigilia, la clasificación comportamental de cada intervalo de 10 segundos de la señal del EEG fue agrupada en períodos de 3 minutos (18 intervalos), coincidentes con las correspondientes muestras de dializado de 3 minutos. El porcentaje de tiempo durante el cual el animal estuvo despierto, en SL + preREM o REM fue calculado para cada período de 3 minutos (o cada 30 minutos para el estudio del tiempo total de cada estado). La relación entre la 5-HT hipocampal y los estados de vigilia en condiciones basales fueron analizados en el período entre las 10:30 y 13:30 horas del segundo día experimental. Este intervalo fue elegido ya que permitió la comparación con las muestras obtenidas al día siguiente, durante las 2 horas del período de recuperación del sueño (11:30 a 13:30 horas), y además porque abarca parte de la ventana temporal del procedimiento de privación del sueño (7:30 a 11:30). Muestras asociadas con un 100 % de vigilia u 80 - 100 % de SL (incluyendo preREM) fueron utilizadas para calcular la media de 5-HT para cada estado comportamental. Debido a que el sREM en la rata es breve, alcanzando ocasionalmente los 3 minutos de duración, muestras conteniendo más de 90 segundos (50 %) de este estado fueron utilizadas para calcular la media de 5-HT. El número de muestras para cada estado, por animal, varió entre 1-13 muestras para vigilia, 7-23 para SL, 1-6 para sREM. Un análisis similar de los resultados fue llevado a cabo para las 2 horas del período de recuperación, luego de la privación del sueño, durante el tercer día experimental. Para el estudio de los efectos de la privación del sueño, los niveles de 5-HT fueron determinados para el período completo de 4 horas de este procedimiento. Debido a un problema con los tubos del sistema de microdialisis al comienzo del procedimiento experimental, uno de los animales fue excluido del análisis del período de vigilia forzada, siendo incluido, sin embargo, para el período de recuperación.

ANOVA con diseño de medidas repetidas con un factor intra-sujeto, estado comportamental, fue utilizado para el análisis de la concentración extracelular de 5-HT durante los distintos estados de vigilia. En los casos en los que se encontró un efecto significativo de los estados comportamentales sobre los niveles de 5-HT, el test de T de Student pareado fue llevado a cabo para determinar diferencias significativas aisladas. ANOVA con diseño de medidas repetidas y con 2 factores intra-sujeto (estado comportamental y día experimental), fue utilizado para evaluar los efectos de la

privación del sueño sobre la relación entre los niveles extracelulares de 5-HT y los estados comportamentales durante el período de recuperación. En el caso de un efecto significativo entre los días experimentales, el test de T de Student pareado fue llevado a cabo para determinar diferencias significativas.

El espectro de potencia de la actividad de onda lenta (0,5 - 4,5 Hz) dentro de los episodios de SL (en este caso sueño preREM no fue incluido) fue analizado y promediado en intervalos de 30 minutos de duración. El espectro de potencia del EEG durante las 2 horas del período de recuperación fue expresado como porcentaje de los valores obtenidos en el mismo intervalo de tiempo en condiciones basales.

La temperatura cerebral fue promediada en intervalos de 15 minutos. En el caso de la corticosterona libre, el ritmo circadiano fue fraccionado en intervalos de 4 horas para su análisis estadístico. Para evaluar los efectos de la privación del sueño sobre la actividad de onda lenta, la temperatura cerebral, los niveles de corticosterona libre y el tiempo total de cada estado comportamental se utilizó un ANOVA con diseño de medidas repetidas y con 2 factores intra-sujeto (tiempo y día experimental).

4- RESULTADOS

PARTE A

Interacciones entre el sistema de CRH y la neurotransmisión de 5-HT en el hipocampo, la activación del eje HPA y la actividad comportamental

Con el propósito de caracterizar la interacción entre el sistema central de CRH y la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo, los efectos de la administración i.c.v. de CRH y Ucn sobre los niveles extracelulares de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo, así como también, sobre la activación del eje HPA, fueron evaluados utilizando la técnica de microdiálisis en ratas. Además, la activación neuronal producida por la administración central de estos neuropéptidos fue determinada mediante el análisis de la inducción de la proteína c-fos.

Para establecer los efectos de una disfunción permanente del CRH-R1 sobre la neurotransmisión serotoninérgica hipocampal y la activación del eje HPA, se realizaron estudios de microdiálisis en ratones deficientes de este receptor. Estos efectos fueron evaluados en condiciones basales y en respuesta a una situación de estrés.

Los efectos centrales de CRH y Ucn en ratas, y de la deficiencia del CRH-R1 funcional en ratones sobre la actividad comportamental de los animales fueron evaluados mediante la observación y registro directo del comportamiento.

4.1- Localización neuroanatómica de la sonda de microdiálisis en el hipocampo y de la cánula para administración i.c.v.

Por medio del análisis histológico se verificó la posición de la cánula-guía para i.c.v. y la localización de la sonda de microdiálisis en todos los animales utilizados en este trabajo de tesis. La posición de la cánula-guía para i.c.v. fue considerada correcta cuando el trazo de la misma finalizó dentro del ventrículo lateral izquierdo. El trazo de la sonda de microdiálisis fue localizado en la proximidad de las células granulares del giro dentado y de las células piramidales de la región CA₃ del hipocampo (*Figura 21*). En el caso de los ratones, la posición de la sonda de microdiálisis fue la misma a la observada en las ratas (no mostrado).

Solo los animales con una correcta posición de la cánula-guía y/o de la sonda de

microdiálisis fueron utilizados.

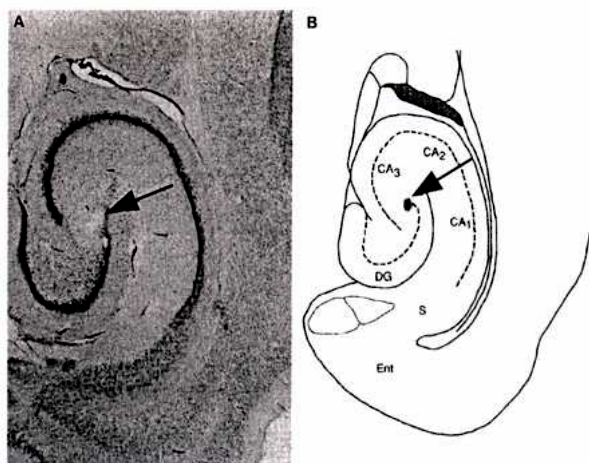


Figura 21: Localización del trazo de la sonda de microdiálisis (flecha) en un corte histológico del hipocampo de rata (tinción de Nissl, izquierda). Derecha, esquema del área que se observa en el preparado. Hipocampo: CA1, CA2, CA3 y DG (giro dentado); S, subículum; Ent, corteza entorinal. (fotografía publicada por Linthorst, 1994).

4.2- Efectos de la administración i.c.v. de CRH y Ucn en ratas

4.2.1- Efectos sobre los niveles de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo

Con el objetivo de estudiar los efectos centrales de CRH y Ucn sobre la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo, animales implantados con una sonda de microdiálisis en este área, recibieron una inyección i.c.v. de solución salina, CRH (0,1; 0,3 o 1 $\mu\text{g}/\text{rata}$) o Ucn (0,03; 0,1; 0,3 o 1 $\mu\text{g}/\text{rata}$). Los niveles extracelulares de 5-HT y 5-HIAA fueron medidos en las muestras de dializado y expresados como porcentaje de los niveles de 5-HT y 5-HIAA de muestras asociadas a un comportamiento no activo (< 10 %) durante el período basal (ver detalle en materiales y métodos).

Luego de la administración i.c.v. de solución salina se observó un aumento transitorio en los niveles extracelulares de 5-HT y su metabolito 5-HIAA; mientras que, la administración i.c.v. de CRH y Ucn originó un aumento dosis dependiente en los niveles hipocampales de 5-HT y 5-HIAA (*Figuras 22A, B y 23A, B; ANOVA con diseño de*

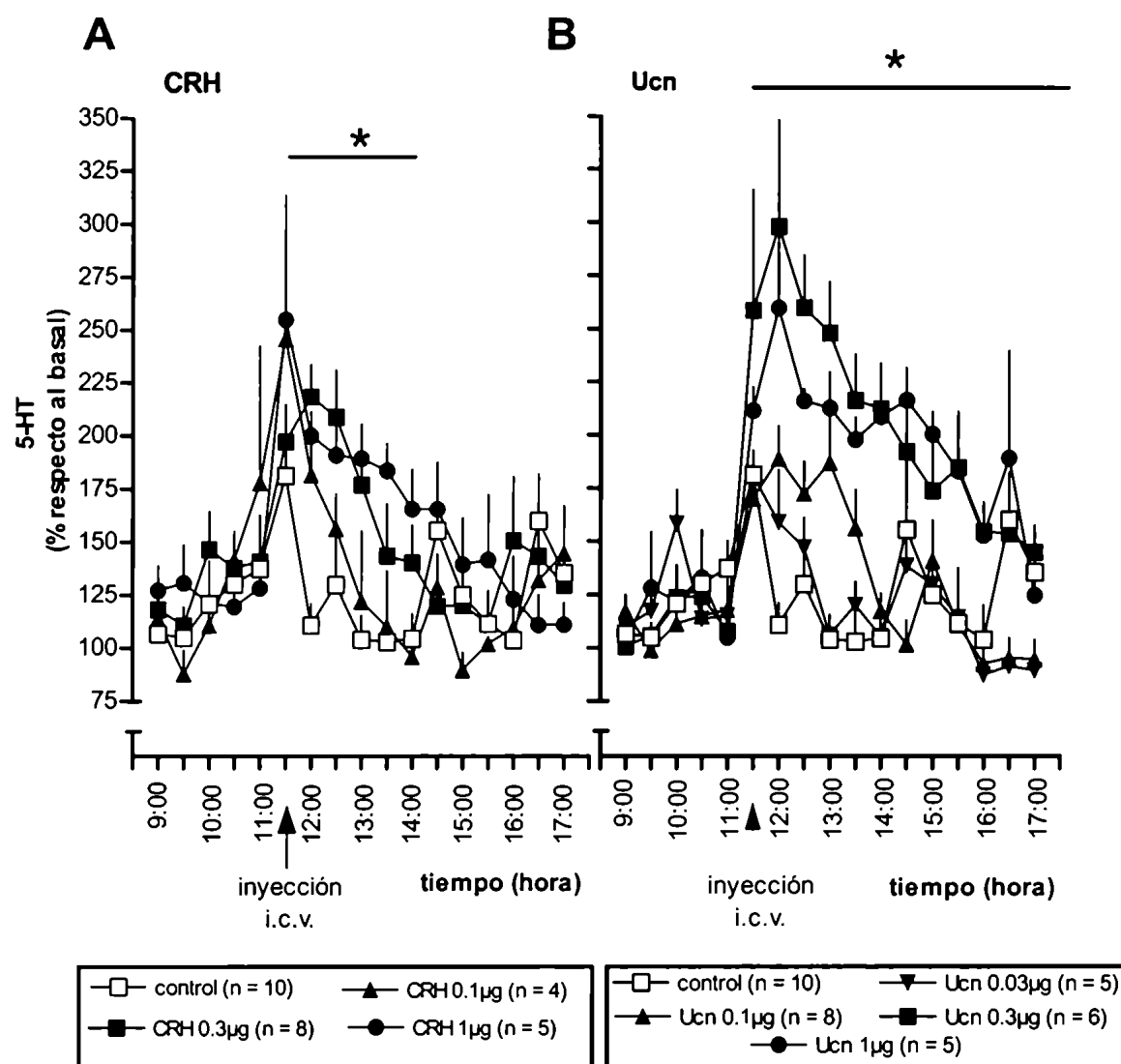


Figura 22: Efectos de la administración i.c.v. de solución salina (control) y diferentes dosis de CRH (A) y Ucn (B) sobre los niveles extracelulares de 5-HT hipocámpal en ratas (expresados como % respecto a la media de las muestras basales, previo inyección i.c.v., en las cuales los animales presentaron una actividad comportamental < 10 % o poco activo). Los puntos temporales en el eje x corresponden a los tiempos de comienzo de la recolección de cada muestra de 30 minutos. La inyección i.c.v. se llevó a cabo a las 11:30 horas (flecha). Los valores representan la media $\pm$ ES (n especificado en el pie de figura). *, efecto significativo de las dosis (ANOVA con diseño de medidas repetidas).

medidas repetidas, efecto de la dosis para 5-HT: $F(3,35) = 10,6$; $P \leq 0,0005$; efecto de la dosis para 5-HIAA: $F(3,35) = 14,1$; $P \leq 0,0005$). Los valores máximos de la concentración de 5-HT en respuesta a CRH y Ucn fueron alcanzados dentro de los primeros 60 minutos luego de la inyección (Figura 22A, B, Tabla 1; ANOVA, efecto del neuropéptido: $F(1,31) = 0,8$; $P > 0,05$). Sin embargo, Ucn produjo un incremento en los niveles de 5-HT significativamente más prolongado que el producido por la misma dosis de CRH, observándose este efecto en todas las dosis estudiadas (ANOVA con diseño

de medidas repetidas, interacción tiempo $\times$ neuropéptido: $F(11,385) = 2,2$; $P < 0,02$). Los niveles hipocampales de 5-HIAA permanecieron elevados por un período más prolongado que los de 5-HT. Las concentraciones máximas de 5-HIAA fueron alcanzadas en períodos significativamente diferentes para Ucn y CRH. Los valores máximos producidos por Ucn fueron observados más tarde que los de CRH, por ejemplo, entre los 120 - 150 minutos y 180 - 210 minutos para 1 μ g de CRH y Ucn, respectivamente (Figura 23A, B; ANOVA, efecto del neuropéptido: $F(1,31) = 8,4$; $P < 0,01$). Además, en comparación con CRH, Ucn provocó un aumento en los niveles de

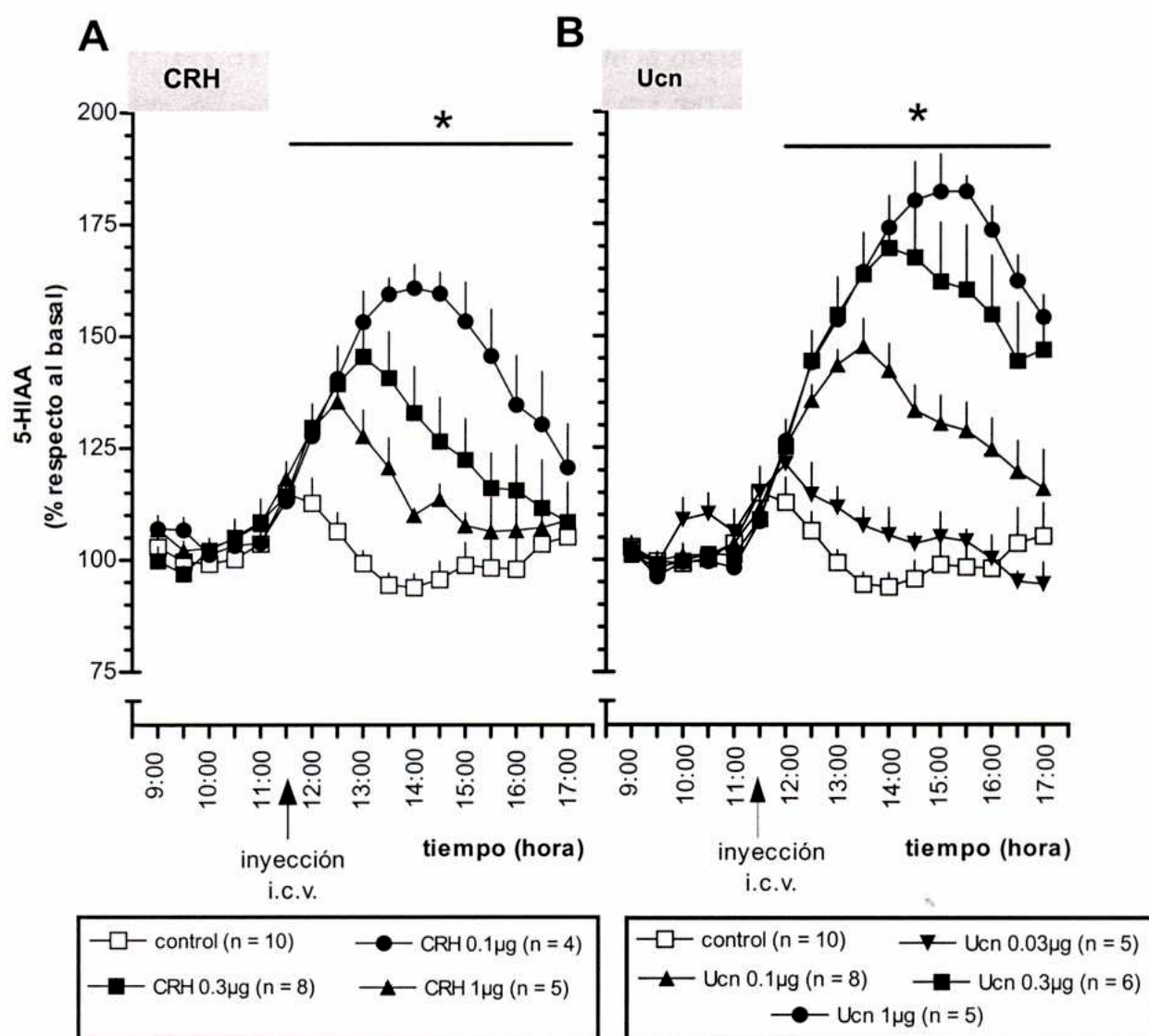


Figura 23: Efectos de la administración i.c.v. de solución salina (control) y diferentes dosis de CRH (A) y Ucn (B) sobre los niveles extracelulares de 5-HIAA hipocampal en ratas (expresados como % respecto del basal). Los experimentos comenzaron a las 9:00 horas, recolectándose muestras de 30 minutos. La inyección i.c.v. se llevo a cabo a las 11:30 horas (flecha). Los valores representan la media $\pm$ ES (n especificado en el pie de figura). *, efecto significativo de las dosis (ANOVA con diseño de medidas repetidas).

5-HIAA significativamente más prolongado que el observado para una misma dosis de CRH (ANOVA con diseño de medidas repetidas, interacción tiempo $\times$ neuropéptido: $F(11,385) = 12,5$; $P \leq 0,0005$), así como también, Ucn produjo una mayor concentración máxima de 5-HIAA (Tabla 5; ANOVA, efecto del neuropéptido: $F(1,31) = 8,8$; $P < 0,01$). Esta mayor potencia de Ucn sobre la estimulación de la neurotransmisión serotoninérgica, en comparación con CRH, fue también confirmada a través del análisis de las medias de los niveles de 5-HT y 5-HIAA alcanzados luego de la inyección. Ucn resultó significativamente más potente en el incremento de los niveles extracelulares de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo (Figura 24A y B; ANOVA, efecto del neuropéptido sobre 5-HT: $F(1,31) = 8$; $P = 0,008$; efecto de la dosis sobre 5-HT: $F(2,31) = 8,8$; $P = 0,001$; efecto del neuropéptido sobre 5-HIAA: $F(1,31) = 12$; $P = 0,002$; efecto de la dosis sobre 5-HIAA: $F(2,31) = 8,3$; $P = 0,001$). Resultados similares fueron obtenidos del análisis del área bajo la curva luego de la administración i.c.v. de ambos neuropéptidos (Tabla 5).

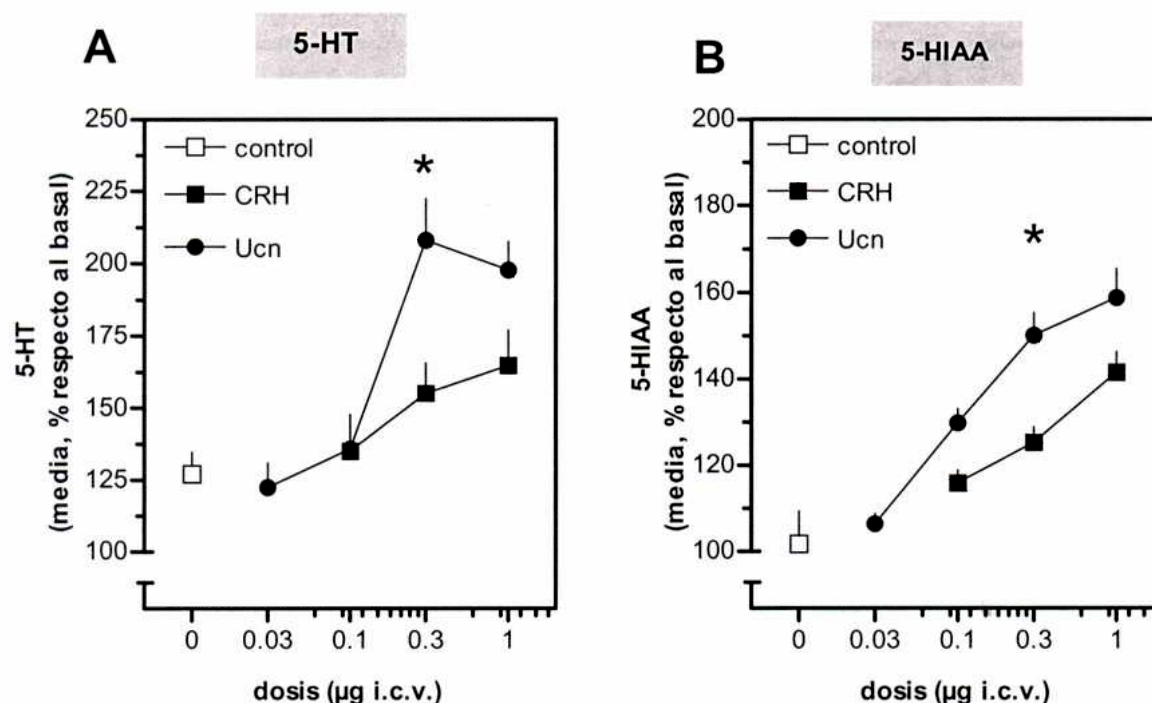


Figura 24: Media de las concentraciones de 5-HT (A) y 5-HIAA (B) hipocampal luego de la administración i.c.v. de solución salina (control) y diferentes dosis de CRH y Ucn (expresados como % respecto del basal). Los experimentos comenzaron a las 9:00 horas, recolectándose muestras de 30 minutos. La inyección i.c.v. se llevó a cabo a las 11:30 horas (flecha). Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 4 - 10$). *, significativamente diferente de ratas tratadas i.c.v. con 0,3 µg CRH (test de Duncan).

Por lo tanto, la administración i.c.v. de CRH y Ucn generó un marcado aumento en los niveles extracelulares de 5-HT y su metabolito 5-HIAA en el hipocampo, con un efecto mayor de Ucn en comparación con la administración de una misma dosis de CRH. Estos resultados sugieren la activación diferencial de los receptores de CRH.

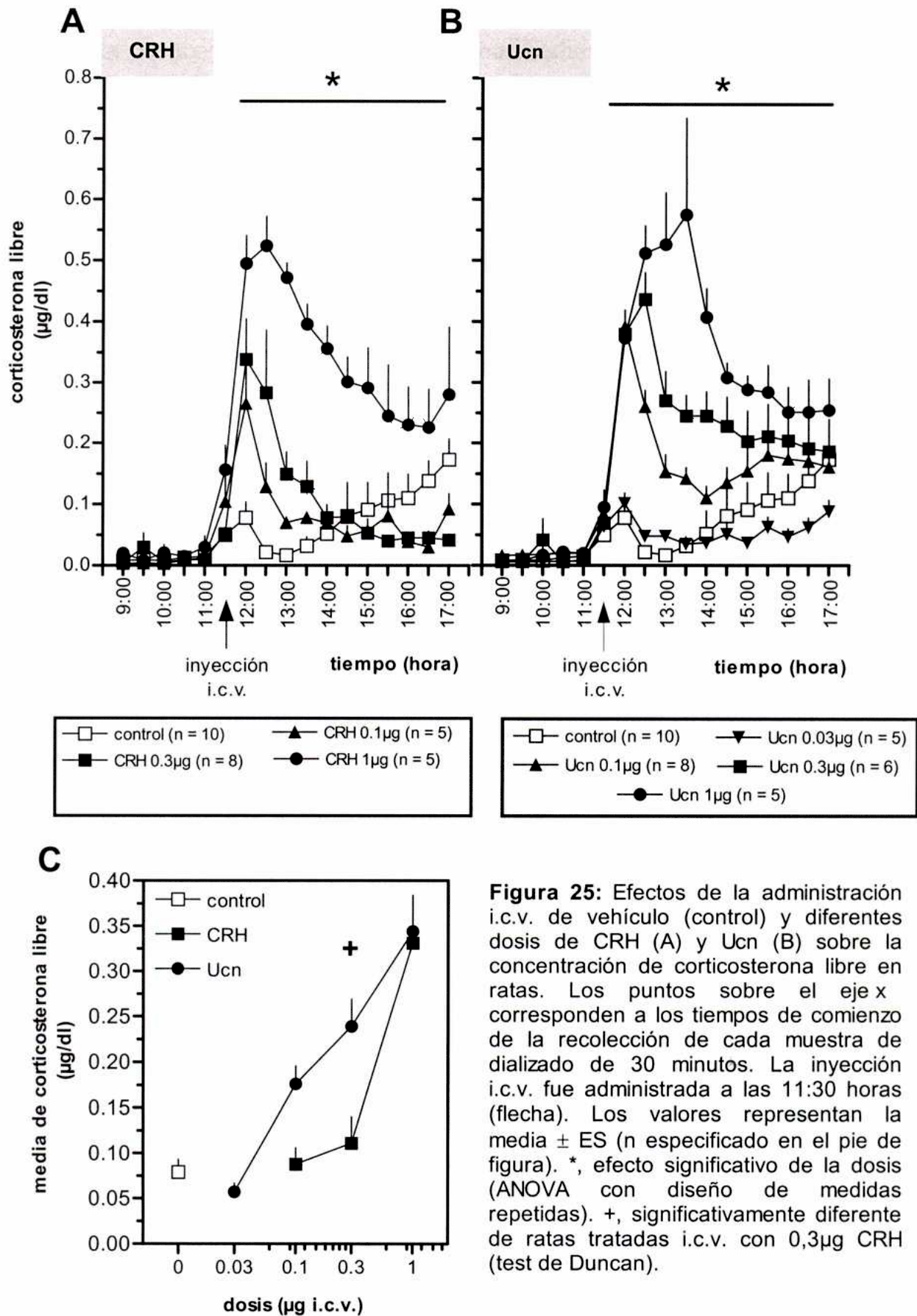
tabla 5

Parámetro tratamiento i.c.v.		máximo 5-HT (% respecto al basal)	máximo 5-HIAA (% respecto al basal)	área bajo la curva 5-HT (% respecto al basal x tiempo)	área bajo la curva 5-HIAA (% respecto al basal x tiempo)
control		195,9 ± 19,8	125,4 ± 6,4	10377,5 ± 5191,5	633,5 ± 1546,1
CRH	0,1 µg	231,1 ± 54,5	137,3 ± 3,5	14656,4 ± 5552,6	5684,9 ± 828,1
	0,3 µg	244,7 ± 13,0	151,0 ± 8,3	19942,3 ± 3183,8	9098,3 ± 2791,9
	1 µg	271,5 ± 37,6	171,2 ± 4,7	23319,3 ± 4231,6	14972,6 ± 1613,8
Ucn	0,03 µg	195,6 ± 14,7	123,8 ± 6,3	7720,3 ± 1990,4	2325,0 ± 1308,7
	0,1 µg	208,2 ± 19,1	153,4 ± 4,9 *	12968,9 ± 3719,3	10730,8 ± 1451,2
	0,3 µg	351,5 ± 59,1	173,0 ± 10,4	38605,1 ± 6375,8 *	17844,6 ± 3324,0 *
	1 µg	269,6 ± 43,1	186,8 ± 6,7	36808,6 ± 6736,2	21146,2 ± 1800,2

Tabla 5: Área bajo la curva y máximos (± ES) para 5-HT y 5-HIAA hipocampal luego de la administración i.c.v. de CRH o Ucn en ratas. Los valores máximos y el área bajo la curva fueron derivados de los cursos temporales de las respuestas de los niveles de 5-HT y 5-HIAA hipocampales a las distintas dosis de CRH y Ucn presentados en las Figuras 2 y 3. *, significativamente diferente comparado con los animales tratados con la misma dosis de CRH (P < 0,05; Test de Duncan).

4.2.2- Efectos sobre los niveles de corticosterona libre

Con el propósito de estudiar y comparar los efectos de CRH y Ucn sobre los niveles de corticosterona libre, como un parámetro de la activación del eje HPA, animales implantados con una sonda de microdiálisis, recibieron una inyección i.c.v. de solución salina, CRH (0,1; 0,3 o 1 µg/rata) o Ucn (0,03; 0,1; 0,3 o 1 µg/rata). A partir de la determinación de los niveles centrales de corticosterona libre extracelular en las muestras de dializado, se obtuvieron los resultados que se detallan en la *Figura 25*. Luego de la administración i.c.v. de solución salina, la concentración de corticosterona libre presentó un aumento transitorio, luego del cual los niveles de la hormona



retornaron a valores basales (*Figura 25A, B*). A media tarde (aproximadamente 14:00 horas), la concentración de la hormona comenzó lentamente a aumentar, correspondiendo este incremento al ritmo circadiano del esteroide. La inyección i.c.v. de CRH y Ucn generó un aumento dosis dependiente en los niveles de corticosterona libre (*Figura 25A, B; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto de la dosis* $F(3,34) = 22,9; P \leq 0,0005$). Luego del aumento de los niveles de corticosterona libre en respuesta a la administración de las dosis de 0,03 µg de Ucn y las dosis más bajas de CRH, los niveles del esteroide retornaron a valores basales. Sin embargo, el aumento asociado con el ritmo circadiano no fue observado en estos animales, permaneciendo los niveles de corticosterona por debajo de la concentración de los animales controles (*Figura 25A y B*). La administración i.c.v. de la dosis más alta de CRH (1 µg) y de las dosis bajas y altas de Ucn (0,1; 0,3; 1 µg) resultó en una respuesta bifásica de los niveles de corticosterona libre. Luego de un primer aumento dosis dependiente, los niveles del esteroide permanecieron elevados en comparación con los niveles observados en los animales tratados con vehículo (*Figura 25A, B*). El análisis de los efectos producidos por CRH y Ucn, mostró que Ucn posee un efecto más prolongado sobre los niveles de corticosterona en comparación con la misma dosis de CRH, sin embargo, el mismo no alcanzó significancia estadística (*Figura 25A, B; ANOVA con diseño de medidas repetidas, interacción tiempo x neuropéptido: F(11,374) = 1,67; P = 0,07*). No obstante, el análisis de las medias de los niveles alcanzados luego de la inyección i.c.v. de CRH y Ucn demostró también que Ucn es significativamente más potente en el incremento de los niveles de corticosterona libre (*Figura 25C; ANOVA, efecto del neuropéptido F(1,31) = 8; P = 0,008; efecto de la dosis F(2,31) = 19,2; P ≤ 0,0005*).

Por otro lado, la administración i.c.v. de CRH o Ucn (0,3 µg/rata) provocó también un marcado aumento en los niveles de ACTH y corticosterona plasmáticos (*Tabla 6*). En la serie de experimentos para el estudio de la expresión de la proteína c-fos, muestras del plasma fueron recolectadas 2 horas (momento del sacrificio del animal) después de la inyección i.c.v. de solución salina, CRH o Ucn, con el propósito de estudiar los efectos de ambos neuropéptidos sobre la activación del eje HPA y como confirmación del tratamiento. Luego de 2 horas de la administración central de CRH o Ucn, los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona se mostraron significativamente elevados en comparación con los animales tratados con solución salina, sin embargo, no fueron encontradas diferencias significativas entre ambos neuropéptidos (*Test de T de Student*

(gl: 6), $P > 0,5$).

tabla 6

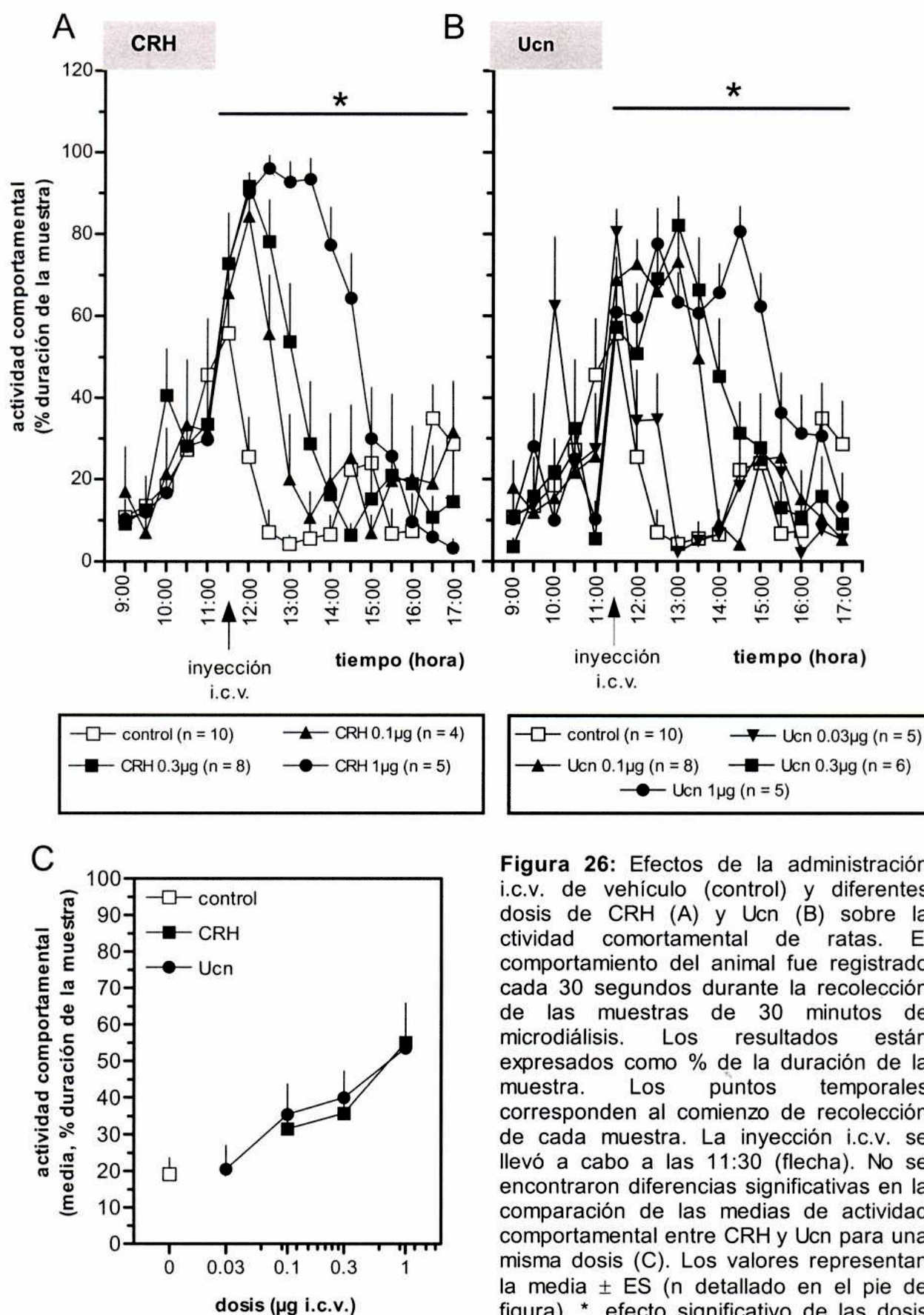
tratamiento parámetro	ACTH (pg/ml)	corticosterona (ng/ml)
sol. salina i.c.v.	32,69 ± 3,6	16,26 ± 7,63
CRH i.c.v.	144,36 ± 39,2*	196,83 ± 47,45*
Ucn i.c.v.	132,18 ± 24,8*	208,26 ± 24,24*

Tabla 6: Efectos de la administración i.c.v. de CRH o Ucn sobre los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona. Los niveles de ACTH y corticosterona fueron medidos en muestras de plasma recogidas luego de dos horas de la inyección i.c.v. Los valores representan la media ± ES (n = 4). *, $P < 0,05$ vs. animales controles (Test de T de Student).

4.2.3- Efectos sobre la actividad comportamental

Para el estudio de los efectos de la administración central de CRH y Ucn sobre la actividad comportamental en un entorno familiar, animales adaptados previamente al contacto con el experimentador, recibieron una inyección i.c.v. de solución salina, CRH (0,1; 0,3 o 1 µg/rata) o Ucn (0,03; 0,1; 0,3 o 1 µg/rata). La inyección i.c.v. de solución salina provocó un breve aumento en la actividad comportamental; mientras que, la administración i.c.v. de CRH o Ucn provocó un aumento dosis-dependiente de la actividad comportamental (*Figura 26A, B; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto de la dosis* $F(3,35) = 16,2$; $P \leq 0,0005$). Sin embargo, la activación producida por Ucn fue significativamente más prolongada en comparación con la misma dosis de CRH (*ANOVA con diseño de medidas repetidas, interacción tiempo x neuropéptido* $F(11,385) = 3$; $P = 0,001$), aunque no se observaron diferencias significativas entre los neuropéptidos en la comparación de las medias de actividad total para cada dosis (*Figura 26C; ANOVA, efecto del neuropéptido* $F(1,31) = 0,44$; $P > 0,05$; *efecto de la dosis* $F(2,31) = 13,3$; $P \leq 0,0005$).

El análisis detallado de los distintos comportamientos desarrollados por el animal en respuesta a la administración central de CRH y Ucn en un entorno familiar, indicó un patrón comportamental diferente para cada neuropéptido. Mientras que CRH (0,3 µg i.c.v.) causó un incremento en el comportamiento de exploración y de aseo, la administración de Ucn, en la misma dosis, provocó, principalmente, un aumento en el



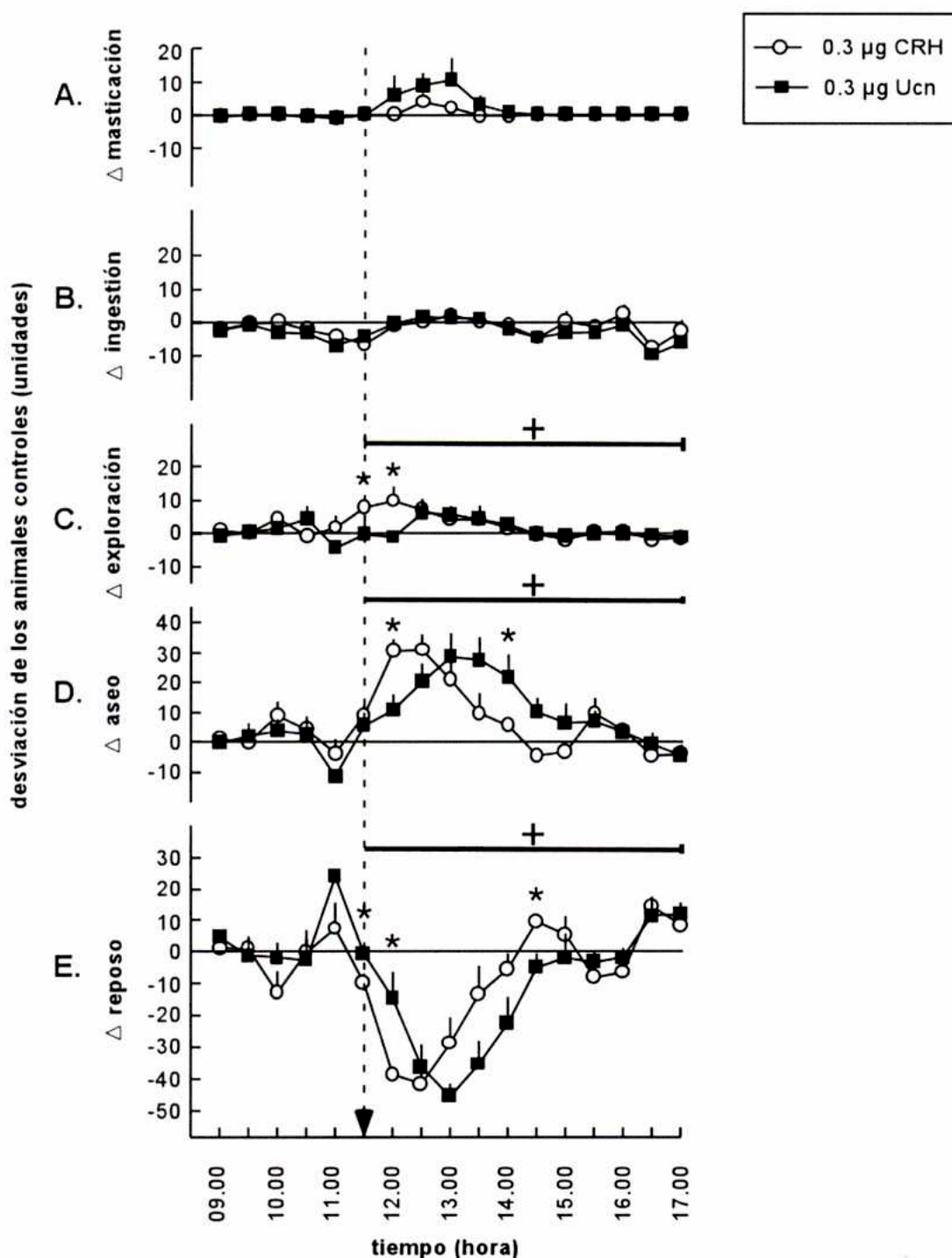


Figura 27: Efectos de la administración i.c.v. de 0,3 μ g CRH y Ucn sobre las actividades comportamentales de masticación (A), ingestión (B), exploración (C), aseo (D) y reposo (E) comparado con los animales tratados con solución salina (control). El comportamiento del animal fue registrado cada 30 segundos durante la recolección de las muestras de 30 minutos de microdiálisis. Los resultados están expresados como la diferencia entre el número de unidades observadas en los animales tratados con CRH o Ucn y los animales controles. Los animales controles están representados por la línea horizontal a $\Delta = 0$. Los puntos temporales en el eje x corresponden a los tiempos de comienzo de la recolección de cada muestra de 30 minutos. El momento de la inyección i.c.v. (11:30 horas) está indicado por una flecha. Los valores representan la media $\pm$ ES (CRH n = 8; Ucn n = 6). +, interacción significativa tiempo x neuropéptido (ANOVA con diseño de medidas repetidas). *, diferencia significativa entre CRH y Ucn (T-test de Student).

comportamiento de aseo (*Figura 27; ANOVA con diseño de medidas repetidas; exploración: interacción tiempo x neuropéptido* $F(11,132) = 1,9; P < 0,05$; aseo: *interacción tiempo x neuropéptido* $F(11,132) = 3,6; P \leq 0,0005$; *datos similares fueron obtenidos para las otras dosis estudiadas*). Además, la administración de ambos neuropéptidos desencadenó el desarrollo de actividad masticatoria, un comportamiento que no es frecuente en condiciones basales. Esta actividad masticatoria consiste en movimientos repetitivos de la boca, pero sin consumo de alimento o agua. Se observó una tendencia hacia un mayor efecto de Ucn sobre esta actividad, sin embargo, esta diferencia no alcanzó significancia estadística.

4.2.4- Efectos de la adrenalectomía sobre la acción central de CRH en ratas

Con el propósito de estudiar si los efectos de la administración i.c.v. de CRH sobre la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo y la actividad comportamental son mediados por la corticosterona, animales adrenalectomizados y operados-contróles recibieron una dosis central de CRH. Como se describió previamente, la administración i.c.v. de 1 μg de CRH generó un aumento significativo en los niveles extracelulares de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo (*Tabla 7*). La remoción de las glándulas adrenales dos días antes del experimento, no afectó los cambios producidos por CRH en los niveles

tabla 7

Parámetro Tratamiento		5-HT (% respecto al basal)	5-HIAA (% respecto al basal)
control	sol. salina i.c.v. (n = 7)	115,6 $\pm$ 5,7	103,3 $\pm$ 2,6
	CRH i.c.v. (n = 6)	156,3 $\pm$ 8,8 *	136,3 $\pm$ 5,8 *
ADX	sol. salina i.c.v. (n = 7)	108,4 $\pm$ 4,5	104,2 $\pm$ 1,5
	CRH i.c.v. (n = 6)	163,7 $\pm$ 5,2 *	135,3 $\pm$ 3,9 *

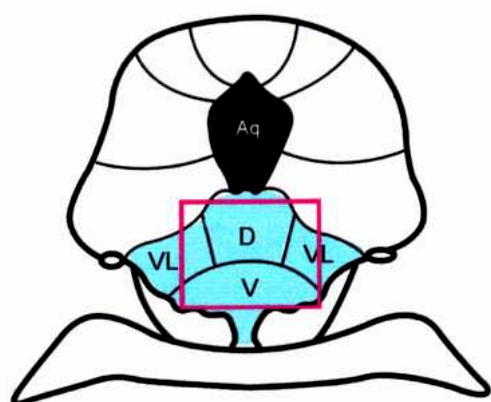
Tabla 7: Media de los niveles extracelulares de 5-HT y 5-HIAA hipocampal (% respecto al basal; $\pm$ ES) luego de la administración i.c.v. de solución salina (control) o 1 μg CRH en ratas adrenalectomizadas (ADX) y operadas-contróles. *, efecto significativo comparado con animales tratados i.c.v. con sol. salina y que presentan el mismo tratamiento quirúrgico ($P < 0,05$; Test de Duncan).

hipocampales de 5-HT y 5-HIAA (ANOVA; efecto de ADX sobre 5-HT: $F(1,22) = 0,001$; $P > 0,05$; efecto de ADX sobre 5-HIAA: $F(1,22) = 0,003$; $P > 0,05$). Además, la administración central de CRH originó un patrón comportamental similar entre las ratas ADX y las operadas-contróles (datos no presentados).

4.3- Efectos de la administración i.c.v. de CRH/Ucn sobre la expresión de c-fos en el SNC de ratas

Con el propósito de establecer la extensión de las áreas activadas por la administración central de CRH y Ucn, se analizaron los efectos de estos neuropéptidos sobre la expresión de la proteína c-fos, como un marcador de la activación neuronal, mediante la técnica de inmunohistoquímica. Animales que recibieron una inyección i.c.v. de solución salina, CRH o Ucn (0,3 µg/rata) fueron sacrificados a las dos horas para el análisis de los efectos sobre la inducción de c-fos. Este período de 2 horas fue seleccionado debido a que es el tiempo requerido para la máxima expresión de la proteína c-fos (Herdegen y Leah, 1998).

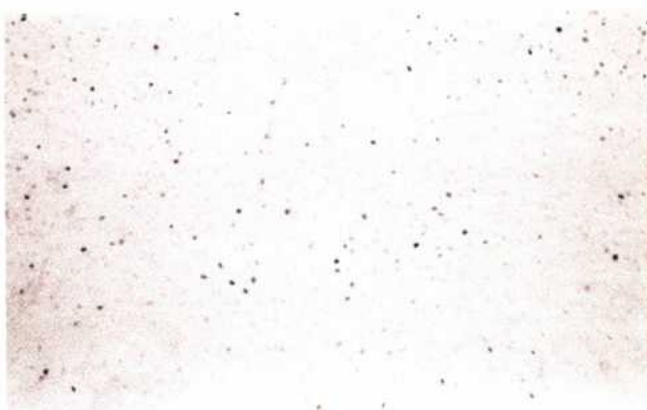
La expresión de c-fos en los animales controles fue baja o indetectable en la mayoría de las regiones del SNC analizadas (*Figuras 28, 29 y 30*), sin embargo, la administración i.c.v. de CRH o Ucn estimuló con gran intensidad y de una manera extensa, la expresión de c-fos en el SNC. En respuesta a la administración de CRH o Ucn se observó una marcada activación de la expresión de c-fos en toda la corteza cerebral, mientras que una activación moderada fue detectada, por ejemplo, en el NRD (*Figuras 28*). Una leve estimulación fue observada también en el NRM, PVN y semptum lateral. En determinadas áreas la administración de CRH o Ucn provocó una inducción diferencial de c-fos. La amígdala central y el BNST son ejemplos de esto (*Figura 30*). En estas áreas Ucn provocó un marcado y bien definido aumento en comparación con la activación producida por CRH. Por el contrario, el hipocampo dorsal mostró una inducción de c-fos más marcada en animales inyectados con CRH (*Figura 29*). La *tabla 8* presenta un resumen de las áreas analizadas y de la comparación de los efectos de ambos neuropéptidos con respecto a los animales controles.



Salina



CRH



Ucn

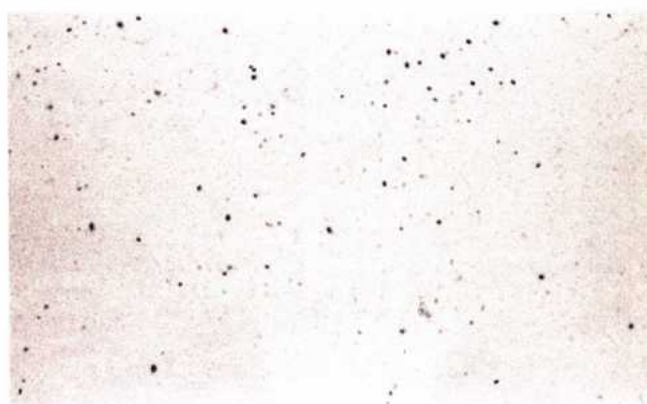
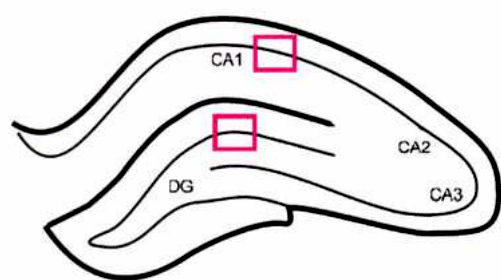


Figura 28: Expresión de c-fos en el núcleo del rafe dorsal de rata en respuesta a la administración i.c.v. de solución salina, CRH o Ucn ($0,3 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rata}$). Mediante la técnica de inmunohistoquímica se analizó la expresión de c-fos en cortes de cerebros de animales sacrificados luego de 2 horas de la inyección i.c.v. El esquema detalla las áreas dorsal (D), ventral (V) y ventrolaterales (VL) del NRD que se observan en las fotografías (100x de aumento) de los preparados.



Salina



CRH



Ucn



CA1

DG

Figura 29: Efectos de la administración i.c.v. de solución salina, CRH o Ucn ($0,3 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ /rata) sobre la expresión de c-fos en el hipocampo de rata. Mediante la técnica de inmunohistoquímica se analizó la expresión de c-fos en cortes de cerebros de animales sacrificados luego de 2 horas de la inyección i.c.v. Las fotografías de los preparados muestran una perspectiva general del hipocampo (40x de aumento) y detalles de las áreas CA1 y dentata gyrus (DG) (200x de aumento), las cuales se encuentran remarcadas en el esquema superior.

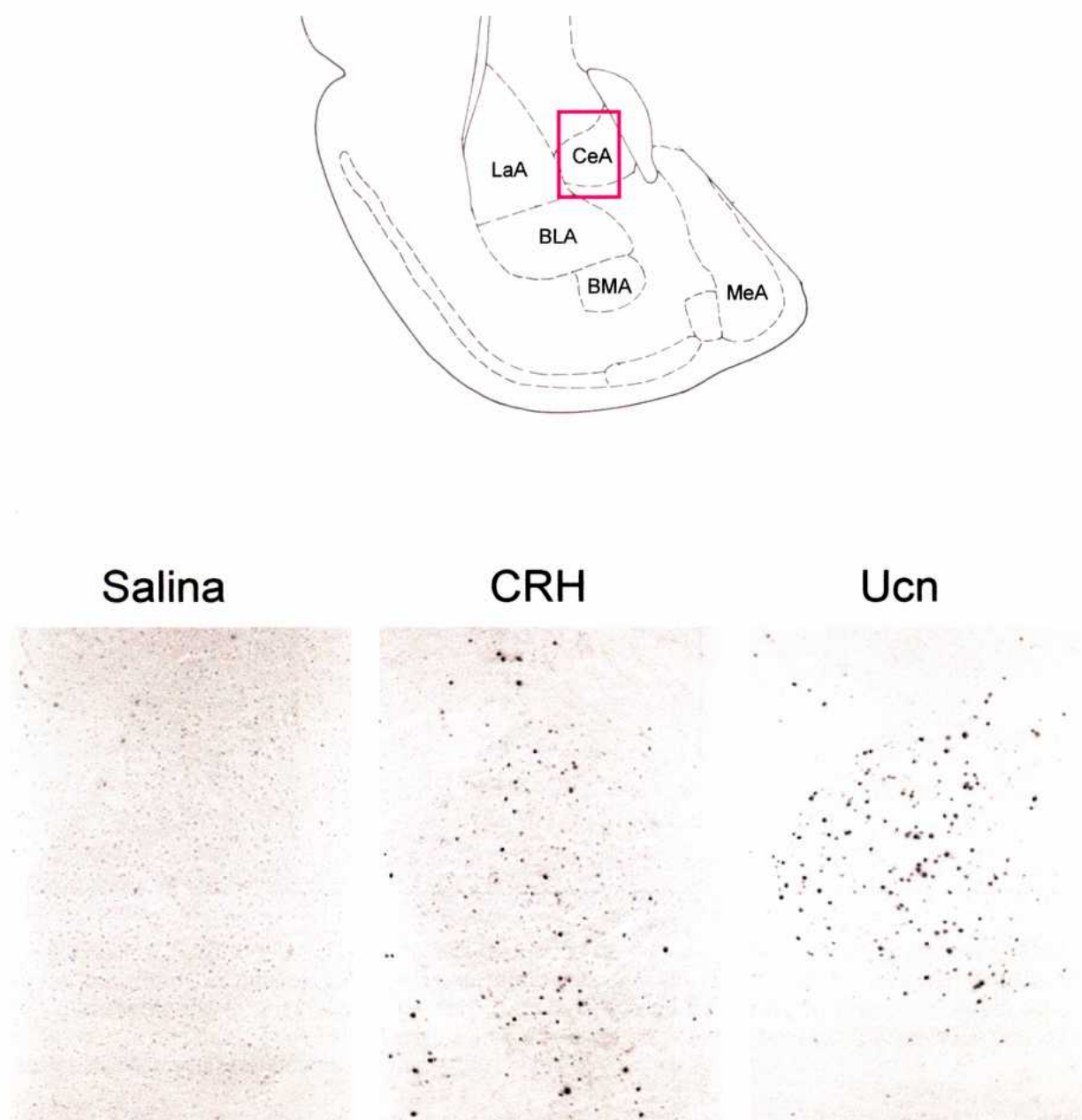


Figura 30: Expresión de c-fos en el núcleo central de la amígdala de ratona en respuesta a la administración i.c.v. de solución salina, CRH o Ucn (0,3 µg/ratona). La expresión de c-fos fue analizada mediante la técnica de inmunohistoquímica en cerebros de animales sacrificados luego de 2 horas de la inyección i.c.v. El esquema de la parte superior muestra una perspectiva general de los núcleos de la amígdala lateral (LaA), basolateral (BLA), basomedial (BMA), medial (MeA) y remarca a la amígdala central (CeA) que se observa en las fotografías (100x de aumento) de los preparados.

Tabla 8

área cerebral	expresión de c-fos	
	CRH i.c.v.	Ucn i.c.v.
Corteza cerebral		
Piriforme	+++	+++
Frontal/parietal	++++	++++
Núcleo accumbens	+	++
Hipocampo	++	+
BNST	+	+++
Amígdala		
Central	+++	++++
Basolateral	++	+
Septum Lateral	+	+
Hipotálamo		
Núcleo paraventricular	+	+
Núcleos del raphe		
Dorsal	++	++
Medio	-/+	-/+
Locus coeruleus	++	++
Cerebelo	+++	+++

Tabla 8: Efectos de CRH y Ucn i.c.v. sobre la expresión de c-fos en determinadas áreas específicas (4 animales por grupo). La calificación refleja básicamente la densidad de células positivamente marcadas, con (-) representando la ausencia de diferencia en la densidad de marca con respecto al control. (+) algunas células positivas; (+++++) máxima densidad de marca positiva, la mayor parte de las células de la estructura respondieron positivamente.

4.4- Efectos de la deficiencia del gen del CRH-R1 en ratones

Sobre la base de los resultados anteriores, en los cuales se observaron diferencias en la potencia de estimulación de CRH y Ucn sobre la neurotransmisión serotoninérgica, la activación del eje HPA y la actividad comportamental en ratas, se realizaron otros estudios tendientes a establecer la participación diferencial de los receptores de CRH en dichas acciones. Con este objetivo, se utilizaron ratones transgénicos deficientes del gen del CRH-R1. Mediante este modelo animal se analizaron los efectos de la disfunción permanente del CRH-R1 sobre los niveles de corticosterona libre, la neurotransmisión serotoninérgica y actividad comportamental bajo condiciones basales

y en respuesta al estrés por natación forzada.

4.4.1- Efectos sobre los niveles de corticosterona libre

Los niveles de corticosterona libre mostraron un claro ritmo circadiano en los ratones de cepa salvaje y en los animales heterocigotas deficientes del receptor de CRH tipo 1 (-/+), con bajos niveles durante las horas de la mañana y con un aumento gradual hacia el final de la fase luminosa, comenzando entre las 12:00 y 14:00 horas (*Figura 31; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del tiempo: $F(17,323) = 27,68$; $P \leq 0,0005$*). Un efecto dependiente de la presencia o ausencia del CRH-R1 funcional fue observado, ya que los ratones de la cepa salvaje presentaron niveles de corticosterona

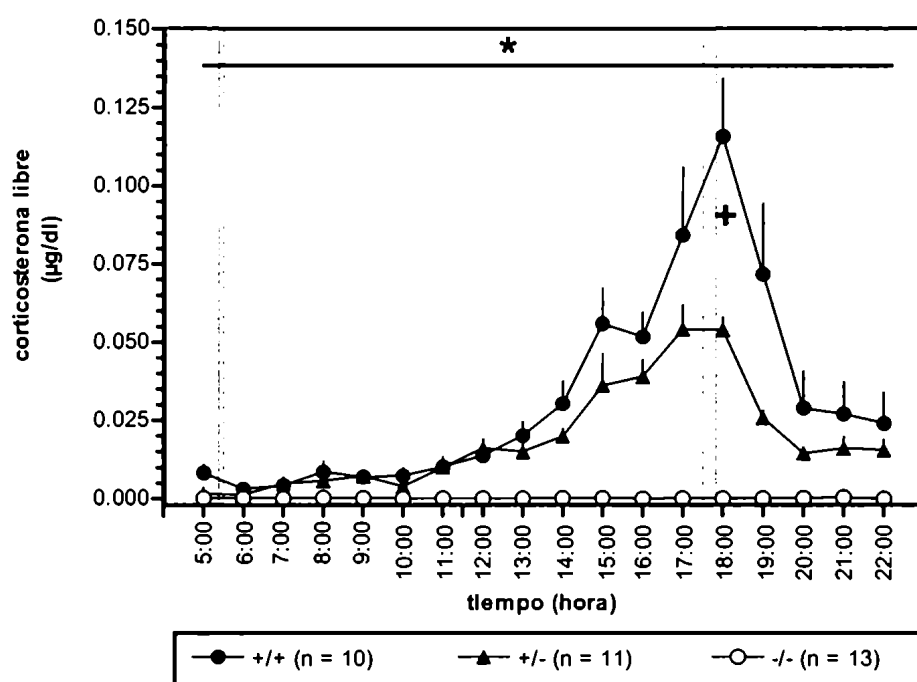


Figura 31: Niveles extracelulares de corticosterona libre en ratones de cepa salvaje y en ratones deficientes de CRH-R1 durante parte del ciclo de luz/oscuridad (µg/dl). Muestras de dializado fueron recolectadas cada 30 minutos, siendo luego agrupadas de a dos para la determinación de la concentración de corticosterona libre, resultando así un valor por cada hora experimental. Los puntos temporales sobre el eje x corresponden al tiempo en que se comenzó a recolectar la primer muestra (de 2). Las áreas sombreadas indican los períodos de oscuridad. Los valores están expresados en media $\pm$ ES (n especificado al pie de figura). Los niveles de corticosterona libre para los ratones knock-out (-/-) estuvieron por debajo del límite de detección. *, efecto significativo del tiempo y de la interacción tiempo x genotipo (ANOVA con diseño de medidas repetidas). +, diferencia significativa entre ratones heterocigotas y de cepa salvaje (test de T de Student para la media de cada período, $P < 0,05$).

significativamente más elevados que los ratones heterocigotas (ANOVA con diseño de medidas repetidas, interacción tiempo $\times$ genotipo: $F(17,323) = 3,48$; $P < 0,0005$; efecto del genotipo: $F(1,19) = 4,2$; $P = 0,055$), mientras que para los ratones homocigotas deficientes del CRH-R1 el nivel de corticosterona libre se encontró por debajo del límite de detección del radioinmunoensayo (Figura 31).

4.4.2- Efectos sobre la actividad comportamental durante el ciclo de luz/oscuridad

El análisis de la actividad comportamental total desarrollada por los ratones entre las 5:00 y 23:00 horas exhibió también un claro ritmo circadiano, con un nivel de actividad más bajo durante la fase luminosa en comparación con la fase oscura (Figura 32; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del período de tiempo: $F(1,33) = 160,37$; $P \leq 0,0005$; interacción período de tiempo $\times$ genotipo: $F(2,33) = 0,89$; $P > 0,05$). Sin embargo, los ratones CRH-R1 (-/-) se mostraron significativamente más activos que

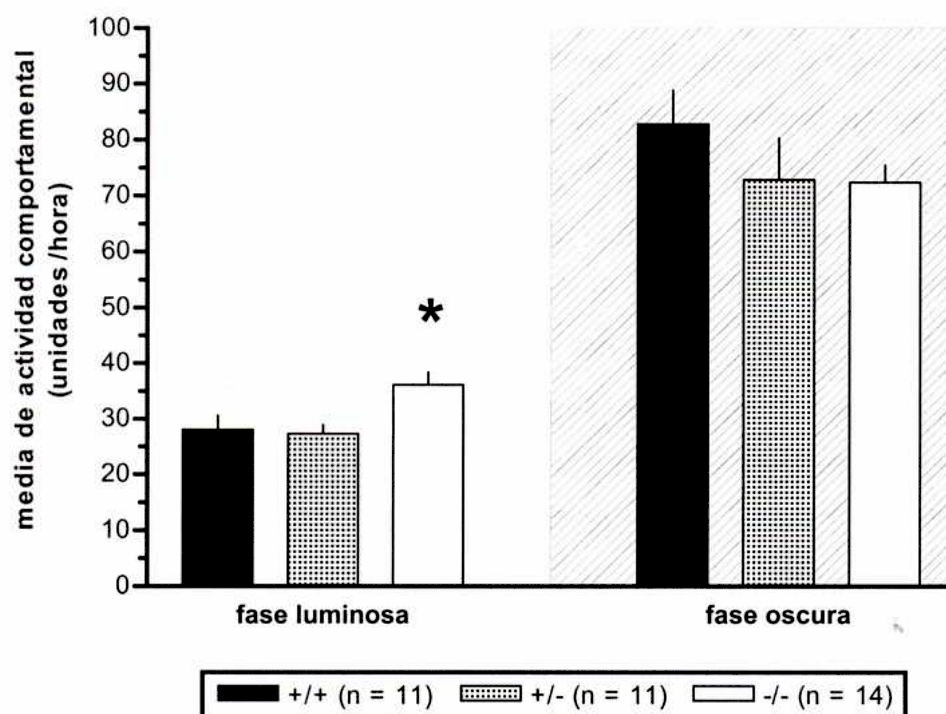


Figura 32: Actividad comportamental total de los ratones de cepa salvaje y ratones heterocigotas y homocigotas deficientes de CRH-R1 durante los períodos de luz y oscuridad. La actividad comportamental (categorizada en aseo, exploración e ingestión) fue registrada cada 30 segundos y calculada como unidades por hora. Los valores representan la media $\pm$ ES (n especificado al pie de la figura). *, los ratones knock-out de CRH-R1 difieren significativamente de los heterocigotas y los de cepa salvaje (test de Duncan).

los animales CRH-R1 (+/+) y CRH-R1 (-/+) durante la fase luminosa (*Figura 32*). Un análisis más detallado de la actividad comportamental desarrollada por los animales demostró que los ratones homocigotas deficientes de CRH-R1 presentaron una tendencia hacia una mayor actividad de aseo ($P = 0,084$; datos no mostrados).

4.4.3- Efectos sobre los niveles de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo durante el ciclo de luz/oscuridad

Los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo mostraron también un claro ritmo circadiano, con una concentración de 5-HT baja durante la fase luminosa, y con un aumento durante la fase oscura. No se encontraron diferencias en el curso temporal, así como entre los niveles de 5-HT exhibidos por los tres genotipos de ratones estudiados (*Figura 33A; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del tiempo: $F(4,92) = 36,78$; $P \leq 0,0005$; efecto del genotipo: $F(2,23) = 1,89$; $P > 0,05$*). La concentración hipocámpal de 5-HIAA también mostró un claro ritmo circadiano con bajos niveles durante la fase luminosa en comparación con la fase oscura (*Figura 33B; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del tiempo: $F(4,100) = 33,3$; $P \leq 0,0005$*). Los ratones CRH-R1 (-/-) presentaron, sin embargo, niveles de 5-HIAA significativamente más elevados que los ratones CRH-R1 (+/+) y CRH-R1 (-/+), durante ambas fases del ciclo de luz/oscuridad (*Figura 33B y tabla 9; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del genotipo: $F(2,25) = 5,61$; $P = 0,01$*). Por lo tanto, la disfunción del CRH-R1 resulta en una alteración en la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo. Cabe aclarar que los niveles elevados de 5-HIAA presentes en los ratones homocigotas deficientes de CRH-R1 no fueron debidos a diferencias en las condiciones de microdiálisis, así como tampoco a una diferente localización neuroanatómica de la sonda.

Una correlación lineal positiva entre los niveles extracelulares de 5-HT o 5-HIAA, y los estados comportamentales, fue observada durante el período de luz/oscuridad (*Tabla 9 y 10; MANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del estado comportamental sobre 5-HT: $F(2,44) = 124,6$; $P \leq 0,0005$; efecto del estado comportamental sobre 5-HIAA: $F(2,48) = 68,2$; $P \leq 0,0005$*). Esta relación se mantuvo en los tres genotipos de ratones sin diferencias significativas entre ellos (*Tabla 9 y 10; MANOVA con diseño de medidas repetidas, interacción estado comportamental x genotipo para 5-HT: $F(4,44) = 1,11$; $P > 0,05$; interacción estado comportamental x genotipo para 5-HIAA: $F(4,48) = 1,34$; $P > 0,05$*). Una relación similar a la de los niveles de 5-HT o 5-HIAA y el estado

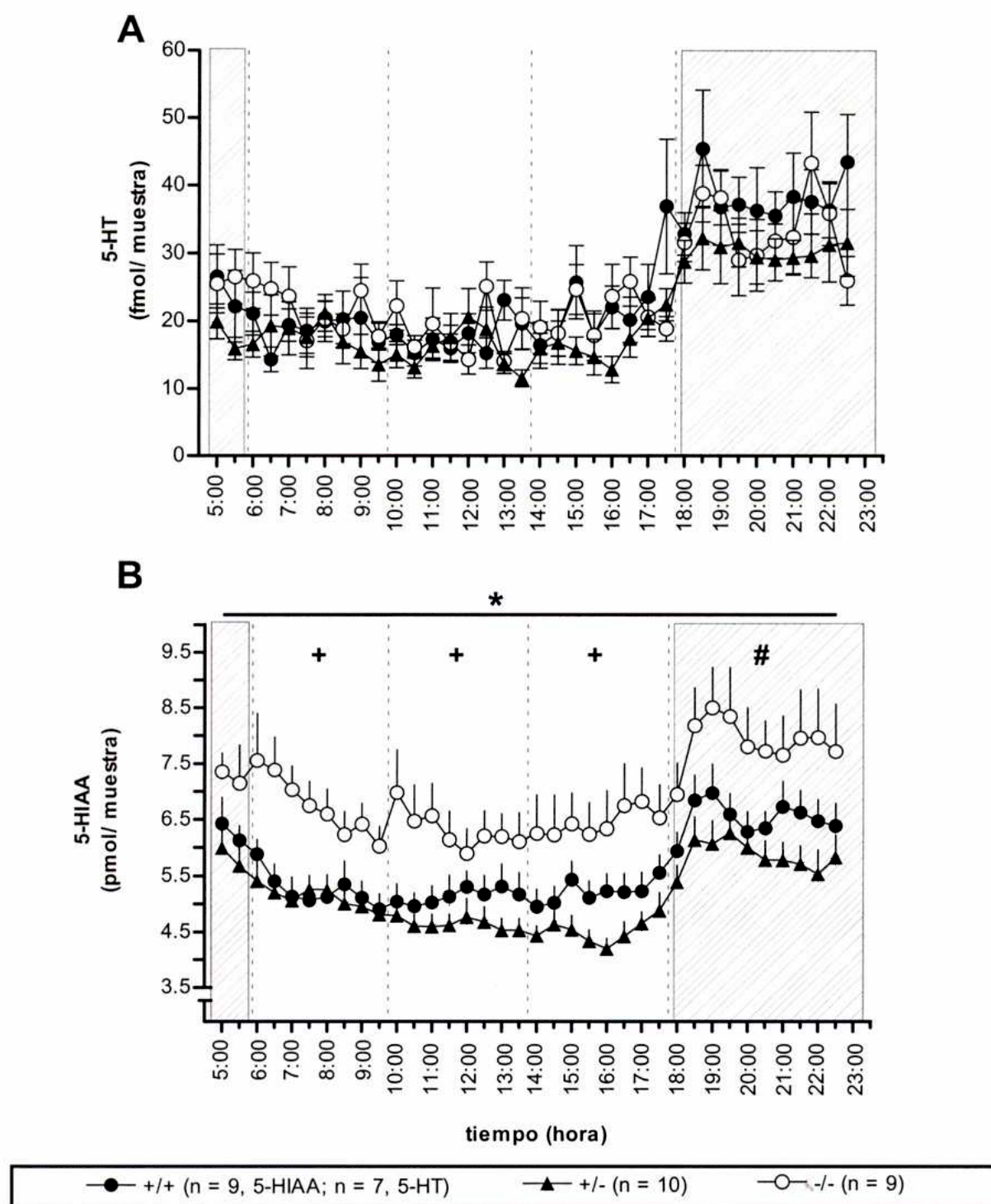


Figura 33: Niveles extracelulares de serotonina (A) y 5-HIAA (B) hipocámpal en ratones de cepa salvaje y ratones heterocigotas y homocigotas deficientes de CRH-R1 durante el ciclo de luz/oscuridad. Las muestras de microdiálisis fueron recolectadas cada 30 minutos. Los puntos temporales sobre el eje x indican el momento del inicio de la recolección de la muestra. Las áreas sombreadas indican el período de oscuridad. Los valores representan la media $\pm$ ES (n especificado en el pie de figura). Las líneas punteadas indican los períodos en los cuales los resultados fueron agrupados para el análisis estadístico por ANOVA con diseño de medidas repetidas. *, efecto significativo del genotipo (ANOVA). +, los ratones knock-out difieren significativamente de los ratones +/- y +/+ de CRH-R1; #, los ratones (-/-) del receptor difieren significativamente de los ratones heterocigotas (test de Duncan para las medias de los períodos).

comportamental durante la fase luminosa fue observada también durante las horas de la fase oscura analizadas. Es interesante destacar que la comparación de los niveles de 5-HT y 5-HIAA para un mismo estado de actividad comportamental durante ambas fases del ciclo de luz/oscuridad, mostró que los niveles fueron significativamente más elevados durante la fase oscura (Tabla 9 y 10). Probablemente, dicho incremento en los niveles de 5-HT y 5-HIAA durante la fase oscura fueron debidos a la actividad comportamental más prolongada que los animales desarrollan durante ese período.

Tabla 9

Genotipo	5-HT (fmol/30 min muestra)				
	período de luz			período de oscuridad	
	actividad 1 "poco activo"	actividad 2 "activo"	actividad 3 "muy activo"	actividad 2 "activo"	actividad 3 "muy activo"
+/+ CRH-R1	15,12 ± 1,72	23,18 ± 2,70 *	30,96 ± 3,50 * ^a	26,08 ± 3,09	37,83 ± 4,14 ^b
-/+ CRH-R1	12,05 ± 1,42	17,64 ± 1,89 *	26,96 ± 3,06 * ^a	23,56 ± 2,54 ^b	32,13 ± 3,60 ^a
-/- CRH-R1	13,79 ± 1,08	20,76 ± 1,72	32,81 ± 2,48 * ^a	26,75 ± 2,77 ^b	37,72 ± 3,44 ^{a b}

Tabla 10

Genotipo	5-HIAA (fmol/30 min muestra)				
	período de luz			período de oscuridad	
	actividad 1 "poco activo"	actividad 2 "activo"	actividad 3 "muy activo"	actividad 2 "activo"	actividad 3 "muy activo"
+/+ CRH-R1	4,95 ± 0,27	5,31 ± 0,29 *	5,68 ± 0,33 * ^a	6,47 ± 0,38 ^b	6,56 ± 0,36 ^b
-/+ CRH-R1	4,53 ± 0,22	4,72 ± 0,20 *	5,24 ± 0,28 * ^a	5,67 ± 0,33 ^b	6,06 ± 0,36 ^{a b}
-/- CRH-R1	6,21 ± 0,53 ^{c d}	6,39 ± 0,42 ^{c d}	7,14 ± 0,58 ^{a c d}	7,54 ± 0,67 ^{b d}	8,03 ± 0,68 ^{a b c d}

Tabla 9 y 10: Niveles extracelulares de serotonina y 5-HIAA en el hipocampo de ratones de cepa salvaje y heterocigotas y homocigotas de la supresión de CRH-R1 durante diferentes estados comportamentales (ver descripción en métodos) desarrollados en los períodos de luz/oscuridad. Los valores representan la media ± ES (n = 7 - 10). *, P < 0,05 vs. estado de actividad 1; ^a, P < 0,05 vs estado de actividad 2 registrado durante la misma fase del ciclo de luz/oscuridad; ^b, P < 0,05 vs. el mismo estado de actividad durante la fase luminosa (Test de T de Student pareado); ^c, P < 0,05 vs. ratones de cepa salvaje; ^d P < 0,05 vs. heterocigotas de deficientes de CRH-R1 (ambos por Test de Duncan). En ninguno de los animales se observó el estado de actividad comportamental 1 durante la fase oscura.

4.4.4- Efectos del estrés por natación forzada sobre los niveles de serotonina y 5-HIAA en el hipocampo

Para estudiar el rol de CRH-R1 en la respuesta de la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo frente a una situación de estrés, los animales fueron sometidos a natación forzada por 10 minutos. Los niveles de 5-HT y 5-HIAA fueron medidos antes y después de la exposición de los animales al estrés. Los ratones fueron sometidos al estrés por natación forzada al día siguiente del estudio del ritmo circadiano de los niveles de 5-HT y 5-HIAA bajo condiciones basales. Cabe remarcar que las concentraciones basales de 5-HT y 5-HIAA previas al estrés por natación forzada fueron similares a las observadas durante el día anterior, para todos los genotipos.

En los ratones CRH-R1 (+/+), el estrés por natación forzada provocó un aumento en los niveles extracelulares de 5-HT de un 150 % con respecto al basal, seguido de un aumento mayor, aproximadamente 200 %, luego de finalizado el estrés (*Figura 34A; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del tiempo: $F(10,150) = 7,9; P \leq 0,0005$*). El estrés por natación forzada originó también un aumento en los niveles de 5-HT en los ratones hetero- y homocigotas deficientes del CRH-R1. Sin embargo, la respuesta de 5-HT al estrés fue significativamente mayor en los ratones CRH-R1 (-/+) y CRH-R1 (-/-) en comparación con los ratones CRH-R1 (+/+) (*Figura 34A; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del genotipo: $F(2,15) = 3,7; P < 0,05$*). Durante el procedimiento de estrés los niveles de 5-HT hipocampal aumentaron un 200 % con respecto al basal en los ratones CRH-R1 (-/-), llegando a un aumento del 300 % entre los 30 y 45 minutos luego de finalizado el proceso de estrés.

La natación forzada provocó una pequeña, pero significativa, disminución en los niveles extracelulares de 5-HIAA en los ratones de cepa salvaje, pero este efecto no se observó en los ratones de los otros dos genotipos (*Figura 34B*). Durante los primeros 15 minutos luego de finalizada la natación forzada, la concentración de 5-HIAA fue similar a la basal. Después de ese intervalo, sin embargo, los niveles de 5-HIAA aumentaron marcadamente, presentando los tres genotipos niveles máximos similares, entre 120 - 130 % con respecto al basal (*Figura 34B; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del tiempo: $F(10,150) = 21,93; P \leq 0,0005$; efecto del genotipo $F(2,15) = 0,59; P > 0,05$*).

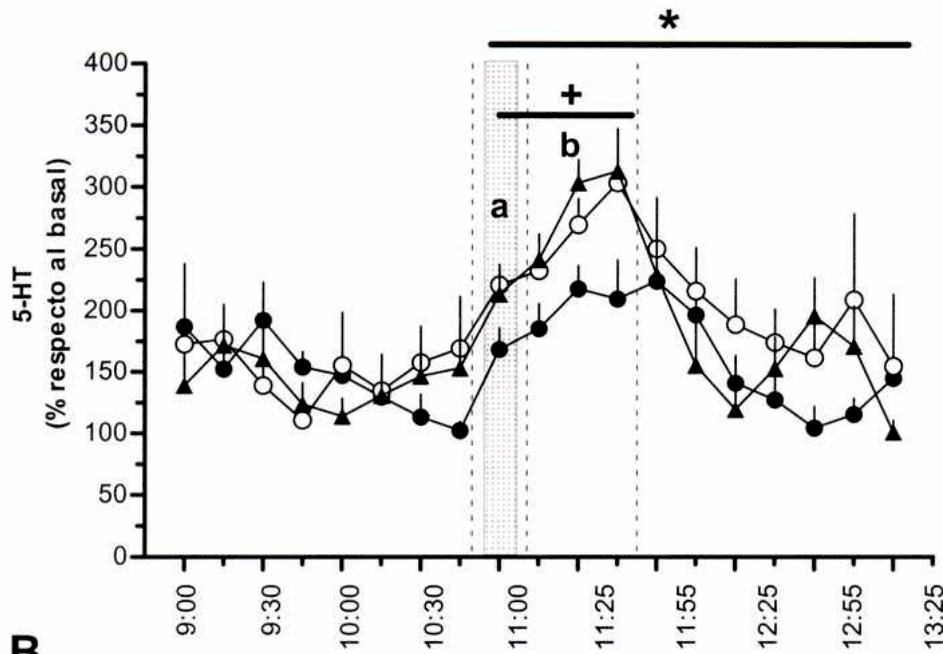
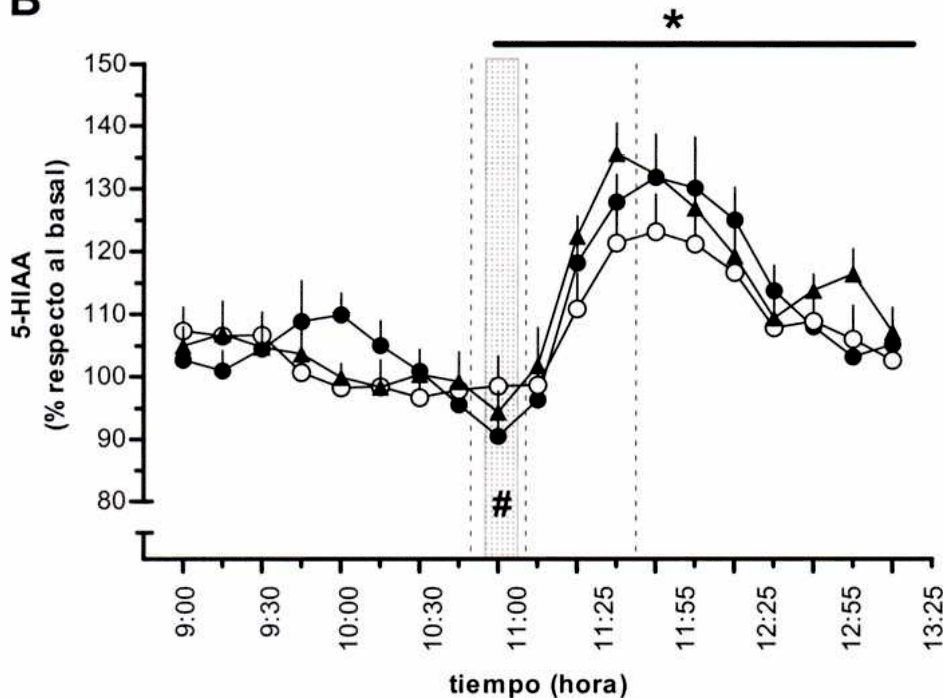
A**B**

Figura 34: Efectos de la natación forzada sobre los niveles hipocampales extracelulares de 5-HT (A) y 5-HIAA (B) en ratones de cepa salvaje y hetero- y homocigotas deficientes de CRH-R1 (expresado como % respecto al basal). Las variaciones en los niveles pre-estrés son debidas al normal desarrollo de la actividad por los animales y no se encontraron diferencias entre los genotipos. Los animales fueron sometidos a natación forzada por 10 minutos en agua a 25 °C. Las muestras de microdiálisis fueron recolectadas cada 15 minutos, excepto durante el procedimiento de natación (10 minutos de duración). El eje x representa los tiempos en los cuales cada muestra comenzó a ser recolectada. El área punteada muestra el momento donde se llevo a cabo la natación forzada (11:00 - 11:10 horas). Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6). *, efecto del tiempo (ANOVA, con diseño de medidas repetidas).+, efecto del genotipo (ANOVA). ^a, los ratones (-/-) de CRH-R1 difieren significativamente de los ratones de cepa salvaje; ^b, los ratones (+/-) difieren significativamente de los ratones de cepa salvaje (test de Duncan). #, los niveles de 5-HIAA en los ratones de la cepa salvaje durante la natación son significativamente diferentes de los niveles basales (test de T pareado para la media del periodo).

4.4.5- Efectos del estrés por natación forzada sobre la actividad comportamental

Durante el tercer día experimental los animales fueron sometidos al estrés por natación forzada, y el rol de CRH-R1 en la respuesta de la actividad comportamental frente a dicha situación fue analizado. El comportamiento de los animales en condiciones basales, previo al procedimiento de estrés, fue similar entre los tres genotipos de ratones (*Figura 35*). El comportamiento durante el procedimiento de estrés por natación forzada no fue analizado en detalle, de todas maneras, se consideró el tiempo en el cual los ratones comenzaban a permanecer inmóviles o a flotar. Los ratones nadaron durante los primeros 2 - 4 minutos, permaneciendo luego básicamente flotando. Todos los genotipos mostraron un patrón comportamental similar, sin diferencias aparentes. Un aumento en la actividad fue observada durante los 45 - 60 minutos después de finalizado el procedimiento de estrés, sin diferencias entre los genotipos (*Figura 35D*; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del tiempo: $F(9,135) = 16,6$; $P \leq 0,0005$; sin otro efecto significativo). Durante los primeros 30 minutos luego de la natación forzada la actividad comportamental principal fue el aseo, mientras que durante la segunda media hora consistió en aseo y exploración (*Figura 35A y B*). No se observaron diferencias significativas entre los tres genotipos en cuanto al comportamiento de aseo luego del estrés (*Figura 35A*, ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del tiempo: $F(9,135) = 25$; $P > 0,0005$; sin otro efecto significativo). Sin embargo, durante los primeros 45 minutos luego de terminada la natación forzada, los ratones heterocigotas mostraron un mayor comportamiento de exploración que los ratones de cepa salvaje y homocigotas deficientes del CRH-R1 (*Figura 35B*; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del tiempo: $F(9,135) = 5,37$; $P \leq 0,0005$; interacción tiempo x genotipo: $F(9,135) = 19,01$; $P < 0,05$). No se observaron efectos significativos del estrés por natación forzada sobre el comportamiento de alimentación o bebida (*Figura 35C*).

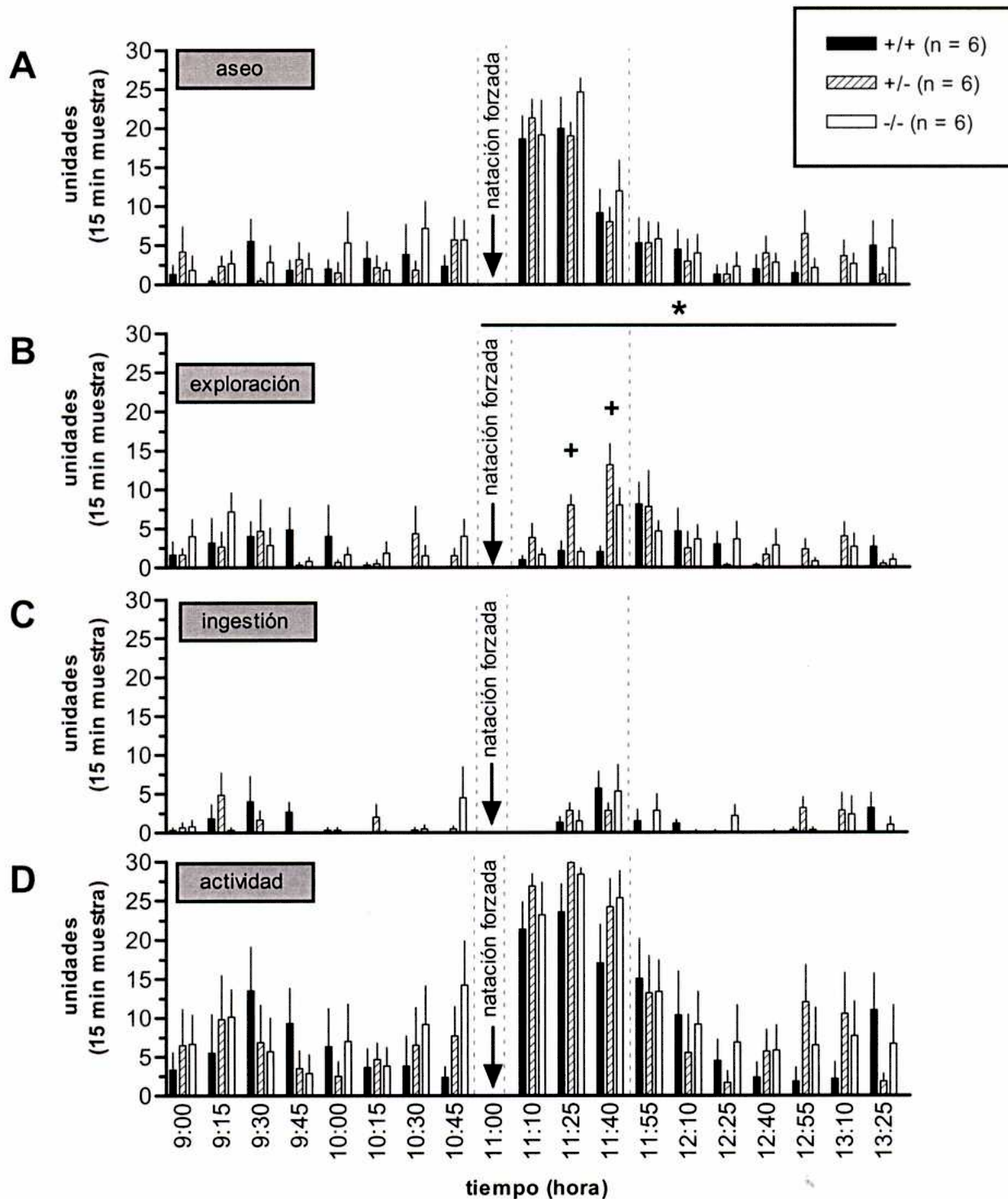


Figura 35: Efectos de la natación forzada sobre el comportamiento en ratones de cepa salvaje y ratones heterocigotas y homocigotas deficientes de CRH-R1. Los ratones fueron sometidos a una natación forzada por 10 minutos en agua a 25 °C. La actividad comportamental fue clasificada en aseo (A), exploración (B) e ingestión (C). La figura D muestra la actividad comportamental total durante el experimento. El comportamiento fue registrado cada 30 segundos durante la recolección de las muestras de dializado de 15 minutos. Los valores representan la media $\pm$ ES. *, efecto significativo de la interacción tiempo $\times$ genotipo (ANOVA con diseño de medidas repetidas). +, ratones +/- difieren significativamente de la cepa salvaje y de los ratones (-/-) de CRH-R1 (test de Duncan para la media del período).

PARTE B

Interacción entre la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo y el ciclo de vigilia-sueño en ratas

Uno de los objetivos planteados en este trabajo de investigación ha sido el estudio de la relación existente entre la actividad de las neuronas de 5-HT en el hipocampo y la inducción y mantenimiento de los estados comportamentales de vigilia y sueño bajo condiciones basales, y bajo los efectos de la privación del sueño por manipulación delicada. Para llevar a cabo este objetivo, ratas implantadas simultáneamente con una sonda de microdiálisis en el hipocampo y electrodos para el registro del EEG/EMG/T_{cer} fueron utilizados.

4.5- Relación de los estados de vigilancia y los niveles de 5-HT en el hipocampo en condiciones basales

Los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo mostraron una clara correlación con el estado comportamental de la rata en condiciones basales. La *figura 36* muestra un curso temporal representativo de los niveles hipocámpales de 5-HT y la transición de los estados de vigilancia en un animal (entre las 10:30 y las 13:30 horas). Los niveles de 5-HT fueron elevados en muestras asociadas con un alto porcentaje de vigilia, coincidiendo, en general, los máximos valores de 5-HT con muestras en las cuales el estado de vigilia constituyó el 100% del período. Cuando el animal entró en SL, una disminución en los niveles de 5-HT fue observada, presentando un valor mínimo durante el sREM. El análisis de las medias de los niveles de 5-HT en el hipocampo para cada estado de vigilancia demostró que los niveles alcanzados en muestras asociadas con 100% de vigilia, fueron significativamente elevados en comparación con los niveles de 5-HT alcanzados durante el sueño. El SL presentó niveles intermedios del neurotransmisor (47,31 % del nivel de 5-HT durante la vigilia), mientras que durante los episodios de sueño REM la concentración de 5-HT presentó los valores mínimos (32,95 % del nivel de 5-HT durante la vigilia) (*Figura 37; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del estado de vigilancia: $F(2,20) = 41,91$; $P \leq 0.0005$; Test de T de Student pareado entre estados de vigilancia (gl: 10), $P \leq 0,005$*).

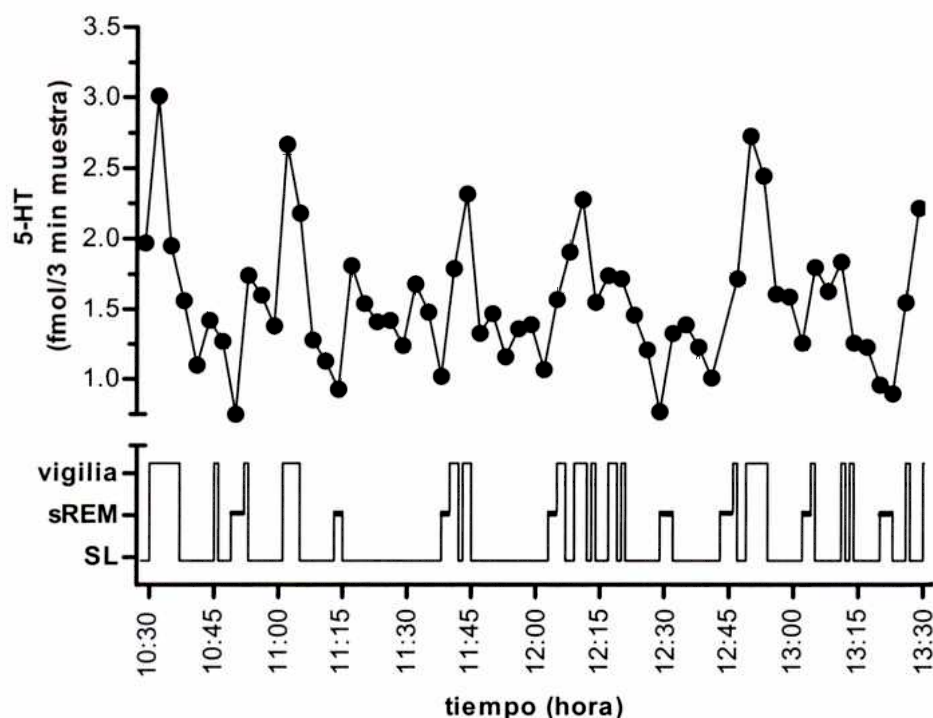


Figura 36: Relación entre los niveles hipocámpales de 5-HT y los estados de vigilia en rata en condiciones basales. Ejemplo representativo del curso temporal de los niveles extracelulares de 5-HT en muestras de dializado de 3 minutos, y el estado comportamental de un animal durante las 10:30 y 13:30 horas. 5-HT está expresada como fmol por cada 3 minutos muestra. Los estados de vigilia, SL y sREM del animal fueron determinados a partir del análisis de intervalos de 10 segundos de EEG/EMG y agrupados en períodos de 1 minuto, siendo dicho período categorizado con el estado comportamental predominante (hipnograma).

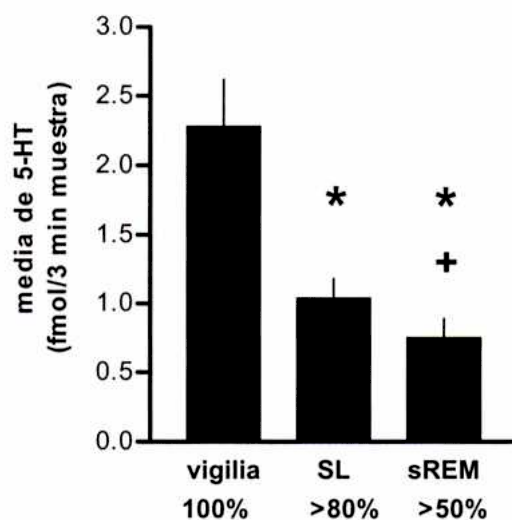


Figura 37: Media de los niveles extracelulares de 5-HT para cada estado comportamental entre las 10:30 y 13:30 horas en condiciones basales en ratas. Los estados de vigilia, sueño lento (SL) y sueño REM (sREM) del animal fueron determinados a partir del análisis de intervalos de 10 segundos de EEG/EMG, siendo luego agrupados en períodos de 3 minutos asociados a las correspondientes muestras de microdialisis. Muestras consistentes en 100 % vigilia, > 80 % SL y > 50 % sREM de los 3 minutos intervalos entre las 10:30 y 13:30 horas fueron consideradas. Los valores representan la media $\pm$ ES (11 animales, ver detalles en métodos). *, significativamente diferente de vigilia. +, significativamente diferente de SL (test de T de Student pareado).

4.6- Efectos de la privación de sueño sobre la neurotransmisión de 5-HT en el hipocampo

En base a la correlación observada entre los niveles de 5-HT en el hipocampo y los estados de vigilancia de la rata, y con el objetivo de estudiar más en detalle esta relación, se utilizó el procedimiento de la privación del sueño por manipulación delicada. La relación entre los niveles de 5-HT hipocampal y el estado de vigilancia fue analizada durante el procedimiento de vigilia forzada, como también, durante un período de 2 horas de recuperación.

4.6.1- Período de privación del sueño

Un período de 4 horas de privación de sueño por manipulación delicada provocó un inmediato y sostenido aumento en los niveles de 5-HT hipocampales (*Figura 38A*). El nivel de 5-HT alcanzado durante el período completo de vigilia forzada fue significativamente mayor que el nivel de 5-HT observado durante la vigilia espontánea, bajo condiciones basales y en un mismo período del ciclo de luz/oscuridad (*Figura 38B*; *Test de T de Student pareado (gl: 5), $P = 0,023$*).

El análisis de la amplitud del EMG, como un parámetro de la actividad muscular, indicó un aumento de un 36 % de la misma durante el período de privación de sueño en comparación con la actividad muscular observada durante la vigilia espontánea bajo condiciones basales (datos no mostrados).

4.6.2- Período de recuperación

Durante el tercer día experimental (luego de la implantación de la sonda de microdiálisis) un grupo de animales fue mantenido en condiciones basales (control) y la relación entre los niveles de 5-HT en el hipocampo y los estados de vigilancia fueron estudiados y comparados con los valores obtenidos durante el día experimental 2 (basal). Los niveles de 5-HT durante el SL y el sREM no mostraron diferencias significativas entre ambos días experimentales (*Figura 39*; *ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del día experimental: $F(1,4) = 7,74$; $P > 0,05$; efecto del estado comportamental: $F(2,8) = 35,5$, $P \leq 0,0005$; Test de T de Student pareado entre los estados de vigilancia para cada día (gl: 4), $P \leq 0,05$*).

La mayoría de los animales privados del sueño, comenzaron a dormir dentro de los primeros 10 minutos luego de finalizado el procedimiento. Sin embargo, dos de los animales permanecieron espontáneamente despiertos y activos por más de 15 minutos.

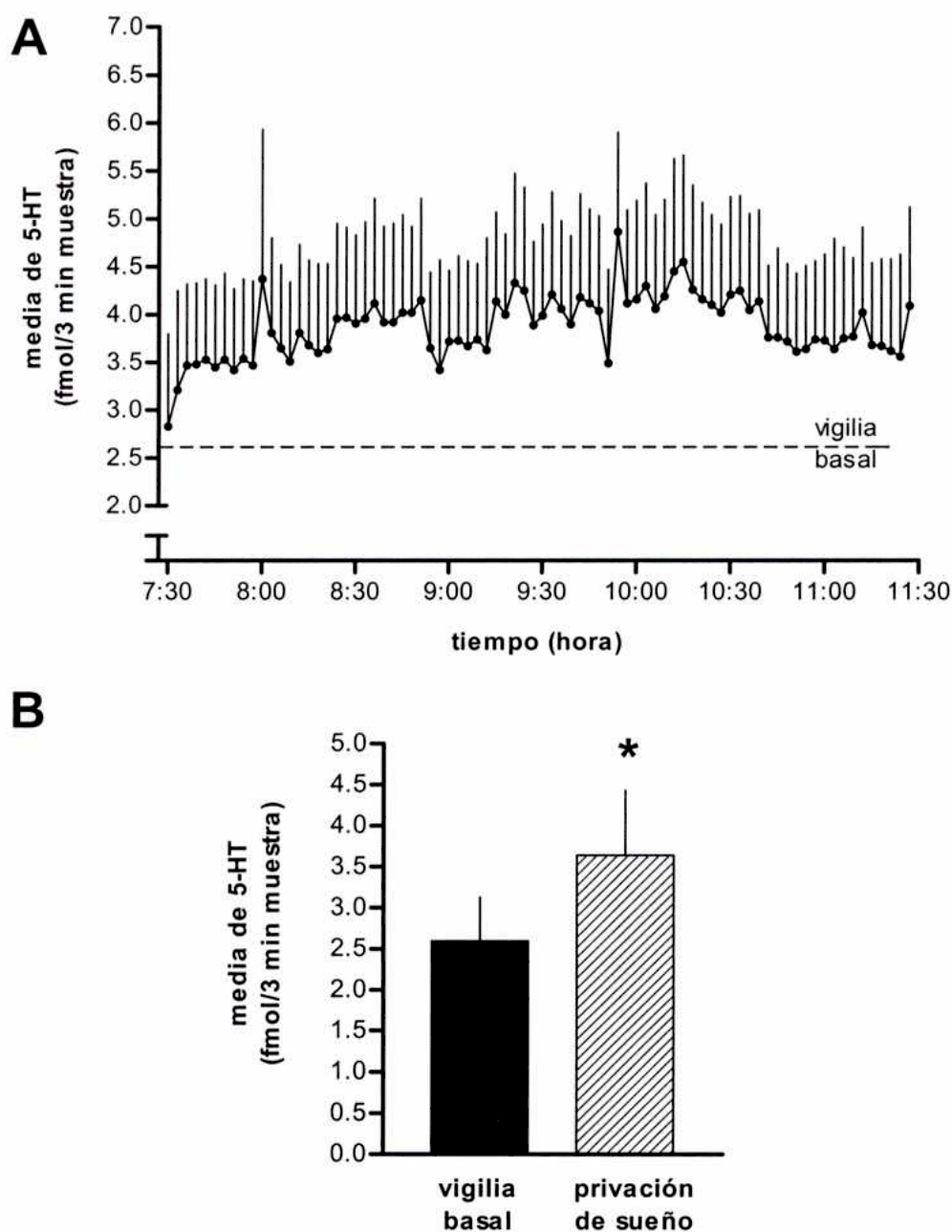


Figura 38: Efecto de 4 horas de privación de sueño por manipulación delicada sobre los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo. (A) Curso temporal de la concentración hipocampal de 5-HT en muestras de dializado de 3 minutos durante el período completo de vigilia forzada, entre las 7:30 y 11:30 horas. La línea punteada representa la media del nivel de 5-HT durante vigilia en condiciones basales. (B) Media de la concentración de 5-HT durante el período de privación de sueño y durante vigilia en condiciones basales (media de muestras consistentes en un 100 % de vigilia). Los valores representan la media $\pm$ ES (curso temporal $n = 5$; media de 5-HT $n = 6$). *, significativamente diferente de vigilia en condiciones basales (test de T de Student apareado).

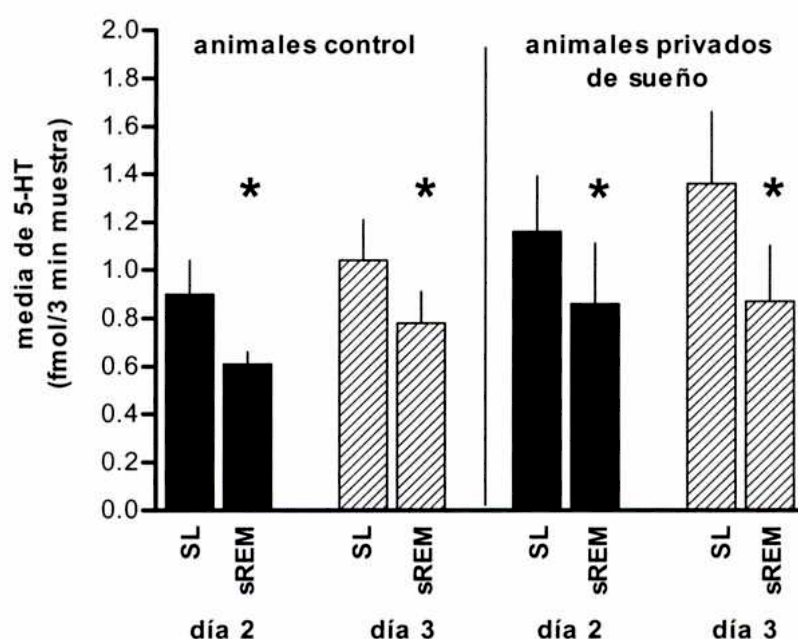


Figura 39: Media de los niveles extracelulares de 5-HT para sueño lento (SL) y sueño REM (sREM) en condiciones basales (día 2) y durante el tercer día experimental. El grupo control ($n = 5$) fue mantenido en condiciones basales durante los días 2 y 3. Otro grupo de animales ($n = 6$) fue sometido a 4 horas de privación de sueño mediante manipulación delicada. Un período de recuperación de 2 horas inmediatamente luego de finalizado el procedimiento de vigilia forzada fue analizado (11:30 - 13:30 horas). Los niveles de 5-HT de muestras consistentes en $> 80\%$ SL y $> 50\%$ sREM durante las 10:30 - 13:30 horas del día 2 y durante las 11:30 - 13:30 horas del día 3 fueron promediadas. Los valores representan la media $\pm$ ES (ver detalles en métodos). *, significativamente diferente de SL (test de T pareado).

Estos episodios durante los cuales el animal estuvo voluntariamente despierto, inmediatamente luego de finalizado el proceso de vigilia forzada, representan básicamente las únicas muestras asociadas a un 100 % de vigilia durante las 2 horas del período de recuperación analizado (entre 1-9 muestras para cada animal, media de los niveles de 5-HT = $3,40 \pm 0,62$ fmol / 3 minutos muestra). Pese a que estos episodios de vigilia se desarrollaron durante el período de recuperación, los mismos representarían una continuación de la actividad comportamental originada durante la vigilia forzada. Por lo tanto, el estado de vigilia no fue incluido en el análisis estadístico del período de recuperación.

La *Figura 40* muestra un curso temporal representativo de los niveles de 5-HT y los estados de vigilancia de un animal durante las 2 horas del período de recuperación de sueño. Durante dicho período, los cambios en los niveles de 5-HT en el hipocampo correlacionaron con el estado de vigilancia del animal (*Figura 39 y 40*). Niveles elevados de 5-HT se presentaron asociados al estado de vigilia, mientras que, valores intermedios se observaron durante episodios de SL. Las concentraciones más bajas de

5-HT se presentaron asociadas al sREM. Luego de las 4 horas de privación de sueño, los valores medios de 5-HT para cada estado de sueño no difirieron de los valores observados bajo condiciones basales y para un mismo intervalo del ciclo de luz/oscuridad, manteniéndose, además, la misma correlación en los niveles extracelulares de 5-HT entre el SL y el sREM (*Figura 39; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del día experimental: $F(1,5) = 1,24$; $P > 0,05$; efecto del estado de vigilia: $F(1,5) = 38,0$; $P = 0,002$; Test de T de Student pareado entre SL y sREM (gl: 5), $P \leq 0,005$).*

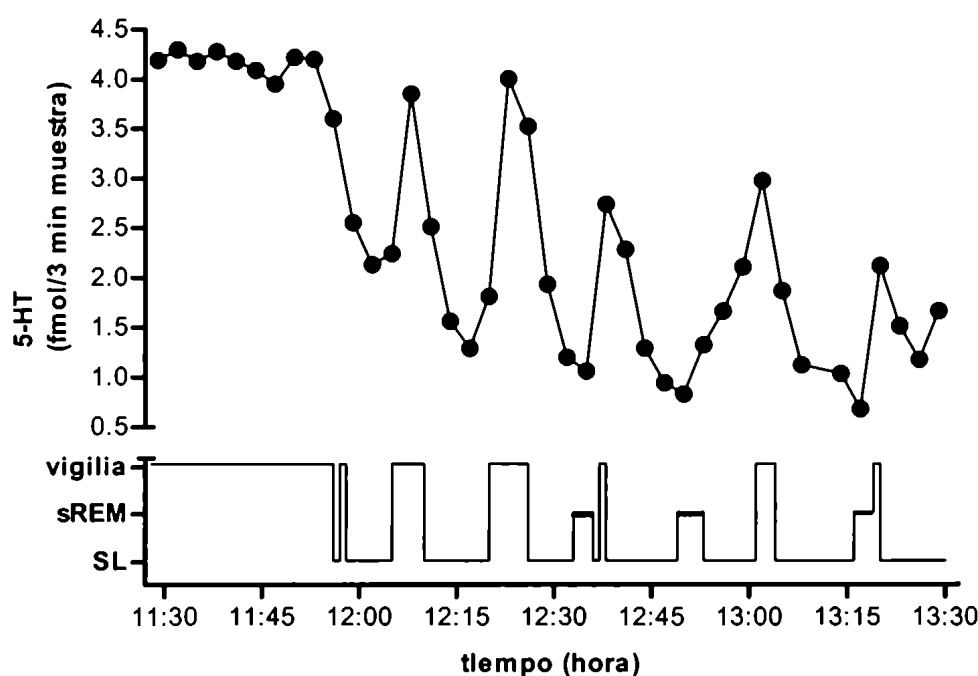


Figura 40: Relación entre los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo y los estados de vigilia durante el período de 2 horas de recuperación luego de las 4 horas de privación de sueño. (A) Ejemplo representativo del curso temporal de la concentración de 5-HT en 3 minutos-muestra de dializado y el estado de vigilia de un animal durante el período de recuperación (entre las 11:30 y 13:30 horas). Los estados de vigilia, sueño lento (SL) y sueño REM (sREM) del animal fueron determinados a partir del análisis de intervalos de 10 segundos de EEG/EMG y agrupados en períodos de 1 minuto, siendo dicho período categorizado con el estado comportamental cuya duración fue predominante (hipnograma).

4.7- Efectos de la privación de sueño sobre los niveles de corticosterona libre

Con el objetivo de estudiar los efectos de la privación de sueño sobre la activación del eje HPA, los niveles centrales de corticosterona libre fueron determinados en condiciones basales y en respuesta a la vigilia forzada.

En condiciones basales, los niveles de corticosterona libre mostraron un claro ritmo

circadiano, con bajos niveles durante las horas de la mañana y con un aumento gradual hacia el final de la fase luminosa, comenzando a aumentar entre las 15:00 y 17:00 horas y mostrando la máxima concentración durante el inicio de la fase oscura (*Figura 41*). Al día siguiente, el procedimiento de privación de sueño por 4 horas fue llevado a cabo. Durante todo el período de vigilia forzada, los niveles de corticosterona libre se mantuvieron significativamente elevados en comparación con los niveles basales

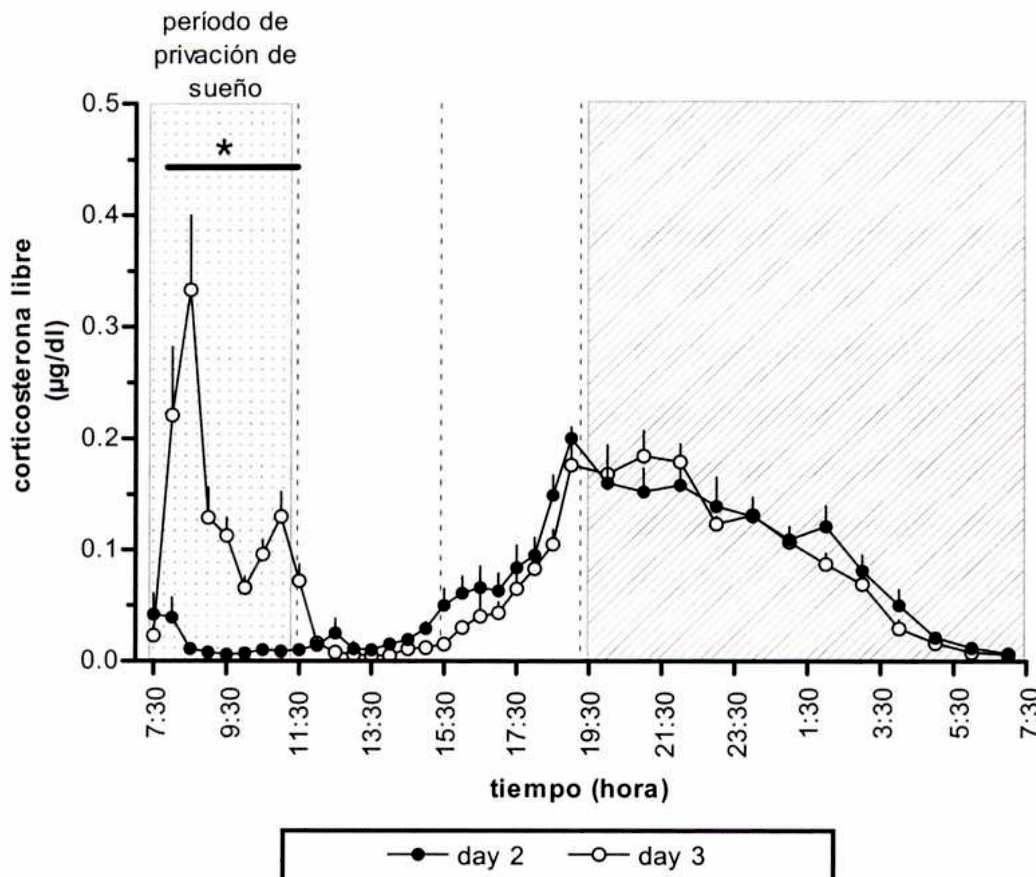


Figura 41: Efectos de las 4 horas de privación de sueño mediante manipulación delicada sobre el ciclo circadiano de los niveles extracelulares de corticosterona libre en rata. Las muestras fueron recolectadas cada 30 minutos durante la fase luminosa y cada 60 minutos durante la fase oscura en condiciones basales (día 2) y durante y luego del procedimiento de privación de sueño por 4 horas (día 3). Las líneas punteadas indican los períodos en los cuales los resultados fueron agrupados para el análisis estadístico por ANOVA con diseño de medidas repetidas. Los valores representan la media $\pm$ ES de la concentración de corticosterona libre para 6 animales. *, Los niveles de corticosterona libre durante el período de privación de sueño difieren significativamente de los niveles basales (ANOVA y test de T pareado, para mayores detalles ver resultados).

(ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del día experimental: $F(1,5) = 54,0$; $P = 0,001$; efecto del tiempo: $F(7,35) = 7,36$; $P \leq 0,0005$; interacción tiempo x día experimental: $F(7,35) = 11,6$; $P \leq 0,0005$). Los niveles de corticosterona libre aumentaron significativamente luego de los primeros 30 minutos de la privación del sueño llegando al máximo valor luego de 1 hora (Test de T de Student pareado entre día 2 y 3 (gl: 5), $P \leq 0,01$). Los niveles de corticosterona se mantuvieron elevados durante todo el período de vigilancia forzada, retornando a los niveles basales 30 minutos después de finalizado el procedimiento (ANOVA con diseño de medidas repetidas para el período de 11:30 a 15:30 horas, efecto del día experimental: $F(1,5) = 0,03$; $P > 0,05$). La privación de sueño por 4 horas no tuvo efectos sobre el desarrollo normal del ritmo circadiano de la hormona (Figura 41).

4.8- Efectos de la privación de sueño sobre los estados de vigilancia, la actividad de onda lenta y la temperatura cerebral

Durante las 2 horas del período de recuperación del sueño, el tiempo total que el animal permaneció despierto (expresado como porcentaje de intervalos de 30 minutos) mostró una tendencia a la reducción, en comparación con el tiempo total de vigilia en condiciones basales y durante el mismo intervalo del ciclo de luz/oscuridad (Figura 42A; Test de T de Student pareado entre día experimental 2 y 3 (gl: 5), $P > 0,05$). Asimismo, se observó un aumento en el tiempo total del SL durante el período de recuperación, comparado con el tiempo total de SL en condiciones basales. Sin embargo, esta diferencia alcanzó la significancia estadística solo durante la segunda media hora luego de finalizado el procedimiento experimental de privación de sueño (Figura 42B; Test de T de Student pareado entre los 2 días experimentales (gl: 5), $P = 0,012$). La privación de sueño por 4 horas no tuvo efectos significativos sobre el tiempo total del sREM (Figura 42C; Test de T de Student pareado entre días experimentales (gl: 5), $P > 0,05$). Por otro lado, la actividad de onda lenta desarrollada durante el SL en el período de recuperación, mostró un aumento significativo en la amplitud en comparación con los valores en condiciones basales. Este incremento en la amplitud de bajas frecuencias (0,5 - 4,5 Hz) se mantuvo durante las 2 horas de recuperación analizadas (Figura 42D; ANOVA con diseño de medidas repetidas, efecto del día experimental: $F(1,5) = 24,0$; $P = 0,005$; efecto del tiempo: $F(3,15) = 1,20$; $P > 0,05$; Test de T de Student pareado entre días 2 y 3 para cada intervalo (gl: 5), $P < 0,05$).

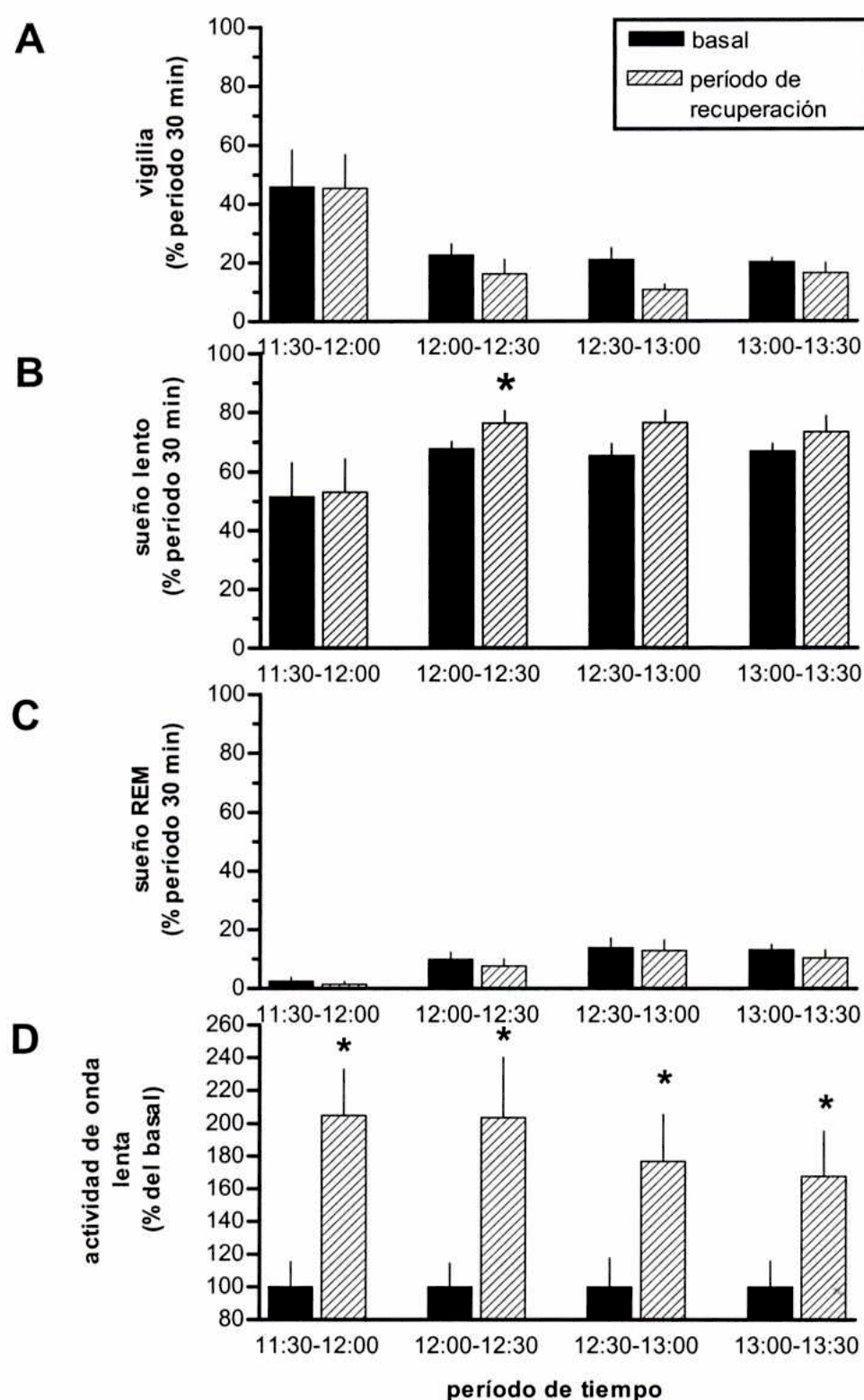


Figura 42: Efectos de las 4 horas de privación de sueño sobre los estados de vigilia y la actividad de onda lenta. Los estados de vigilia, SL y sREM fueron determinados a partir del análisis de intervalos de 10 segundos de EEG/EMG y el tiempo total para cada estado fue expresado como porcentaje de intervalos de 30 minutos durante las 11:30 y 13:30 horas bajo condiciones basales (día 2) y durante el período de recuperación (día 3). El espectro de potencia de la actividad de onda lenta (0,5 - 4,5 Hz) en los episodios de SL durante el período de recuperación fue promediado en intervalos de 30 minutos y expresados como porcentaje de los valores obtenidos en el mismo intervalo de tiempo en condiciones basales. Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6$). *, significativamente diferente del mismo período de tiempo en condiciones basales (test de T de Student pareado).

La temperatura cerebral presentó en condiciones basales un ritmo circadiano normal, con bajas temperaturas durante la fase luminosa, fase de poca actividad comportamental para la rata. Luego de los primeros 15 minutos de comenzada la privación de sueño, la temperatura cerebral aumentó y permaneció elevada durante todo el procedimiento, retornando recién a los valores basales al finalizar las 4 horas de vigilia forzada (*Figura 43; ANOVA con diseño de medidas repetida, efecto del día experimental: $F(1,3) = 51,12$; $P = 0,006$; efecto del tiempo: $F(15,45) = 2,1$; $P = 0,03$*). Probablemente, este incremento en la temperatura durante el procedimiento de privación de sueño fue debido a un aumento en la actividad comportamental en comparación con la desarrollada durante el mismo período del día en condiciones basales.

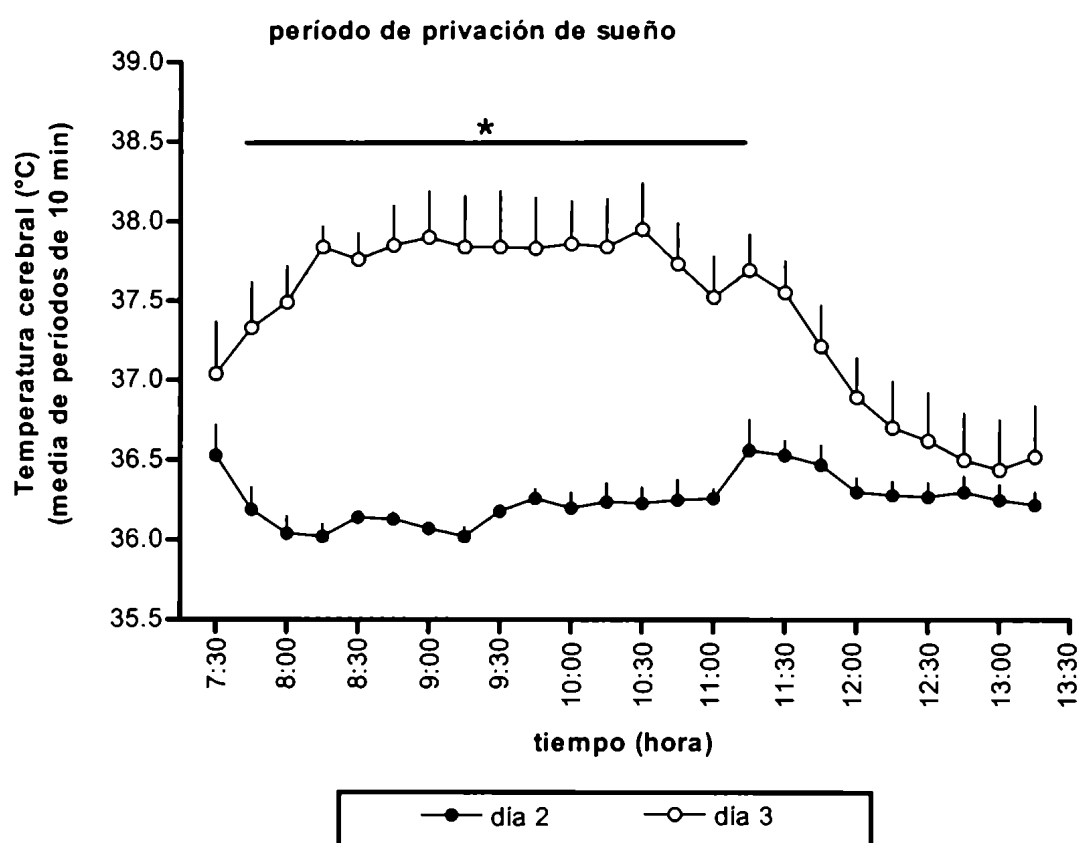


Figura 43: Efectos de las 4 horas de privación de sueño mediante manipulación delicada sobre la temperatura cerebral. La temperatura registrada cada 10 segundos fue promediada en intervalos de 15 minutos entre las 7:30 y 13:30 horas durante condiciones basales (día 2) y durante los períodos de privación de sueño y recuperación (día 3). Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 4$). *, significativamente diferente del basal (ANOVA con diseño de medidas repetidas).

5- DISCUSIÓN

PARTE A

Interacciones del sistema de CRH con la neurotransmisión serotoninérgica del hipocampo, el eje HPA y la actividad comportamental

Uno de los objetivos del presente trabajo de investigación ha sido el estudio de la interacción entre la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo y el sistema central de CRH. Los resultados presentados en este trabajo, y discutidos a continuación, contribuyen a la caracterización de los efectos del sistema de CRH central sobre la neurotransmisión serotoninérgica hipocampal y la actividad comportamental en roedores, bajo condiciones basales y en respuesta al estrés.

En las últimas décadas, varios estudios han propuesto que las alteraciones en el sistema de 5-HT (Maes y Meltzer, 1995) y en el eje HPA (Arborelius y col., 1999), (Holsboer, 1999) estarían implicadas en la etiología de las enfermedades psiquiátricas asociadas a trastornos afectivos o del estado de ánimo, como por ejemplo, la depresión mayor. Numerosos reportes describieron un aumento de la actividad del eje HPA en pacientes depresivos, indicado por un incremento en los niveles de CRH en el líquido cefalorraquídeo, un aumento en la concentración de ACTH y de cortisol plasmáticos (Nemeroff y col., 1984), (Holsboer, 1988) y cambios en la expresión de los receptores de CRH en el SNC (revisión (Holsboer, 1999)). Por otro lado, varios estudios han demostrado una actividad reducida del sistema central de 5-HT en los pacientes depresivos, los cuales muestran una reducción en los niveles de 5-HIAA en el líquido cefalorraquídeo y cambios en la expresión de los receptores de 5-HT en el SNC. No obstante, la evidencia más contundente a favor de la hipótesis de 5-HT como un factor causal de la depresión, es la acción terapéutica alcanzada con drogas que alteran el sistema de neurotransmisión serotoninérgico (revisión (Mann, 1999)).

Por otra parte, numerosas evidencias proponen una relación entre situaciones de estrés durante la vida y un aumento en la vulnerabilidad por desórdenes afectivos o de ansiedad (Brown y col., 1994). Varios autores han reportado que eventos de estrés preceden el inicio de la depresión y además, el estrés estaría asociado con la severidad de la enfermedad (Brown y col., 1994). El sistema central de CRH se encuentra ampliamente involucrado en la coordinación de las respuestas neuroendocrinas,

autónomas y comportamentales al estrés (Owens y Nemeroff, 1991), (Dunn y Berridge, 1990). Por ejemplo, la administración central de CRH o Ucn en animales de laboratorio produce cambios fisiológicos y comportamentales casi idénticos a los observados en la respuesta al estrés (Sutton y col., 1982), (Jones y col., 1998). Además, se ha demostrado que estos efectos son independientes de la activación del eje HPA, remarcando así, que resultan de la acción central de CRH (revisión: (Heinrichs y col., 1995)). Por otro lado, varios estudios han asignado a la neurotransmisión serotoninérgica un rol en la modulación de las respuestas comportamentales al estrés (revisiones: (Rueter y col., 1997), (Chaouloff y col., 1999). Uniendo estos dos sistemas, recientemente, Linthorst y col. demostraron, en ratas, que un aumento crónico de los niveles centrales de CRH produce una reducción en la respuesta de la serotonina al estrés (Linthorst y col., 1997). Por lo tanto, teniendo en cuenta estas observaciones, y los resultado expuestos en este trabajo de tesis se ha propuesto la existencia de una interacción entre los sistemas de neurotransmisión serotoninérgica y de CRH, y la posible participación de alteraciones en dicha interacción en la patofisiología de la depresión mayor.

Niveles extracelulares de serotonina y del ácido 5-hidroxiindoleacético como parámetros de la liberación y metabolismo de 5-HT

Los niveles de 5-HT medidos en el fluido de dializado recolectado reprodujo los niveles extracelulares del neurotransmisor, los cuales representan el resultado neto entre la liberación y el mecanismo de recaptación celular de 5-HT. Esta concentración extracelular neta de 5-HT es a la que están expuestos los receptores serotoninérgicos pre y postsinápticos. Por otro lado, los niveles del ácido 5-hidroxiindoleacético, 5-HIAA, representan claramente la metabolización de 5-HT. Sin embargo, el origen de dicha 5-HT metabolizada es todavía un tema controvertido. Por un lado, varios autores han propuesto que los niveles extracelulares de 5-HIAA son un reflejo exclusivo de la liberación de 5-HT (Marinesco y col., 1996). Por el contrario, otros trabajos han postulado que los niveles de 5-HIAA representan básicamente la degradación de 5-HT intracelular no liberada (Kuhn y col., 1986), (Kuhn y col., 1985), (Wolf y col., 1985), (Auerbach y col., 1989), (Kalen y col., 1988). Además, estudios de voltimetría, en los cuales utilizan distintos inhibidores específicos de las enzimas MAO-A y MAO-B, han cuestionado el origen de 5-HIAA presente en el medio extracelular. Estos trabajos sugieren que el metabolito es producido principalmente a partir de la 5-HT liberada y

degradada por la enzima MAO-A, presente en los astrocitos y neuronas no serotoninérgicas, y que solo un pequeño porcentaje provendría de la degradación por MAO-B, presente exclusivamente en neuronas que contienen 5-HT (Marinesco y col., 1996), (Cespuglio y col., 1990). Por lo tanto, los cambios en los niveles extracelulares de 5-HIAA no serían buenos indicadores de la liberación de 5-HT, representando entonces, principalmente la metabolización del neurotransmisor. En el presente trabajo de tesis, se utilizó la técnica de microdiálisis, la cual permitió el seguimiento de los cambios neuroquímicos en un área determinada, en condiciones fisiológicas basales o bien en respuesta a manipulaciones farmacológicas o del entorno. La recolección secuencial de muestras del dializado ha permitido el estudio del curso temporal de estos cambios y de la magnitud de los mismos. Además, el desarrollo de un sistema de HPLC para la detección de los niveles de 5-HT y 5-HIAA en dichas muestras, permitió evaluar simultáneamente los cambios producidos en los niveles del neurotransmisor y su metabolito. Por lo tanto, en la discusión del presente trabajo de investigación se considerara a los niveles extracelulares de 5-HIAA como un parámetro del metabolismo de 5-HT, el cual, junto a los niveles extracelulares de 5-HT permiten inferir sobre la síntesis del neurotransmisor.

La administración central de CRH y Ucn estimula la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo

Como se explicó previamente, en base a la observación de que una aumento crónico en los niveles centrales de CRH provoca una respuesta reducida de 5-HT hipocampal frente a situaciones de estrés, sin afectar los niveles basales (Linthorst y col., 1997), se propuso como objetivo de este trabajo de investigación el estudio de las interacciones entre el sistema de CRH y la neurotransmisión serotoninérgica. Con este propósito, se estudiaron los niveles hipocampales de 5-HT y 5-HIAA en respuesta a la administración i.c.v. de CRH y de Ucn, un péptido de la familia de CRH recientemente caracterizado. La administración i.c.v. de ambos neuropéptidos, produjo un aumento dosis-dependiente de los niveles extracelulares de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo. El análisis de los cursos temporales de dichas respuestas mostró un efecto mayor de Ucn en comparación con los efectos producidos por CRH. Dado que a su vez Ucn posee una mayor afinidad por el receptor de CRH tipo 2 (CRH-R2), en comparación con CRH, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el CRH-R2 desempeña un rol importante en los efectos de CRH y Ucn sobre la neurotransmisión de 5-HT en el

hipocampo. Trabajos recientes confirmaron la presencia de ambos receptores de CRH en los núcleos del rafe, con una mayor expresión del ARNm del CRH-R2 en el NRD y similar expresión de ambos receptores en el NRM (Bittencourt y Sawchenko, 2000), (Chalmers y col., 1995). Por otro lado, además de la presencia de CRH en los núcleos del rafe, la inmunoreactividad de Ucn fue observada también en estos núcleos {Bittencourt, Vaughan, y col. 1999 825 /id}, (Kozicz y col., 1998), (Morin y col., 1999). Estas evidencias respaldan la propuesta de una posible acción directa de CRH y Ucn sobre las neuronas serotoninérgicas del NRD y del NRM. De todas maneras, tanto la expresión del ARNm de los receptores de CRH, como la inmunoreactividad a ambos neuropéptidos, fueron también localizadas en el hipocampo (Merchenthaler, 1984), (Morin y col., 1999), (Bittencourt y col., 1999), (Kozicz y col., 1998), (Chalmers y col., 1995). Por lo tanto, no se puede descartar un efecto directo de CRH y Ucn en la región terminal. Por otro lado, como también se demuestra en el presente trabajo de investigación, la administración i.c.v de CRH y Ucn produjo una marcada estimulación en la expresión de c-fos en el hipocampo, el NRD y con menor intensidad en el NRM, sin una específica diferencia entre ambos neuropéptidos. Estos resultados aportan más evidencias a las observaciones de Bittencourt y Sawchenko sobre los efectos de CRH y Ucn sobre la expresión de c-fos en el SNC (Bittencourt y Sawchenko, 2000). No obstante, la identificación del o de los sitios de acción específicos de CRH y Ucn para la estimulación de la neurotransmisión de 5-HT en el hipocampo requiere de estudios más detallados, como por ejemplo el análisis de los efectos de la administración localizada en los NRD y NRM, y en el hipocampo. Por otro lado, para descartar que un metabolismo diferencial sea la causa de la mayor potencia de Ucn sobre la neurotransmisión serotoninérgica, son necesarios estudios más exhaustivos sobre el destino, la incorporación celular y el metabolismo de Ucn y CRH extracelulares.

Trabajos previos demostraron que la administración i.c.v. de CRH produce un aumento en los niveles extracelulares de 5-HIAA en el hipotálamo y en la corteza frontal (Lavicky y Dunn, 1993) y un aumento en la actividad de la enzima triptofano hidroxilasa en la corteza cerebral y cerebro medio (Singh y col., 1992). Recientemente se ha demostrado que la administración i.c.v. o intra-rafe de CRH produce una respuesta bifásica de la actividad neuronal en el NRD (Kirby y col., 2000) y en los niveles extracelulares de 5-HT en el estriado (Price y col., 1998). Bajas dosis de CRH (0,1 - 0,3 µg para la inyección i.c.v.) provocaron una disminución de la actividad celular en el NRD, mientras que altas dosis de CRH (3 µg) generaron un aumento de la misma (Kirby y col., 2000). Por el

contrario, los resultados presentados en este trabajo de tesis señalan que CRH estimula la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo. La administración i.c.v. de CRH (0,3 - 1 µg), provocó un aumento en los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo. Cabe recordar que mientras el estriado recibe inervaciones serotoninérgicas provenientes casi exclusivamente del NRD, el hipocampo recibe inervación serotoninérgica topográficamente organizada desde ambos núcleos, NRD y NRM (Azmitia y Segal, 1978), (Köhler, 1982), (Mokler y col., 1998). Recientemente, Lowry y col. identificaron una subpoblación de neuronas serotoninérgicas en el NRD que responden excitatoriamente a CRH, sugiriendo que CRH activaría en forma diferencial al sistema serotoninérgico (Lowry y col., 2000). Más aún, varios paradigmas experimentales de estrés provocan un aumento de la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo (Linthorst y col., 1995), (Rueter y Jacobs, 1996a), (Vahabzadeh y Fillenz, 1994). Asimismo, mientras que el estrés por natación forzada provoca un marcado aumento en los niveles de 5-HT hipocámpal (Linthorst y col., 1999), (Rueter y Jacobs, 1996a), otros autores han reportado la ausencia de cambios en los niveles hipocámpales de 5-HT (Kirby y col., 1997), o inclusive, una reducción en el hipocampo ventral (Adell y col., 1997). Sin embargo, es necesario destacar que entre estos trabajos existen diferencias en las condiciones metodológicas, por ejemplo, la temperatura del agua y la duración del procedimiento, las cuales influyen en la respuesta del neurotransmisor (Linthorst y col., 1999). A su vez, otros estudios analizaron la respuesta de 5-HT al estrés por natación forzada en distintas áreas del SNC. En los mismos se observó una reducción de los niveles de 5-HT en el estriado y el septum lateral (Kirby y col., 1997), pero un aumento en NRM (Adell y col., 1997). Por lo tanto, los resultados presentados en este trabajo de tesis, aportan nuevas evidencias en concordancia con los trabajos de otros autores, que indican que los efectos del estrés sobre la neurotransmisión de 5-HT dependen de la estructura cerebral en estudio y del tipo de procedimiento utilizado. De este modo, el presente trabajo de tesis aporta evidencias a la controversia generada por la hipótesis propuesta por Jacobs y col. (Jacobs y Fornal, 1991), (Jacobs y Azmitia, 1992), (Rueter y col., 1997), en la cual los niveles extracelulares de 5-HT responden con un aumento generalizado al estrés, determinado únicamente por el nivel de actividad motora y la excitación exhibida por el animal durante dicha situación estresante.

Los efectos de la administración i.c.v. de CRH sobre la neurotransmisión de 5-HT en el hipocampo no son mediados por la corticosterona

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis demuestran que la adrenalectomía no posee efectos sobre los niveles de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo, tanto en condiciones basales como en respuesta a la administración i.c.v. de CRH. Varios autores han demostrado que los receptores de glucocorticoides MR y GR desempeñan un rol importante en la regulación de la síntesis y la liberación de 5-HT, y de la expresión de sus receptores en el hipocampo (revisión (Meijer y de Kloet, 1998)). Otros estudios observaron que la adrenalectomía bloquea el aumento en la actividad de la enzima triptofano hidroxilasa inducida por una situación de estrés y que dicho efecto es revertido mediante la sustitución de la corticosterona (Singh y col., 1990), (Singh y col., 1994), (Azmitia, Jr. y McEwen, 1969), (Azmitia, Jr. y McEwen, 1974). Asimismo, la adrenalectomía previno la desensibilización del receptor de 5-HT_{1A} producida por la exposición al estrés (Laaris y col., 1999). Estos resultados fueron obtenidos también por otros autores luego de la administración intracerebral de CRH, lo cual se asemeja a la respuesta al estrés (Singh y col., 1992). Sin embargo, en varios de estos estudios, como también en trabajos de otros autores, se han demostrado que la adrenalectomía no afecta la actividad basal de la enzima triptofano hidroxilasa (Sze, 1976), (Singh y col., 1990), ni modifica la actividad neuronal basal o el efecto inhibitorio de 8-OH-DPAT en el NRD (Laaris y col., 1995), así como tampoco altera la expresión del ARNm del receptor 5-HT_{1A} en el hipocampo (Holmes y col., 1995).

Los resultados presentados en este trabajo de tesis demuestran que la ausencia de corticosterona no afecta los niveles de 5-HT y 5-HIAA hipocampal tanto en condiciones basales como en respuesta a la administración i.c.v. de CRH, contribuyendo así a la hipótesis según la cual la acción central de CRH sobre el sistema de 5-HT no estaría mediada por los glucocorticoides. Por lo tanto, los efectos de CRH sobre la neurotransmisión serotoninérgica serían el resultado de una acción directa de estos péptidos en el SNC, en su rol como neurotransmisores, y no como consecuencia de la activación del eje HPA.

CRH y Ucn estimulan la expresión de c-fos en el SNC

Numerosos estudios han implicado al proto-oncogen y factor de transcripción, c-fos, en el crecimiento, diferenciación y desarrollo celular (revisiones (Herdegen y Leah, 1998), (Herrera y Robertson, 1996). c-fos forma parte del grupo de genes de activación

temprana y su expresión en el SNC es utilizada como un parámetro de la activación neuronal. Por lo tanto, en el presente trabajo se utilizó el análisis del producto del gen de c-fos, mediante el método inmunohistoquímico de detección de la proteína, para un estudio comparativo de los efectos de la administración i.c.v. de CRH y Ucn sobre la activación neuronal en el cerebro de la rata.

Los resultados preliminares obtenidos en este estudio muestran que estos dos péptidos causan una inducción específica y parcialmente diferencial de c-fos en áreas del SNC involucradas en las respuestas al estrés. El núcleo central de la amígdala, el núcleo del rafe dorsal, el locus coeruleus y la corteza cerebral mostraron un elevado grado de activación, mientras que una inducción moderada fue observada en el septum lateral, el núcleo accumbens, el BNST, el núcleo basolateral de la amígdala, el núcleo paraventricular del hipotálamo, el hipocampo y el núcleo del rafe medio. Esta distribución anatómica de la inducción de c-fos concuerda en su mayoría con los datos publicados por otros grupos, sin embargo, la comparación directa resulta limitada debido al uso de diferentes dosis de CRH and Ucn (entre 1 y 10 µg/rata) por parte de los distintos grupos de trabajo (Arnold y col., 1992) (Andreae y Herbert, 1993) (Parkes y col., 1993) (Imaki y col., 1993) (Vaughan y col., 1995) (Morrosu y col., 1996).

Un aspecto novedoso de nuestros resultados son las diferencias observadas entre CRH y Ucn en su poder de activación de c-fos en ciertas áreas cerebrales. Ucn mostró mayor potencia en el núcleo central de la amígdala y en el BNST, mientras que CRH lo hizo en el hipocampo. Recientemente, otros autores han reportado también diferencias en el grado de inducción de c-fos después de la administración de CRH o Ucn (Bittencourt y Sawchenko, 2000). Sin embargo, las áreas diferencialmente inducidas no son las mismas a las observadas en nuestro estudio. Esta discrepancia en los resultados podría deberse a la concentración del péptido utilizada. En este trabajo de tesis se utilizó una dosis de 0,3 µg/rata basados en los resultados previos expuestos también en esta tesis, mientras que Bittencourt y col. utilizaron una concentración mayor, 1 µg/rata. Teniendo en cuenta que CRH y Ucn poseen diferente afinidad por los receptores CRH-R1 y CRH-R2, una mayor concentración de la hormona podría resultar en una saturación diferencial de los receptores en áreas que expresan ambos subtipos de receptores. Es interesante remarcar que ciertas estructuras, en las cuales se observó una gran estimulación de la expresión de c-fos, y que han sido consideradas como sitios de acción relevantes de CRH, presentan baja expresión de los receptores de CRH (Bittencourt y Sawchenko, 2000).

Un ejemplo de esto lo constituye el núcleo central de la amígdala, el cual se encuentra involucrado en la coordinación ejercida por CRH sobre las respuestas endocrinas, comportamentales y autonómicas frente a una situación de estrés (Gray y Bingaman, 1996), (Sajdyk y col., 1999). Estas observaciones sugieren que los efectos de CRH sobre la amígdala central no son directos, sino que estarían mediados por otra área, como por ejemplo, el BNST.

En conclusion, los resultados sobre los efectos diferenciales de CRH y Ucn en distintas areas del SNC presentados en esta tesis avalan la hipotesis propuesta por varios grupos de investigadores (Vaughan y col., 1995), (Morin y col., 1999), (Bittencourt y col., 1999). Basado en la colocación de los receptores CRH-R1 y CRH-R2 con las regiones activadas por la administración central de CRH o Ucn (detectadas a través de la expresión de c-fos) se ha sugerido que CRH ejerce una activación preferencial en áreas que expresan CRH-R1, mientras que la acción de Ucn estaría mediada por CRH-R2.

La disfunción del CRH-R1 provoca el aumento de la síntesis de 5-HT

Los efectos de la disfunción del CRH-R1 sobre los niveles hipocámpales de 5-HT y 5-HIAA bajo condiciones basales y en respuesta a estrés, fueron investigados utilizando ratones deficientes del gen del CRH-R1. Los resultados presentados en este trabajo de investigación demostraron que los tres genotipos distintos de ratones (+/+, +/- y -/- del gen de CRH-R1) exhiben un claro ritmo circadiano de los niveles de 5-HT y 5-HIAA, con niveles reducidos durante la fase luminosa y niveles elevados durante la fase oscura. Por lo tanto, los resultados presentados demuestran que el CRH-R1 no es necesario para mantener el ritmo circadiano de este neurotransmisor. Varios autores han propuesto que la actividad comportamental es un determinante importante de la neurotransmisión serotoninérgica, y que posiblemente los niveles elevados de 5-HT y 5-HIAA observados durante la fase oscura del ciclo circadiano, fase activa en roedores, se deban al aumento de la actividad comportamental (Dudley y col., 1998), (Jacobs y Azmitia, 1992), (Linthorst y col., 1995), (Mendlin y col., 1996), (Rueter y Jacobs, 1996b). En el presente estudio la correlación entre la actividad comportamental y los niveles de 5-HT y 5-HIAA no presentó diferencias entre los ratones de cepa salvaje y los ratones deficientes del CRH-R1, lo cual demuestra que el CRH-R1 no se encuentra involucrado en la interacción entre la neurotransmisión de 5-HT y la actividad comportamental desarrollada. Sin embargo, mientras que los niveles extracelulares de 5-HT hipocámpal

no difieren entre los genotipos, los niveles de 5-HIAA son marcadamente elevados en los ratones homocigotas deficientes del CRH-R1, en comparación con los ratones heterocigotas y de cepa salvaje. Como se discutió previamente, los niveles extracelulares de 5-HT representan el resultado neto de la liberación y recaptación del neurotransmisor, en tanto que los niveles extracelulares de 5-HIAA representarían el resultado del metabolismo de la 5-HT liberada y la citoplasmática sin liberar. Por lo tanto, el aumento en los niveles de 5-HIAA conjuntamente con los niveles extracelulares de 5-HT no alterados, sugiere un aumento en la síntesis de 5-HT. 5-HIAA sería entonces el producto de la degradación de 5-HT citoplasmática no liberada y/o proveniente de una liberación y recaptación exacerbada. De esta forma, la deficiencia del CRH-R1 afectaría la síntesis de 5-HT sin producir cambios en los niveles extracelulares del neurotransmisor. Sin embargo, hasta el momento, no es posible determinar que el aumento en la síntesis de 5-HT resulte como una consecuencia directa de la inactivación del CRH-R1. Al respecto, la infusión localizada en el NRD de bajas dosis de CRH produce una inhibición de la tasa de disparo de las neuronas de 5-HT, un efecto que puede ser revertido mediante la administración de un antagonista del CRH-R1 (Price y col., 1998). Como mecanismo alternativo, un aumento de la estimulación del CRH-R2 podría estar implicado en los cambios observados en la síntesis de 5-HT en los ratones deficientes del CRH-R1. El aumento de los niveles de CRH en los núcleos del rafe y el hipocampo de los ratones deficientes de CRH-R1 (Timpl y col., 1998), como también la localización del CRH-R2 en estas áreas (Bittencourt y Sawchenko, 2000) apoyan esta hipótesis. Por otro lado, aunque los resultados presentado en esta Tesis demuestran que la adrenalectomía en ratas no posee efectos en los niveles de 5-HT y 5-HIAA basales y estimulados por la administración central de CRH, la posibilidad de que la ausencia de corticosterona desempeñe un rol en la síntesis elevada de 5-HT en los ratones con disfunción del CRH-R1 no puede ser descartada.

La disfunción del CRH-R1 provoca un aumento de la estimulación de la neurotransmisión de 5-HT producida por el estrés por natación forzada

En ratones de la cepa salvaje, el estrés por natación forzada provocó un aumento moderado en los niveles extracelulares de 5-HT hipocampal, los cuales continuaron aumentando luego de finalizado el procedimiento experimental. Al mismo tiempo, una pequeña, pero significativa, reducción en los niveles de 5-HIAA extracelular fue

observada en ratones de la cepa salvaje durante el procedimiento de natación forzada. Estos resultados constituyen el primer reporte sobre los efectos de la natación forzada en los niveles extracelulares de 5-HT y 5-HIAA en ratones. En ratas, el estrés por natación forzada llevado a cabo en agua a 25° C, produce un incremento en los niveles hipocampales de 5-HT extracelular, y una reducción en la concentración de 5-HIAA (Linthorst y col., 1999). Sin embargo, Kirby y col. observaron, en ratas, que un procedimiento de natación forzada de 30 minutos de duración, en agua a 22° C, no produce efectos en los niveles de 5-HT hipocampal, pero induce una prolongada reducción en los niveles de 5-HIAA (Kirby y col., 1995). Estudios preliminares, no presentados en este trabajo de investigación, han indicado que la temperatura del agua tiene un profundo impacto sobre la respuesta de la neurotransmisión serotoninérgica hipocampal, lo cual podría explicar los distintos resultados (Linthorst y col., observaciones no publicadas).

Por otra parte, la natación forzada induce un aumento de los niveles extracelulares de 5-HT hipocampal tanto en los ratones heterocigotas como en los homocigotas deficientes del CRH-R1. Sin embargo, la respuesta observada en estos ratones fue significativamente mayor en comparación con la de los ratones de cepa salvaje. Aunque en los ratones deficientes del CRH-R1 no se observó una disminución de los niveles de 5-HIAA durante el procedimiento de natación forzada, el incremento subsiguiente de los niveles de 5-HIAA fue similar en todos los genotipos. Estos resultados demuestran claramente que la deficiencia del CRH-R1 provoca una respuesta alterada de la transmisión de 5-HT hipocampal frente a una situación estresante. En base a estos resultados, se propone como hipótesis que, en ratones normales, durante una situación de estrés, la estimulación de CRH-R1 desempeña un rol inhibitorio sobre los niveles de 5-HT hipocampal, el cual estaría alterado en los ratones deficientes del CRH-R1. Esta hipótesis estaría también respaldada por los resultados de Price y Kirby, quienes observaron que la administración local de CRH reduce la tasa de disparo de las neuronas del rafe dorsal en ratas (Price y col., 1998), vía la estimulación de los receptores de CRH tipo 1 (Kirby y col., 2000). Sin embargo, los efectos de CRH sobre el NRM, el cual posee una amplia proyección serotoninérgica hacia el hipocampo, no han sido aún estudiados. Además, un trabajo reciente ha demostrado la existencia de subpoblaciones de neuronas serotoninérgicas en el NRD que responden a la infusión de CRH con un aumento en la tasa de disparo (Lowry y col., 2000). No obstante, como se discutió previamente, una elevada estimulación de CRH o Ucn, a través del CRH-R2,

podría estar también implicada en los resultados obtenidos.

Medición de corticosterona libre en el SNC

En general, los niveles plasmáticos de corticosterona son utilizados como un parámetro de la activación del eje HPA. Sin embargo, aproximadamente un 95 - 98 % de la corticosterona en plasma se encuentra unida a proteínas transportadoras, particularmente a la globulina de unión de corticosterona. Esta situación limita la fracción de hormona biológicamente activa u hormona libre disponible (Rosner, 1991), (Rosner, 1990). Además, los niveles plasmáticos de la propia globulina de unión de corticosterona se encuentran sujetos a la regulación por distintas condiciones fisiológicas (Smith y Hammond, 1992), (Hammond y col., 1991), lo cual influye indirectamente sobre los niveles de corticosterona libre circulantes en plasma. Por otro lado, en el líquido cefalorraquídeo y el medio extracelular del SNC, la corticosterona se encuentra presente tan solo en su forma libre, debido a la ausencia de globulinas de unión en el SNC. Sin embargo, la concentración plasmática de corticosterona libre no representaría totalmente los niveles del esteroide dentro del SNC. La corticosterona sería también un ligando de la bomba de extrusión *mdr1a* P-glicoproteína (Ueda y col., 1992), (van Asperen y col., 1997) la cual a través del bombeo del esteroide al sistema sanguíneo, restringiría la concentración de la corticosterona en el líquido cefalorraquídeo y el fluido extracelular del cerebro (Bourgeois y col., 1993). En el presente trabajo de tesis se midió la corticosterona libre en el cerebro, mediante el uso de la técnica de microdiálisis. Esta técnica permite el acceso directo a los niveles extracelulares de la hormona en el SNC, y proporciona, por lo tanto, un mejor reflejo de los niveles de la corticosterona disponibles para la unión a los receptores, dentro de áreas específicas del SNC y bajo una dada condición fisiológica.

La administración i.c.v. de CRH y Ucn produce un aumento de los niveles de corticosterona libre en el SNC

Los resultados de esta tesis muestran que la administración central de CRH y Ucn provoca una estimulación dosis-dependiente de los niveles extracelulares de corticosterona libre, con un mayor efecto de Ucn en comparación con una misma dosis de CRH. Esta diferencia en la potencia de activación del eje HPA entre ambos neuropéptidos fue observada también en la estimulación de la liberación de ACTH en estudios *in vivo* e *in vitro* llevados a cabo por otros autores (Vaughan y col., 1995),

(Asaba y col., 1998), (Ozawa y col., 1998) (Turnbull y col., 1999a). Sin embargo, mientras que la administración sistémica de anticuerpos anti-CRH reduce los niveles de ACTH basales y en respuesta al estrés, la administración de anticuerpos anti-Ucn no tiene ningún efecto sobre estos parámetros. Por lo tanto, CRH sería el mayor regulador endógeno de la secreción de ACTH en la hipófisis (Turnbull y col., 1999a).

Un análisis detallado de los cursos temporales en las respuestas de la corticosterona libre sugiere la presencia de dos componentes o fases en las mismas: un incremento agudo inicial, inmediatamente luego de la administración i.c.v., cuyo perfil no presenta diferencias entre CRH y Ucn, y una segunda fase en la cual la respuesta de los niveles de la corticosterona depende del neuropéptido y la dosis administrada. En comparación con los animales controles, luego de la respuesta inicial a la administración i.c.v. de bajas dosis de CRH (0,1 y 0,3 μ g), los niveles de corticosterona libre permanecen reducidos, sin mostrar el aumento característico asociado al ritmo circadiano normal, lo cual indica la participación de un proceso de retroalimentación negativa. Sin embargo, luego de la administración i.c.v. de Ucn los niveles de corticosterona libre permanecen elevados durante la segunda fase, patrón que fue solamente observado en la respuesta a la dosis más elevada de CRH (1 μ g). Dada la mayor afinidad de Ucn por el CRH-R2 en comparación con CRH, los resultados presentados en este trabajo de tesis sugieren la participación diferencial de los receptores de CRH en la respuesta de activación del eje HPA a la administración i.c.v. de CRH y Ucn. Por un lado, el CRH-R1 desempeñaría un rol crítico en la iniciación de la cascada hormonal del eje HPA, mientras que el CRH-R2 modularía posiblemente la respuesta del eje HPA luego de la activación inicial, revirtiendo en parte los efectos de la retroalimentación negativa desencadenada luego del pico inicial de corticosterona. Es interesante remarcar que luego del incremento asociado a una situación de estrés, como por ejemplo la privación del sueño, los niveles de corticosterona libre retornan a los valores basales, sin presentar alteraciones en el ritmo circadiano subsiguiente. Por lo tanto, la presencia de estas dos fases componentes de la respuesta del eje HPA observadas a través de la manipulación farmacológica, tendrían una importante relevancia fisiológica para la recuperación y retorno del sistema a condiciones basales luego de una situación de estrés. De acuerdo con esta hipótesis, estudios previos han demostrado que CRH posee la capacidad de autorregular positivamente su expresión en el PVN (Parkes y col., 1993), área crucial para la activación del eje HPA que expresa mayoritariamente el CRH-R2 (Chalmers y col., 1995). De todas maneras, otros mecanismos moleculares relacionados con la

respuesta de retroalimentación negativa de los glucocorticoides no pueden ser descartados.

Por otro lado, estudios realizados en ratones deficientes del CRH-R2 demostraron que estos animales responden al estrés con una marcada respuesta inmediata de ACTH, pero que la misma declina rápidamente en comparación con la respuesta observada en los ratones de cepa salvaje (Coste y col., 2000). Estos autores sugieren que el CRH-R2 estaría implicado en el mantenimiento de la respuesta inicial de ACTH posiblemente a través de la acción de CRH sobre estos receptores, presentes en el PVN (Coste y col., 2000). A su vez, los ratones deficientes del CRH-R1, utilizados en este trabajo de investigación, presentan una respuesta de ACTH marcadamente reducida frente al estrés (Timpl y col., 1998), demostrando así que el CRH-R1 desempeña un rol importante en el inicio de la activación del eje HPA.

La disfunción del CRH-R1 reduce los niveles basales de corticosterona libre durante los periodos de luz y oscuridad

En los ratones de cepa salvaje, los niveles extracelulares de corticosterona libre en el SNC exhibieron un claro ritmo circadiano, con niveles bajos de esta hormona durante las primeras horas de la fase luminosa y un lento aumento a lo largo de la tarde, hasta alcanzar el nivel máximo inmediatamente luego del comienzo de la fase oscura. Este patrón coincide con el ritmo circadiano de la corticosterona libre observado en otro estudio en ratones (Linthorst y col., 2000). Sin embargo, debido a que los niveles de esta hormona no son detectables en los ratones deficientes del CRH-R1, la existencia de un ritmo circadiano de la misma no pudo ser constatada. Más aún, un efecto dependiente de la dosis génica del CRH-R1 fue observado en la concentración de la corticosterona libre. La deficiencia de uno de los alelos del gen del CRH-R1 en los ratones heterocigotas resultó en niveles reducidos de la corticosterona libre, en comparación con la concentración de la hormona en los ratones de cepa salvaje. No obstante, el ritmo circadiano de la hormona se mantuvo. Timpl y col. demostraron en este mismo modelo animal, que los ratones homocigotas deficientes del CRH-R1 presentan niveles plasmáticos de corticosterona indetectables al comienzo de la fase luminosa (Timpl y col., 1998). Sin embargo, estos autores no encontraron efectos dependientes de la dosis génica del CRH-R1 en los niveles basales de ACTH y corticosterona plasmáticos (Timpl y col., 1998). En otro modelo de ratones deficientes del gen del CRH-R1, Smith y col. observaron también niveles reducidos de

corticosterona plasmática y la ausencia del ritmo circadiano de esta hormona (Smith y col., 1998). En conjunto, estas evidencias sugieren un rol clave del CRH-R1 en el desarrollo normal del ritmo circadiano de la corticosterona, no obstante los niveles basales de ACTH no están afectados por la disfunción del CRH-R1 (Timpl y col., 1998), (Smith y col., 1998). Esto podría deberse a la participación de otros factores en la regulación de la secreción basal de ACTH, como por ejemplo, la vasopresina (Turnbull y col., 1999b). Por otro lado, ambos modelos de ratones deficientes del CRH-R1 presentan alteraciones en el desarrollo de la glándula adrenal, lo cual contribuiría a los niveles basales anómalos de corticosterona (Timpl y col., 1998), (Smith y col., 1998).

La administración i.c.v. de CRH y Ucn produce una activación comportamental diferencial

La administración i.c.v. de CRH y Ucn en ratas en un entorno familiar (sus mismas jaulas) provoca una activación comportamental dosis-dependiente, pero con patrones comportamentales distintos. Por un lado, Ucn i.c.v. provocó un prologando comportamiento de aseo y movimientos de las mandíbulas o masticación, mientras que CRH estimuló principalmente un comportamiento exploratorio. Varios estudios han demostrado que la administración i.c.v. de CRH produce distintos efectos comportamentales, de acuerdo a si el animal se encuentra en un entorno familiar o en uno novedoso (Dunn y Berridge, 1990), (Sutton y col., 1982), (Diamant y de Wied, 1991). La misma dosis de la hormona que administrada en un ambiente familiar produce una activación comportamental, en un entorno estresante provoca la supresión de la actividad comportamental del animal. Sin embargo, los efectos de CRH en la regulación del comportamiento en un entorno familiar para el animal no han sido estudiados en detalle.

El comportamiento de aseo se encuentra asociado con la respuesta al estrés (Dunn y col., 1981). Diversos estudios han sugerido que este comportamiento refleja una actitud de reversión de la excitación y de adaptación luego de una situación de estrés (Spruijt y col., 1992). En el presente trabajo de investigación se observó que tanto CRH como Ucn estimulan el desarrollo de un comportamiento de aseo, sin embargo CRH lo provocó inmediatamente luego de la inyección, mientras que Ucn lo estimuló con una cierta latencia. Aunque varios trabajos reportaron que la administración central de CRH produce un aumento del comportamiento de aseo (Dunn y Berridge, 1990), (Koob, 1999) únicamente Jones y col. compararon las capacidades de CRH y Ucn en estimular

el comportamiento de aseo, sin encontrar diferencias en la potencia de activación entre ambos péptidos (Jones y col., 1998). Sin embargo, estos autores no estudiaron el curso temporal de la actividad comportamental producida por CRH y Ucn, y además, la dosis de neuropéptido que administraron fue mayor (3 µg) a la utilizada en este trabajo de tesis.

La disfunción del CRH-R1 produce un aumento de la actividad comportamental durante la fase luminosa

Evidencias previas asignaron al CRH-R1 un rol importante en la regulación de las respuestas comportamentales al estrés (Dunn y Berridge, 1990), (Koob y Heinrichs, 1999), (Koob, 1999), (Owens y Nemeroff, 1991). En el presente trabajo de investigación se demostró que los ratones deficientes de CRH-R1 llevan a cabo una mayor actividad comportamental en un entorno familiar, durante la fase luminosa, en comparación con los ratones heterocigotas y los de cepa salvaje. No obstante, no se observaron efectos de la disfunción del CRH-R1 sobre el ritmo circadiano de la actividad comportamental. De esta forma, se concluye que CRH-R1 no resulta indispensable para la ejecución de una actividad comportamental normal en un entorno familiar. Por otro lado, el componente comportamental principal del aumento de la actividad en los ratones deficientes del CRH-R1 durante la fase luminosa es el comportamiento de aseo. Por lo tanto, se ha sugerido la hipótesis de que dicho comportamiento es provocado por un aumento de los efectos estimuladores de CRH o Ucn sobre el CRH-R2. En un estudio previo se observó que los ratones deficientes del CRH-R1 presentan un aumento en la inmunoreactividad a Ucn en el núcleo Edinger-Westphal (A. Kresse y W. Wurst, observaciones no publicadas) y una elevada expresión de CRH en distintas áreas cerebrales, como ser el PVN, la corteza cerebral, el hipocampo y la amígdala central (Timpl y col., 1998). Por otro lado, como se demostró en este trabajo de tesis, la administración i.c.v. de CRH y Ucn en ratas produce un aumento del comportamiento de aseo, con un mayor efecto estimulador por parte de Ucn, lo cual sugiere una participación del CRH-R2 en la ejecución de dicho comportamiento. Además, estudios en ratas demostraron que la infusión localizada de CRH en la amígdala central produce un aumento de la actividad de aseo (Wiersma y col., 1995). De esta manera, los niveles elevados de CRH y/o Ucn en los ratones deficientes del CRH-R1 potenciarían las actividades comportamentales mediadas por el CRH-R2. Un rol importante del CRH-R2 en el comportamiento de aseo ha sido también sugerido por estudios realizados en

ratones deficientes del gen del CRH-R2. Estos animales mostraron un reducido comportamiento de aseo en un paradigma de campo abierto, aunque sin alteraciones en las actividades de locomoción y exploración (Coste y col., 2000). Por otro parte, en otro modelo de ratones deficientes del CRH-R1 no se observaron diferencias con respecto a los ratones de cepa salvaje a nivel de la actividad locomotora en condiciones basales (Contarino y col., 2000). Sin embargo, la estimulación de la locomoción producida por la administración i.c.v. de CRH en ratones de cepa salvaje, fue observada en los ratones deficientes del CRH-R1 (Contarino y col., 2000). Este resultado sugiere la participación del CRH-R1 en la estimulación de la locomoción producida por CRH. Sin embargo, hasta el momento, no se puede descartar el posible desarrollo de mecanismos compensatorios a otros niveles en los ratones con manipulación genética, como por ejemplo en los sistemas de segundos mensajeros.

La deficiencia del CRH-R1 no afecta la respuesta comportamental al estrés por la natación forzada

Como se discutió previamente, CRH y Ucn desempeñan un rol importante en el comportamiento relacionado con ansiedad (Moreau y col., 1997), (Sajdyk y col., 1999), (Radulovic y col., 1999), para revisión ver (Dunn y Berridge, 1990), (Koob y Heinrichs, 1999), (Owens y Nemeroff, 1993), (Steckler y col., 1999). El uso de antagonistas específicos del CRH-R1 ha sugerido que este receptor mediaría los efectos ansiogénicos de CRH (Arborelius y col., 2000), (Deak y col., 1999). Además, se ha demostrado que los ratones deficientes del CRH-R1 muestran un reducido comportamiento ansioso en un test de campo abierto (Timpl y col., 1998), en el test de transición luz-oscuridad (Timpl y col., 1998), (Smith y col., 1998), (Contarino y col., 1999) y en el test de laberinto en cruz (Timpl y col., 1998), (Contarino y col., 1999). En el presente trabajo de investigación, los ratones fueron sujetos a un paradigma de natación forzada para evaluar las consecuencias de la deficiencia del CRH-R1 en la respuesta comportamental frente al estrés. Los resultados presentados en este trabajo señalan la ausencia de diferencias entre los genotipos en la actividad comportamental desarrollada durante y luego del procedimiento de natación. De esta manera, podría concluirse que la deficiencia del CRH-R1 no afecta la respuesta comportamental al estrés por natación forzada. Sin embargo, el fuerte componente de la amenaza de la vida que representa dicho test, más la posterior necesidad de secarse por medio del aseo, podrían confundir las diferencias putativas entre los tres genotipos con respecto

al comportamiento relacionado con el miedo durante y luego del procedimiento de natación forzada. Por otro lado, no se puede excluir la acción de mecanismos compensatorios vía la estimulación del CRH-R2.

PARTE B

Interacción entre la neurotransmisión de serotonina en el hipocampo y el ciclo de vigilia-sueño

Uno de los criterios utilizados para el diagnóstico de varios desórdenes psiquiátricos relacionados con alteraciones en el estado de ánimo es aquel relacionado con las perturbaciones del sueño que padecen los pacientes. Los pacientes con depresión mayor experimentan una reducción en la continuidad del sueño, con una disminución en la eficiencia y el tiempo total del sueño (Kaplan y col., 1994), (Benca, 1996). Por otro lado, como se discutió previamente, la disfunción del sistema de neurotransmisión serotoninérgico ha sido implicada en la patofisiología de la depresión mayor; mientras que por otra parte varios trabajos han asociado al sistema central de 5-HT en la regulación del ciclo de vigilia-sueño (revisión: (Portas y col., 2000)). Por lo tanto, basados en estas evidencias, uno de los objetivos planteados en este trabajo de investigación ha sido el estudio de la relación existente entre la actividad de las neuronas de 5-HT en el hipocampo y la inducción y mantenimiento de los estados comportamentales de vigilia y sueño. La selección del hipocampo como área de estudio se debe a su participación clave de esta estructura en el procesamiento de la información sensorial y en la coordinación de las respuestas neuroendocrinas y comportamentales a estrés (Risold y Swanson, 1996), funciones que se encuentran alteradas en los pacientes con depresión mayor. Los resultados presentados en este trabajo de investigación, y que serán discutidos a continuación, contribuyen a la caracterización de la interacción entre el sistema serotoninérgico hipocampal y los estados de vigilancia en ratas, en condiciones basales y bajo los efectos de la privación del sueño.

Los niveles extracelulares de 5-HT correlacionan con los estados comportamentales del ciclo vigilia-sueño

Los resultados presentados en este trabajo de investigación demuestran la existencia de una correlación entre los cambios de la neurotransmisión serotoninérgica en el

hipocampo y el estado comportamental en ratas. Durante los episodios de vigilia, la neurotransmisión de 5-HT mostró una actividad elevada, en tanto que durante el SL, la misma exhibió una marcada reducción, aunque los niveles más bajos de 5-HT se presentaron asociados al sREM. Estudios previos de Linthorst y col. han demostrado, una clara relación entre la actividad comportamental y la concentración de 5-HT extracelular en el hipocampo de ratas, con altos niveles asociados a un comportamiento preponderantemente activo y bajos niveles relacionados con un comportamiento de reposo, en muestras de 30 minutos de duración (Linthorst y col., 1994), (Linthorst y col., 1995). Asimismo, los resultados presentados en este trabajo de tesis coinciden con un estudio reciente de Park y col., en el cual estos autores observan, también mediante el uso de la técnica de microdiálisis, una relación entre los estados de vigilancia del animal y los niveles de 5-HT hipocampal (Park y col., 1999). Aunque estos autores utilizaron muestras de dializado de mayor duración que las recolectadas en este trabajo de tesis. En las últimas décadas varios trabajos han implicado a la neurotransmisión de 5-HT en la regulación del ciclo de vigilia-sueño. Estudios previos en gatos demostraron una correlación entre la actividad de disparo de las neuronas serotoninérgicas en los NRD (McGinty y Harper, 1976), (Trulson y Jacobs, 1979) y NRM (Trulson y col., 1984) y los estados comportamentales a lo largo del ciclo de vigilia-sueño. Estos resultados han sido también confirmados a través de la medición de los niveles extracelulares de 5-HT en el NRD, tanto en gatos (Portas y McCarley, 1994) como en ratas (Portas y col., 1998). Ambos parámetros de la neurotransmisión serotoninérgica, la tasa de disparo y los niveles extracelulares de 5-HT, presentaron un aumento en la actividad de las neuronas de 5-HT durante la vigilia, y una reducción de la misma durante el período de sueño, con una disminución secuencial desde el SL al sREM. De acuerdo con estas evidencias, una relación similar a la demostrada en los núcleos del rafe durante el ciclo de vigilia-sueño podría proponerse en áreas que reciben proyecciones de estos núcleos.

Una de las proyecciones del NRD se dirige hacia las neuronas colinérgicas mesopontinas que conforman los núcleos del tegmento laterodorsal (LDT) y pedunculopontino (PPT). Estas áreas han sido ampliamente involucradas en la promoción del sREM. En ratas, la aplicación localizada de 5-HT en los núcleos LDT/PPT reduce el sREM y los eventos fásicos asociados a este estado (Horner y col., 1997). Más aún, la administración de 8-OH-DPAT, un agonista selectivo del receptor de serotonina 5-HT_{1A}, en los núcleos LDT/PPT reduce el sREM en gatos (Sanford y col.,

1994), mientras que en ratas suprime casi completamente la actividad neuronal de las células promotoras del sREM ubicadas en estos núcleos (Thakkar y col., 1998). Por lo tanto, se ha sugerido que las estructuras del tronco cerebral que se encuentran activas durante el estado de alerta del animal, como el NRD, ejercerían la inhibición del sREM a través de los receptores 5-HT_{1A} localizados en las áreas promotoras de este estado. Por otro lado, la perfusión de 8-OH-DPAT en el NRD provoca un aumento del sREM en gatos (Portas y col., 1996) y en ratas (Bjorvatn y col., 1997).

La misma correlación entre los estados comportamentales del ciclo de vigilia-sueño y los cambios en la liberación de 5-HT ha sido también demostrada en otras áreas cerebrales que reciben proyecciones de los núcleos del rafe, tales como la corteza frontal (Portas y col., 1998), la amígdala y el bulbo en gatos (Shouse y col., 2000) y el hipocampo en ratas (Park y col., 1999). En efecto, los núcleos del NRD y NRM proyectan hacia el hipocampo con un patrón de distribución diferencial, con proyecciones de ambos núcleos en la parte ventral del hipocampo y con una proyección predominante del NRM en el área dorsal. Esta distribución fue confirmada a través de estudios electrofisiológicos, en donde se demostró que la estimulación eléctrica de los núcleos del rafe produce un aumento de la liberación de 5-HT en una forma topográficamente diferencial (Azmitia y Segal, 1978), (McQuade y Sharp, 1997), (Mokler y col., 1998). En el presente trabajo de investigación, el uso de la técnica de microdiálisis permitió la medición de los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo y la correlación de éstos con los estados de vigilancia del animal, sin embargo, la resolución específica de la inervación diferencial del hipocampo no fue posible mediante esta técnica. Futuros estudios sobre este patrón distintivo de inervación del hipocampo ayudarán a la comprensión del rol diferencial de los núcleos del rafe en la regulación del ciclo de vigilia-sueño.

Por otro parte, la neurotransmisión de 5-HT en el hipocampo participa en la modulación de la actividad theta característica de los estados de vigilia y sREM (Leung, 1998). Los resultados presentados en este trabajo de investigación estarían de acuerdo con la hipótesis que propone que la 5-HT desempeña un rol inhibitorio sobre los generadores hipocampales de la actividad theta (Marrosu y col., 1996). La reducción de los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo durante el sREM, demostrada en el presente trabajo, provoca entonces, la desinhibición de los núcleos promotores de la actividad theta, la cual permitiría la generación de este rango de frecuencias durante el sREM. Esto implica que la actividad theta presente durante el estado de vigilia tendría una

modulación colinérgica. De todas maneras, no se puede descartar la posible presencia de subpoblaciones de neuronas serotoninérgicas cuya actividad se encuentre reducida durante la vigilia y sean las responsables de la generación de la actividad theta hipocampal durante dicho estado (Veasey y col., 1997). Además, es necesario considerar que mediante la técnica de microdiálisis no es posible obtener una resolución anatómica suficiente como para discriminar la actividad de estas subpoblaciones neuronales.

Los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo aumentan durante el período de privación del sueño por manipulación delicada.

Los resultados de este trabajo de investigación constituyen la primer evidencia directa de los efectos de la privación del sueño sobre la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo, y los efectos de la vigilia forzada en el período subsiguiente de recuperación del sueño. Un período de 4 horas de privación del sueño por manipulación delicada produce un aumento de los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo (40 %), en comparación con los niveles del neurotransmisor durante la vigilia espontánea durante la misma ventana temporal del ciclo luz-oscuridad. Varios autores han propuesto que la actividad comportamental es un determinante importante de la neurotransmisión de 5-HT, y que probablemente el incremento de 5-HT observado durante la fase oscura, o activa en ratas, resulta como consecuencia de un aumento sostenido de la actividad motora (Dudley y col., 1998), (Jacobs y Azmitia, 1992), (Linthorst y col., 1995), (Mendlin y col., 1996), (Rueter y Jacobs, 1996b). Los niveles de 5-HT hipocampal desarrollados durante el período de privación del sueño, al comienzo de la fase luminosa, no difieren de los máximos valores alcanzados durante la vigilia espontánea en la fase oscura (estudios preliminares no publicados). Por lo tanto, no se puede descartar la posibilidad de que el incremento de los niveles de 5-HT durante la vigilia forzada se deba al desarrollo de una actividad comportamental sostenida.

Estudios anteriores han sugerido que la privación del sueño posee un efecto sobre el sistema de neurotransmisión de 5-HT. Toru y col. demostraron que la concentración tisular de 5-HIAA aumenta en el NRD y en el tálamo de ratas, luego de 24 horas de vigilia forzada, sin embargo no fueron encontradas diferencias significativas en la concentración tisular de 5-HT (Toru y col., 1984). Otro estudio demostró que un período de tan solo 3 horas de privación del sueño por manipulación delicada produce un aumento en el metabolismo de 5-HT en la corteza frontal, el hipocampo, el hipotálamo

y el tronco cerebral (Asikainen y col., 1997). Sin embargo, estos estudios no describen los posibles cambios en la neurotransmisión de 5-HT a lo largo del período completo de la privación del sueño y los efectos sobre el período subsiguiente de recuperación. Estudios electrofisiológicos en gatos, demostraron que la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NRD aumenta durante el período de privación del sueño, retornando luego a valores basales durante la etapa de recuperación (Gardner y col., 1997). Recientemente, Grossman y col. demostraron que 3 horas de privación del sueño por manipulación delicada provoca una estimulación de los niveles extracelulares de 5-HT en el núcleo supraquiasmático de hámster, área que recibe proyecciones del NRD (Grossman y col., 2000). Por otra parte, Prevot y col. demostraron que la privación del sueño, en ratas, produce una reducción de la inhibición de la tasa de disparo de las neuronas de 5-HT del NRD provocada por citalopram, un inhibidor de la recaptación de 5-HT que induce el aumento extracelular del neurotransmisor (Prevot y col., 1996). Similares resultados fueron obtenidos en gatos, por Gardner y col. Estos autores demostraron que la inhibición de la actividad neuronal en el NRD producida por la administración sistémica de 8-OH-DPAT, un agonista selectivo del receptor 5-HT_{1A}, es disminuida por la privación del sueño (Gardner y col., 1997). Estos resultados sugieren que la vigilia forzada durante un período en el cual la presión de sueño es elevada, resulta en la desensibilización de los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A}. Esta desensibilización estaría implicada, a su vez, en la reducción de la respuesta de las neuronas serotoninérgicas del NRD al mecanismo de retroalimentación negativa, lo cual derivaría a una actividad neuronal elevada. El normal desarrollo del ritmo circadiano de la expresión de los autorreceptores 5-HT_{1A}, que en ratas consiste en una baja expresión durante la mañana o comienzo de la fase luminosa y una concentración máxima alrededor del comienzo de la fase oscura (Wesemann y Weiner, 1990), (Pauli, 97 A.D.), (Reul y Linthorst, 2000) podría estar involucrado en la reducción de la respuesta autoinhibitoria de las neuronas serotoninérgicas del NRD. Por otro lado, los resultados del presente trabajo de tesis demuestran que la privación del sueño por manipulación delicada constituye una situación de estrés para el animal (ver discusión más adelante), por lo tanto, no se puede descartar que en este paradigma experimental, la activación del eje HPA desempeñe un rol importante en la desensibilización de los autorreceptores de las neuronas serotoninérgicas (Meijer y de Kloet, 1998). Por lo tanto, la identificación de los mecanismos involucrados en el aumento de actividad del sistema serotoninérgico durante el período de privación del sueño necesita de estudios más detallados, como

por ejemplo, el análisis de los efectos de la adrenalectomía en la misma. Por otra parte, la administración crónica de drogas antidepresivas, especialmente los inhibidores específicos de la recaptación de 5-HT, produce un aumento progresivo en la neurotransmisión de 5-HT, y se ha demostrado que tal incremento es, en parte, consecuencia de la desensibilización de los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} dentro del NRD (revisión: (Gardier y col., 1996)). Por lo tanto, basados en los resultados presentados en este trabajo de tesis y en evidencias previas de otros autores, se sugiere que la reducción de la respuesta de retroalimentación negativa mediada por la desensibilización de los autorreceptores 5-HT_{1A} sería el mecanismo que potencia la secreción de 5-HT durante la privación del sueño.

Los niveles extracelulares de 5-HT hipocampal retornan inmediatamente a los valores basales durante el período de recuperación del sueño

Como se discutió en el apartado anterior, 4 horas de privación del sueño por manipulación delicada produce un aumento en la neurotransmisión de 5-HT hipocampal. Sin embargo, durante el período subsiguiente de recuperación del sueño, los niveles extracelulares de 5-HT hipocampal, asociados con los estados del sueño, SL y sREM, no difirieron de los valores observados para los mismos estados bajo condiciones basales y dentro de la misma ventana temporal del ciclo de luz-oscuridad. Además, se mantuvo la correlación entre la concentración de 5-HT hipocampal y los estados comportamentales del animal, observándose los máximos niveles de 5-HT durante la vigilia, los niveles intermedios durante el SL y los niveles mínimos durante el sREM. Luego de finalizado el procedimiento de privación de sueño, la mayoría de los animales permanecieron despiertos y activos espontáneamente por algunos minutos (3 - 20 minutos). Estos episodios de vigilia dieron lugar a las únicas muestras de dializado asociadas con un 100 % de este estado comportamental, durante las 2 horas del período de recuperación analizadas. De manera predecible, los niveles de 5-HT en estas muestras permanecieron elevados, reflejando la continuación de la activación exacerbada del sistema serotoninérgico.

El retorno de los niveles de 5-HT en el hipocampo a concentraciones basales durante el SL y el sREM, inmediatamente luego de la actividad acrecentada del sistema serotoninérgico, sugeriría que el mecanismo involucrado en la inhibición de las neuronas de 5-HT del NRD, el cual daría lugar a la activación de las neuronas generadoras del sueño, no fue alterado durante las 4 horas continuas de vigilia forzada.

Uno de los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas del NRD es la retroalimentación negativa a través de los autorreceptores 5-HT_{1A}. Como se discutió previamente, una desensibilización de los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} ocurriría durante la privación del sueño (Prevot y col., 1996). Por consiguiente, es probable que otro proceso de regulación participe, o sea responsable, de la reducción de los niveles de 5-HT a valores basales durante los estados de sueño. Estudios de microdiálisis en gatos señalan un aumento en los niveles de GABA en el NRD durante el sREM (Nitz y Siegel, 1997). Además, en ese mismo estudio, se observó que la microinfusión en el NRD de picrotoxina, una antagonista de GABA, bloquea la generación del sREM (Nitz y Siegel, 1997). Estudios realizados por otros autores en ratas sugieren que el aumento del tono inhibitorio GABAérgico está implicado en la reducción de la actividad de las neuronas serotoninérgicas del NRD durante el SL y el sREM (Gervasoni y col., 2000). Estos resultados han sido confirmados mediante estudios *in vitro*, donde se observó que la inducción de las corrientes inhibitorias postsinápticas producida por 5-HT sobre los cuerpos neuronales serotoninérgicos del NRD es bloqueada por la presencia de bicuculina, un antagonista del receptor GABA_A (Liu y col., 2000). Un trazado retrógrado de la inervación GABAérgica del NRD indicó que uno de los orígenes de estas proyecciones lo conforma el área preóptica lateral (Gervasoni y col., 2000), involucrada en el comienzo y mantenimiento del sueño (Sherin y col., 1996), (Szymusiak y col., 1998). Recientemente, neuronas GABAérgicas promotoras del sueño han sido identificadas en el núcleo preóptico ventrolateral (VLPO), y serían las encargadas de llevar a cabo la inhibición de las áreas serotoninérgicas y noradrenérgicas responsables de la promoción del estado de vigilia (Gallopin y col., 2000). Por otro lado, esas mismas áreas serotoninérgicas y noradrenérgicas promotoras del estado de vigilia, envían proyecciones hacia las neuronas del VLPO, las cuales tendrían un rol inhibitorio durante el estado de vigilia (Gallopin y col., 2000), conformando así, un mecanismo de regulación recíproca entre las áreas generadoras de los estados comportamentales. Esta reducción en la actividad del sistema de 5-HT debida a la participación regulatoria de las proyecciones GABAérgicas, avala el modelo propuesto por McCarley y col. para la generación del sueño REM (McCarley y col., 1995).

La concentración de corticosterona libre en el SNC aumenta durante la privación del sueño

En el presente trabajo de tesis se demostró que la privación del sueño por manipulación delicada produce un marcado aumento en los niveles de la corticosterona libre en el SNC durante las 4 horas del procedimiento. Los animales fueron manipulados diariamente, previo al experimento, para evitar la influencia de un entorno extraño en los resultados. Esta consideración, mas el análisis del curso temporal (máximo nivel alcanzado a los 90 minutos) y la magnitud de la respuesta de los niveles de corticosterona libre a la privación del sueño, descartan la posibilidad de que el incremento observado se deba a la exposición del animal a un entorno novedoso (estrés moderado), y sugiere que las 4 horas de vigilia forzada constituyen *per se* una situación de estrés para el animal. La observación directa del comportamiento del animal durante el período de privación del sueño mostró un aumento gradual de la perturbación del animal a lo largo de las 4 horas, siendo la última hora la más difícil para mantener al animal despierto. Sin embargo, el curso temporal de los niveles de corticosterona libre muestra un aumento pronunciado durante las primeras dos horas del procedimiento de privación del sueño, permaneciendo luego durante el resto del procedimiento en un nivel elevado pero continuo. Esta reducción en la magnitud de la respuesta de corticosterona libre cuando resulta evidente que la situación es estresante para el animal sugiere la participación de un mecanismo de retroalimentación negativa. Por otra parte, evidencias previas demostraron que situaciones o factores de estrés que producen un aumento en los niveles de corticosterona, provocan también un incremento en la neurotransmisión de serotonina en ratas (Linthorst y col., 1999), (Adell y col., 1997). Además, Laaris y col. describieron *in vivo* e *in vitro*, que la corticosterona produce una reducción de los efectos inhibitorios del agonista del receptor de 5-HT_{1A} sobre la frecuencia de disparo de las neuronas de 5-HT en el NRD, lo cual sugiere que la corticosterona posee efectos moduladores sobre los autorreceptores serotoninérgicos del NRD, (Laaris y col., 1995, 1997, 1999). Por lo tanto, no se puede excluir la participación del incremento de los niveles de corticosterona libre en la desensibilización de los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} del NRD que tendría lugar durante la privación del sueño.

Por otra parte, el aumento en los niveles de la corticosterona libre durante las 4 horas de vigilia forzada, llevadas a cabo al comienzo de la fase luminosa, no alteró la continuidad del ritmo circadiano del esteroide en el SNC.

Un período de 4 horas de privación del sueño produce un aumento en la actividad de onda lenta del EEG

La actividad de onda lenta del EEG (0,5 - 4,0 Hz) es frecuentemente usada como un parámetro indicador de la intensidad del sueño, la cual estaría homeostáticamente determinada por los periodos de vigilia y sueño precedentes (Tobler y Borbely, 1986), (Borbely y col., 1984), (Lancel, 1993). Los resultados presentados en este trabajo de investigación muestran que la vigilia forzada por un período de 4 horas, provoca un marcado incremento en la actividad de onda lenta del EEG. Este aumento en la amplitud de la frecuencia de onda lenta (205 % del valor basal) se mantuvo significativamente a lo largo de las dos horas del período de recuperación del sueño analizadas en este estudio, en paralelo con un incremento del tiempo total del SL. Sin embargo, pese a la tendencia a la disminución del tiempo total de la vigilia, no se observaron diferencias significativas en los tiempos totales de los estados de vigilia y sREM, con respecto al basal. Resultados similares fueron obtenidos por García-García y col., quienes mostraron que la vigilia forzada por manipulación delicada durante 4 horas provoca un aumento de la actividad de onda lenta, sin modificar los tiempos totales de vigilia y sREM (García-García y col., 1998). Otro estudio señaló que 6 horas de privación del sueño produce un aumento inmediato y persistente de la actividad de onda lenta y del tiempo total del SL en ratas, aunque un procedimiento de 3 horas induce un incremento del SL en forma retardada y transitoria, pero no tiene efectos sobre la actividad de onda lenta del EEG (Tobler y Borbely, 1990). En ambos casos el sREM no fue afectado.

Por otro lado, varios autores han propuesto que la neurotransmisión serotoninérgica desempeña un rol inhibitorio sobre la generación de las ondas lentas durante la vigilia, momento en que el sistema de 5-HT se encuentra activado. Por lo tanto, la reducción de los niveles de 5-HT durante el período de recuperación del sueño, permitiría la generación y el aumento de la actividad de onda lenta del EEG durante el SL (Hobson, 1999). Sin embargo, es necesario realizar estudios más detallados sobre la relación entre el aumento en la neurotransmisión de 5-HT hipocampal durante el período de vigilia forzada y el marcado incremento en la actividad de onda lenta en los episodios de SL durante la etapa de recuperación.

La privación de sueño como terapia antidepresiva

El procedimiento de la privación del sueño, por una o dos noches, en pacientes que

padecen de depresión mayor tiene efectos antidepresivos en aproximadamente un 60 % de los casos (Wu y Bunney, 1990). Sin embargo, estos efectos positivos son inmediatos pero transitorios. Los pacientes con depresión sometidos a la terapia de privación del sueño recaen en la sintomatología de la enfermedad luego de la subsiguiente noche de sueño o siesta. Por el contrario, el tratamiento con drogas antidepresivas, requiere de períodos prolongados (2 a 3 semanas) hasta la aparición de los efectos terapéuticos, lo cual indica la necesidad de cambios profundos a nivel de la expresión génica en los sistemas de neurotransmisores y endocrino (Blier y de Montigny, 1999), (Nemeroff, 1998), (Marsden, 1991) Por otra parte, como se mencionó previamente, la disfunción de la neurotransmisión de serotonina ha sido implicada en la patofisiología de la depresión mayor (Maes y Meltzer, 1995), (Cowen y Wood, 1991), (Mann, 1999), (Cryan y Leonard, 2000). De hecho, ha sido demostrado que la mayoría de los tratamientos antidepresivos afectan el sistema central de 5-HT, produciendo un aumento de los niveles extracelulares de 5-HT (Blier y de Montigny, 1994), (Mongeau y col., 1997), (Blier y de Montigny, 1999), el cual sería mediado por la desensibilización de los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} (Gardier y col., 1996), (Singh y Lucki, 1993), (Kreiss y Lucki, 1995). Coincidiendo con esta idea, el aumento de los niveles de 5-HT observado durante un período de vigilia forzada, y propuesto como resultado de una desensibilización de los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A}, podría ser el mecanismo por el cual la privación del sueño ejerce sus efectos antidepresivos. No obstante, dadas las diferencias en el desarrollo temporal de los efectos antidepresivos y en la estabilidad de la acción terapéutica entre el procedimiento de privación del sueño y el tratamiento con drogas antidepresivas, como los SSRI, resulta claro que distintos mecanismos efectores se encuentran involucrados en cada uno de estos efectos. Por lo tanto, un estudio detallado de los mecanismos fisiológicos involucrados en ambos procedimientos, ayudaría a la mejor comprensión de los procesos implicados en la etiología y el tratamiento de la depresión mayor.

6- CONCLUSIONES

Los estudios realizados en el presente trabajo de Tesis permitieron alcanzar las siguientes conclusiones:

I- El sistema central de CRH posee efectos reguladores sobre el sistema de neurotransmisión serotoninérgico en roedores.

- La infusión de CRH o Ucn produce la activación de la expresión de c-fos en áreas específicas del SNC de la rata.
- La administración i.c.v. de CRH y Ucn produce un aumento en los niveles extracelulares de 5-HT y su metabolito 5-HIAA en el hipocampo. Ucn produce una mayor estimulación en comparación con la administración de una misma dosis de CRH. Dichos efectos de CRH sobre la neurotransmisión serotoninérgica hipocampal no estarían mediados por corticosterona.

II- La disfunción del sistema de CRH (deficiencia del CRH-R1) provoca alteraciones en la transmisión de 5-HT hipocampal bajo condiciones basales y en respuesta al estrés

- La disfunción crónica del CRH-R1 provoca un aumento en la síntesis de 5-HT, aunque no altera sus niveles extracelulares en el hipocampo, ni el ritmo circadiano del neurotransmisor. Asimismo, tampoco afecta la relación entre los niveles de 5-HT hipocampal y el grado de actividad comportamental del animal en condiciones basales.
- En ratones de cepa salvaje, el estrés por natación forzada produce un aumento de los niveles de 5-HT y 5-HIAA hipocampal. La deficiencia del CRH-R1 provoca un acrecentamiento de la respuesta de 5-HT al estrés, no obstante la respuesta de 5-HIAA no fue alterada.

III- Los receptores de CRH participan de una manera diferencial en la regulación de la activación del eje HPA

- La administración i.c.v. de CRH o Ucn produce un aumento en los niveles extracelulares de corticosterona libre en el SNC. Ucn posee un mayor efecto, comparado con una misma dosis de CRH, sin embargo, la respuesta temporal del esteroide difiere con respecto al neuropéptido y dosis administrada.
- Los niveles de corticosterona libre en el SNC son indetectables en animales que presentan una disfunción del CRH-R1.

IV- Los receptores de CRH poseen un rol diferencial en el control de la actividad comportamental

- La administración i.c.v. de CRH o Ucn ejerce una marcada estimulación de la actividad comportamental de la rata en un entorno familiar. Sin embargo, estos neuropéptidos estimulan un patrón comportamental diferencial.
- Los ratones con deficiencia genética del CRH-R1 desarrollan una mayor actividad comportamental durante la fase luminosa del ciclo de luz-oscuridad. Sin embargo, la disfunción de dicho receptor no produce diferencias en el comportamiento en respuesta al estrés por natación forzada.

V- La neurotransmisión de 5-HT en el hipocampo correlaciona con los estados del ciclo de vigilia-sueño

- Los niveles extracelulares de 5-HT hipocampal correlacionan con el estado de vigilancia. Los niveles más altos de 5-HT en el hipocampo se asocian al estado de vigilia. Una reducción en los niveles de 5-HT tiene lugar durante el SL, mientras que los niveles mínimos de 5-HT se observan durante el sREM.

VI- La privación de sueño provoca un aumento en la actividad de la neurotransmisión serotoninérgica hipocampal, sin embargo los niveles de 5-HT retornan a valores basales durante la recuperación

- La privación de sueño por manipulación delicada durante un período de 4 horas produce la estimulación de la transmisión serotoninérgica hipocampal. Sin

embargo, durante las 2 horas subsiguientes de recuperación del sueño, los niveles de 5-HT retornan a niveles basales en los episodios de SL y sREM.

VII- La vigilia forzada por manipulación delicada constituye una situación de estrés para el animal

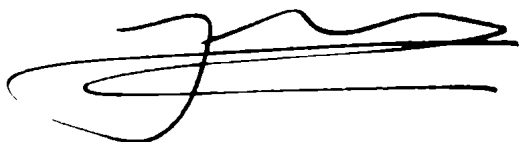
- La privación de sueño, pese a ser por manipulación delicada, provoca un aumento de los niveles de corticosterona libre durante la vigilia forzada. Sin embargo, este efecto no altera el normal desarrollo del ciclo circadiano de la corticosterona libre.

Los resultados de estudios en animales presentados en este trabajo de tesis contribuyen a la hipótesis de la existencia de una interacción entre los sistemas de CRH y de neurotransmisión serotoninérgica. La administración central de CRH y Ucn produce un marcado aumento en los niveles de 5-HT hipocampales, con distintos poderes de estimulación para ambos péptidos, lo cual sugiere la participación del CRH-R2 en estos efectos. Más aún, la disfunción crónica del CRH-R1 posee consecuencias sobre la neurotransmisión serotoninérgica, provocando un aumento en la síntesis de 5-HT y una mayor respuesta de este neurotransmisor al estrés. Como se describió previamente en la introducción, desórdenes en el funcionamiento de los sistemas de CRH y de la neurotransmisión serotoninérgica han sido involucrados en la etiología de la depresión mayor. Los resultados presentados en este trabajo de tesis resultan también de interés desde un punto de vista terapéutico, ya que se demostró que el bloqueo crónico de la función del CRH-R1 provoca un aumento en la neurotransmisión serotoninérgica, efecto que podría estar implicado en la acción antidepresiva de antagonistas específicos del CRH-R1 reportada recientemente en humanos (Zobel y col., 2000).

Por otra parte, los resultados presentados en este trabajo de investigación muestran que el procedimiento de privación del sueño produce un aumento en los niveles hipocampales de 5-HT, el cual podría estar implicado en los efectos terapéuticos de este procedimiento en pacientes depresivos. Además, la evidencia aportada en este trabajo de que este cambio en la neurotransmisión serotoninérgica desaparece durante el subsiguiente período de recuperación del sueño, podría explicar la breve duración de los efectos antidepresivos de la privación del sueño.

A stylized handwritten signature in black ink, featuring a large, sweeping initial 'R' followed by a series of connected loops and a long horizontal stroke at the end.

Lic. R. G. Peñalva

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, bold, stylized 'J' followed by a series of horizontal strokes and a final upward curve.

Dr. J.M.H.M. Reul

A handwritten signature in black ink, featuring a large, bold, stylized 'A' followed by a series of vertical strokes and a final horizontal stroke.

Dr. E. Arzt

7- REFERENCIAS

- Adell,A., Casanovas,J.M., y Artigas,F. (1997). Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacology* 36, 735-741.
- Amat,J., Matus-Amat,P., Watkins,L.R., y Maier,SF. (1998). Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Research* 812, 113-120.
- Andreae,L.C. y Herbert,J. (1993). Expression of c-fos in restricted areas of the basal forebrain and brainstem following single or combined intraventricular infusions of vasopressin and corticotropin-releasing factor. *Neuroscience* 53, 735-748.
- Arborelius,L., Owens,M.J., Plotsky,P.M., y Nemeroff,C.B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. [Review]. *Journal of Endocrinology* 160, 1-12.
- Arborelius,L., Skelton,K.H., Thrivikraman,K.V., Plotsky,P.M., Schulz,D.W., y Owens,MJ. (2000). Chronic administration of the selective corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist CP-154,526: behavioral, endocrine and neurochemical effects in the rat. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 294, 588-597.
- Arnold,F.J., De Lucas,B.M., Shiers,H., Hancock,D.C., Evan, GI, y Herbert,J. (1992). Expression of c-fos in regions of the basal limbic forebrain following intracerebroventricular corticotropin-releasing factor in unstressed or stressed male rats. *Neuroscience* 51, 377-390.
- Asaba,K., Makino,S., y Hashimoto,K. (1998). Effect of urocortin on ACTH secretion from rat anterior pituitary in vitro and in vivo: comparison with corticotropin-releasing hormone. *Brain Research* 806, 95-103.
- Asikainen,M., Toppila,J., Alanko,L., Ward,D.J., Stenberg,D., y Porkkaheiskanen T. (1997). Sleep deprivation increases brain serotonin turnover in the rat. *Neuroreport* 8, 1577-1582.
- Auerbach,S.B., Minzenberg,M.J., y Wilkinson,L.O. (1989). Extracellular serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in hypothalamus of the unanesthetized rat measured by in vivo dialysis coupled to high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: dialysate serotonin reflects neuronal release. *Brain Research* 499, 281-290.
- Azmitia,E.C., Jr. y McEwen,B.S. (1969). Corticosterone regulation of tryptophan hydroxylase in midbrain of the rat. *Science* 166, 1274-1276.
- Azmitia,E.C., Jr. y McEwen,B.S. (1974). Adrenalcortical influence on rat brain tryptophan hydroxylase activity. *Brain Research* 78, 291-302.

- Azmitia, E.C. y Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 179, 641-667.
- Bale, T.L., Contarino, A., Smith, G.W., Chan, R., Gold, L.H., Sawchenko, P.E., Koob, G.F., Vale, W.W., y Lee, K.F. (2000). Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nature Genetics* 24, 410-414.
- Barnes, N.M. y Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. [Review]. *Neuropharmacology* 38, 1083-1152.
- Behan, D.P., Potter, E., Sutton, S., Fischer, W., Lowry, P.J., y Vale, W.W. (1993). Corticotropin-releasing factor-binding protein. A putative peripheral and central modulator of the CRF family of neuropeptides. [Review]. *Annals of the New York Academy of Sciences* 697, 1-8.
- Behan, D.P., Heinrichs, S.C., Troncoso, J.C., Liu, X.J., Kawas, C.H., Ling, N., y De Souza, E.B. (1995). Displacement of corticotropin releasing factor from its binding protein as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Nature* 378, 284-287.
- Behan, D.P., De Souza, E.B., Potter, E., Sawchenko, P., Lowry, P.J., y Vale, W.W. (1996a). Modulatory actions of corticotropin-releasing factor-binding protein. [Review]. *Annals of the New York Academy of Sciences* 780, 81-95.
- Behan, D.P., Grigoriadis, D.E., Lovenberg, T., Chalmers, D., Heinrichs, S., Liaw, C., y De Souza, E.B. (1996b). Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. [Review]. *Molecular Psychiatry* 1, 265-277.
- Benca, R.M. (1996). Sleep in psychiatric disorders. [Review]. *Neurologic Clinics* 14, 739-764.
- Besedovsky, H., Del Rey, A., Sorkin, E., y Dinarello, C.A. (1986). Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233, 652-654.
- Bittencourt, J.C., Vaughan, J., Arias, C., Rissman, R.A., Vale, W.W., y Sawchenko, P.E. (1999). Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *Journal of Comparative Neurology* 415, 285-312.
- Bittencourt, J.C. y Sawchenko, P.E. (2000). Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors?: an analysis in the central corticotropin-releasing factor system. *Journal of Neuroscience* 20, 1142-1156.

- Bjorvatn,B., Fagerland,S., Eid,T., y Ursin,R. (1997). Sleep/waking effects of a selective 5-HT_{1A} receptor agonist given systemically as well as perfused in the dorsal raphe nucleus in rats. *Brain Research* 770, 81-88.
- Blier,P. y de Montigny,C. (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. [Review]. *Trends in Pharmacological Sciences*. 15, 220-226.
- Blier,P. y de Montigny,C. (1999). Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders. [Review]. *Neuropsychopharmacology* 21, 91S-98S.
- Bonvento,G., Scatton,B., Claustre,Y., y Rouquier,L. (1992). Effect of local injection of 8-OH-DPAT into the dorsal or median raphe nuclei on extracellular levels of serotonin in serotonergic projection areas in the rat brain. *Neuroscience Letters* 137, 101-104.
- Borbely,A.A. (1998). Processes underlying sleep regulation. [Review]. *Hormone Research* 49, 114-117.
- Borbely,A.A., Neuhaus,H.U., y Tobler,I. (1981). Effect of p-chlorophenylalanine and tryptophan on sleep, EEG and motor activity in the rat. *Behavioural Brain Research*. 2, 1-22.
- Borbely,A.A., Tobler,I., y Hanagasioglu,M. (1984). Effect of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the rat. *Behavioural Brain Research*. 14, 171-182.
- Bourgeois,S., Gruol,D.J., Newby,R.F., y Rajah,F.M. (1993). Expression of an mdr gene is associated with a new form of resistance to dexamethasone-induced apoptosis. *Molecular Endocrinology* 7, 840-851.
- Brakkee,J.H., Wiegant,V.M., y Gispen,W.H. (1979). A simple technique for rapid implantation of a permanent cannula into the rat brain ventricular system. *Laboratory Animal Science* 29, 78-81.
- Brouxhon,S.M., Prasad,A.V., Joseph,S.A., Felten,D.L., y Bellinger,DL. (1998). Localization of corticotropin-releasing factor in primary and secondary lymphoid organs of the rat. *Brain, Behavior, & Immunity* 12, 107-122.
- Brown,G.W., Harris,T.O., y Hepworth,C. (1994). Life events and endogenous depression. A puzzle reexamined. *Archives of General Psychiatry* 51, 525-534.
- Brown,M.R., Fisher,L.A., Spiess,J., Rivier,C., Rivier,J., Vale, y W. (1982). Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology* 111, 928-931.
- Brown,M.R. y Fisher,L.A. (1985). Corticotropin-releasing factor: effects on the autonomic nervous system and visceral systems. *Federation Proceedings* 44, 243-248.

- Buyse,D.J., Nofzinger,E.A., Keshavan,M.S., Reynolds,C.F., y Kupfer,D.J. (1999). Psychiatric Disorders Associated with Disturbed Sleep and Circadian Rhythms. In Regulation of Sleep and Circadian Rhythms, F.W.Turek and P.C.Zee, editores. (New York: Marcel Dekker,Inc.), pg. 597-641.
- Buzsaki,G. (1998). Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective. *Journal of Sleep Research 7 Suppl 1*, 17-23.
- Cespuglio,R., Sarda,N., Gharib,A., Chastrette,N., Houdouin,F., Rampin,C., y Jouvet,M. (1990). Voltammetric detection of the release of 5-hydroxyindole compounds throughout the sleep-waking cycle of the rat. *Experimental Brain Research 80*, 121-128.
- Chalmers,D.T., Lovenberg,T.W., y De Souza,E.B. (1995). Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *Journal of Neuroscience. 15*, 6340-6350.
- Chalmers,D.T., Lovenberg,T.W., Grigoriadis,D.E., Behan,D.P., de, y Souza,E.B. (1996). Corticotrophin-releasing factor receptors: from molecular biology to drug design. [Review]. *Trends in Pharmacological Sciences. 17*, 166-172.
- Chang,C.P., Pearse,R.V., O'Connell,S., y Rosenfeld,M.G. (1993). Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron 11*, 1187-1195.
- Chaouloff,F., Berton,O., y Mormede,P. (1999). Serotonin and stress. [Review]. *Neuropsychopharmacology 21*, 28S-32S.
- Contarino,A., Dellu,F., Koob,G.F., Smith,G.W., Lee,K.F., Vale, W, y Gold,L.H. (1999). Reduced anxiety-like and cognitive performance in mice lacking the corticotropin-releasing factor receptor 1. *Brain Research 835*, 1-9.
- Contarino,A., Dellu,F., Koob,G.F., Smith,G.W., Lee,K.F., Vale,W.W., y Gold,L.H. (2000). Dissociation of locomotor activation and suppression of food intake induced by CRF in CRFR1-deficient mice. *Endocrinology 141*, 2698-2702.
- Coplan,J.D. y Lydiard,R.B. (1998). Brain circuits in panic disorder. [Review]. *Biological Psychiatry 44*, 1264-1276.
- Coste,S.C., Kesterson,R.A., Heldwein,K.A., Stevens,S.L., Heard,A.D., Hollis,J.H., Murray,S.E., Hill,J.K., Pantely,G.A., Hohimer,A.R., Hatton,D.C., Phillips,T.J., Finn,D.A., Low,M.J., Rittenberg,M.B., Stenzel,P., and Stenzel-Poore,M.P. (2000). Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nature Genetics. 24*, 403-409.

Cowen,P.J. y Wood,A.J. (1991). Biological markers of depression [editorial]. [Review]. *Psychological Medicine* 21, 831-836.

Cryan,J.F. y Leonard,B.E. (2000). 5-HT_{1A} and beyond: The role of serotonin and its receptors in depression and the antidepressant response [Review]. *Human Psychopharmacology*. 15, 113-135.

Dahlstrom,A. y Fuxe,K. (1964). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiologica Scandinavica* 62, 1-55.

De Souza,E.B. (1995). Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. [Review]. *Psychoneuroendocrinology* 20, 789-819.

Deak,T., Nguyen,K.T., Ehrlich,A.L., Watkins,L.R., Spencer,R.L., Maier,S.F., Licinio,J., Wong,M.L., Chrousos,G.P., Webster,E., y Gold,P.W. (1999). The impact of the nonpeptide corticotropin-releasing hormone antagonist antalarmin on behavioral and endocrine responses to stress. *Endocrinology* 140, 79-86.

Del Rey,A., Besedovsky,H., Sorkin,E., y Dinarello,C.A. (1987). Interleukin-1 and glucocorticoid hormones integrate an immunoregulatory feedback circuit. *Annals of the New York Academy of Sciences* 496, 85-90.

Delgado,P.L., Charney,D.S., Price,L.H., Aghajanian,G.K., Landis, H, y Heninger,G.R. (1990). Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. *Archives of General Psychiatry* 47, 411-418.

Demet,E.M., Chicz-Demet,A., Fallon,J.H., y Sokolski,K.N. (1999). Sleep deprivation therapy in depressive illness and Parkinson's disease. [Review]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 23, 753-784.

Diamant,M. y de Wied,D. (1991). Autonomic and behavioral effects of centrally administered corticotropin-releasing factor in rats. *Endocrinology* 129, 446-454.

Dieterich,K.D., Lehnert,H., y De Souza,E.B. (1997). Corticotropin-releasing factor receptors: an overview. [Review]. *Experimental & Clinical Endocrinology & Diabetes* 105, 65-82.

Donaldson,C.J., Sutton,S.W., Perrin,M.H., Corrigan,A.Z., Lewis,K.A., Rivier,J.E., Vaughan,J.M., y Vale,W.W. (1996). Cloning and Characterization of Human Urocortin. *Endocrinology* 137, 3896.

Dudley,T.E., DiNardo,L.A., y Glass,J.D. (1998). Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience* 18, 5045-5052.

Dunn,A.J., Guild,A.L., Kramarcy,N.R., y Ware,M.D. (1981). Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTH or beta-endorphin. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 15, 605-608.

Dunn,A.J. y Berridge,C.W. (1990). Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses?. [Review]. *Brain Research - Brain Research Reviews* 15, 71-100.

Eaves,M., Thatcher-Britton,K., Rivier,J., Vale,W., y Koob,G.F. (1985). Effects of corticotropin releasing factor on locomotor activity in hypophysectomized rats. *Peptides* 6, 923-926.

Fernandes,C., McKittrick,C.R., File,S.E., y McEwen,B.S. (1997). Decreased 5-HT_{1A} and increased 5-HT_{2A} receptor binding after chronic corticosterone associated with a behavioural indication of depression but not anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 22, 477-491.

Franklin,K.B.J. y Paxinos,G. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. (San Diego:Academic Press)

Frazer,A. y Hensler,J.G. (1994). Serotonin. In *Basic Neurochemistry*, G.J.Siegel, B.W.Agranoff, R.W.Albers, and P.B.Molinoff, editores. (New York: Raven Press), pg. 263-292.

Freund,T.F., Gulyas,A.I., Acsady,L., Gorcs,T., y Toth,K. (1990). Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87, 8501-8505.

Gallopín,T., Fort,P., Eggermann,E., Cauli,B., Luppi,P.H., Rossier,J., Audinat,E., Uhlethaler,M., and Serafin,M. (2000). Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 404, 992-995.

Garcia-Garcia,F., Beltran-Parrazal,L., Jimenez-Anguiano,A., Vega-Gonzalez,A., y Drucker-Colin,R. (1998). Manipulations during forced wakefulness have differential impact on sleep architecture, EEG power spectrum, and Fos induction. *Brain Research* 47, 317-324.

Gardier,A.M., Malagie,I., Trillat,A.C., Jacquot,C., y Artigas,F. (1996). Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. [Review]. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 10, 16-27.

- Gardner,J.P., Fornal,C.A., y Jacobs,B.L. (1997). Effects of sleep deprivation on serotonergic neuronal activity in the dorsal raphe nucleus of the freely moving cat. *Neuropsychopharmacology* 17, 72-81.
- Gervasoni,D., Peyron,C., Rampon,C., Barbagli,B., Chouvet,G., Urbain,N., Fort, P, y Luppi,P.H. (2000). Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *Journal of Neuroscience* 20, 4217-4225.
- Gray,T.S. y Bingaman,E.W. (1996). The amygdala: corticotropin-releasing factor, steroids, and stress. [Review]. *Critical Reviews in Neurobiology* 10, 155-168.
- Grigoriadis,D.E., Lovenberg,T.W., Chalmers,D.T., Liaw,C., de, y Souze,E.B. (1996). Characterization of corticotropin-releasing factor receptor subtypes. [Review]. *Annals of the New York Academy of Sciences* 780, 60-80.
- Grossman,G.H., Mittleberger,R.E., Antle,M.C., Ehlen,J.C., y Glass,J.D. (2000). Sleep deprivation stimulates serotonin release in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 11, 1929-1932.
- Hammond,G.L., Smith,C.L., y Underhill,D.A. (1991). Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. [Review]. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 40, 755-762.
- Heinrichs,S.C., Menzaghi,F., Merlo,P.E., Britton,K.T., y Koob,GF. (1995). The role of CRF in behavioral aspects of stress. [Review]. *Annals of the New York Academy of Sciences* 771, 92-104.
- Heinrichs,S.C. y Richard,D. (1999). The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. [Review]. *Neuropeptides* 33, 350-359.
- Henriot,S., Dautzenberg,F.M., y Kilpatrick,G.J. (1999). Urocortin: slower dissociation than corticotropin releasing factor from the CRF binding protein. *European Journal of Pharmacology* 376, 321-324.
- Herdegen,T. y Leah,J.D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. [Review]. *Brain Research - Brain Research Reviews* 28, 370-490.
- Herman,J.P., Patel,P.D., Akil,H., y Watson,S.J. (1989). Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Molecular Endocrinology* 3, 1886-1894.
- Herrera,D.G. y Robertson,H.A. (1996). Activation of c-fos in the brain. [Review]. *Progress in Neurobiology* 50, 83-107.

Hery,M., Semont,A., Fache,M.P., Faudon,M., y Hery,F. (2000). The effects of serotonin on glucocorticoid receptor binding in rat raphe nuclei and hippocampal cells in culture. *Journal of Neurochemistry* 74, 406-413.

Hobson,J.A., McCarley,R.W., y Wyzinski,P.W. (1975). Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189, 55-58.

Hobson,J.A. (1992). Sleep and dreaming: induction and mediation of REM sleep by cholinergic mechanisms. [Review]. *Current Opinion in Neurobiology* 2, 759-763.

Hobson,J.A. (1999a). Sleep and Dreaming. In *Fundamental Neuroscience*, M.J.Zigmond, F.E.Bloom, S.C.Landis, J.L.Roberts, and L.R.Squire, editores. (San Diego: Academic Press), pg. 1207-1244.

Hobson,J.A. (1999b). Neural Control of Sleep. In *Regulation of Sleep and Circadian Rhythms*, F.W.Turek and P.C.Zee, editores. (New York: Marcel Dekker,Inc), pg. 81-110.

Holmes,M.C., Yau,J.L., French,K.L., y Seckl,J.R. (1995). The effect of adrenalectomy on 5-hydroxytryptamine and corticosteroid receptor subtype messenger RNA expression in rat hippocampus. *Neuroscience* 64, 327-337.

Holsboer,F. (1988). Implications of altered limbic-hypothalamic-pituitary-adrenocortical (LHPA)-function for neurobiology of depression. [Review]. *Acta Psychiatrica Scandinavica, Supplementum* 341, 72-111.

Holsboer,F. (1989). Psychiatric implications of altered limbic-hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. [Review]. *European Archives of Psychiatry & Neurological Sciences* 238, 302-322.

Holsboer,F. (1999). The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. [Review]. *Journal of Psychiatric Research* 33, 181-214.

Horner,R.L., Sanford,L.D., Annis,D., Pack,A.I., y Morrison,A.R. (1997). Serotonin at the laterodorsal tegmental nucleus suppresses rapid-eye-movement sleep in freely behaving rats. *Journal of Neuroscience* 17, 7541-7552.

Hoyer,D., Clarke,D.E., Fozard,J.R., Hartig,P.R., Martin,G.R., Mylecharane,E.J., Saxena,P.R., y Humphrey,P.P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). [Review]. *Pharmacological Reviews* 46, 157-203.

Hsu,S.M. (1990). Immunohistochemistry. *Methods in Enzymology* 184, 357-363.

Iino,K., Sasano,H., Oki,Y., Andoh,N., Shin,R.W., Kitamoto,T., Totsune,K., Takahashi,K., Suzuki,H., Nagura,H., y Yoshimi,T. (1997). Urocortin expression in human pituitary gland and pituitary adenoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82, 3842-3850.

Imaki,T., Shibasaki,T., Hotta,M., y Demura,H. (1993). Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. *Brain Research* 616, 114-125.

Irwin,M., Vale,W., y Rivier,C. (1990). Central corticotropin-releasing factor mediates the suppressive effect of stress on natural killer cytotoxicity. *Endocrinology* 126, 2837-2844.

Jacobs,B.L. (1991). Serotonin and behavior: emphasis on motor control. [Review]. *Journal of Clinical Psychiatry* 52 Suppl, 17-23.

Jacobs,B.L. y Fornal,C.A. (1991). Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. [Review]. *Pharmacological Reviews* 43, 563-578.

Jacobs,B.L. y Azmitia,E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. [Review]. *Physiological Reviews* 72, 165-229.

Jacobs,B.L. y Fornal,C.A. (1993). 5-HT and motor control: a hypothesis. [Review]. *Trends in Neurosciences* 16, 346-352.

Jacobs,B.L. y Fornal,C.A. (1995). Serotonin and Behavior. A - General Hypothesis. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, F.E.Bloom and D.J.Kupfer, editores. (New York: Raven Press), pg. 461-469.

Jacobson,L. y Sapolsky,R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. [Review]. *Endocrine Reviews* 12, 118-134.

Jolas,T., Haj-Dahmane,S., Kidd,E.J., Langlois,X., Lanfumey,L., Fattaccini,C.M., Vantalon,V., Laporte,A.M., Adrien,J., y Gozlan,H. (1994). Central pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rats treated chronically with a novel antidepressant, cericlamine. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 268, 1432-1443.

Jones,D.N., Kortekaas,R., Slade,P.D., Middlemiss,D.N., y Hagan,J.J. (1998). The behavioural effects of corticotropin-releasing factor-related peptides in rats. *Psychopharmacology* 138, 124-132.

Jouvet,M. (1967). The states of sleep. *Scientific American* 216, 62-68.

Jouvet,M. (1972). The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergebnisse der Physiologie, Biologischen Chemie und Experimentellen Pharmakologie* 64, 166-307.

Jouvet,M. (1999). Sleep and serotonin: an unfinished story. [Review]. *Neuropsychopharmacology* 21, 24S-27S.

Kalen,P., Strecker,R.E., Rosengren,E., y Bjorklund,A. (1988). Endogenous release of neuronal serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in the caudate-putamen of the rat as revealed by intracerebral dialysis coupled to high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Neurochemistry* 51, 1422-1435.

Kaplan,H.I., Sadock,B.J., y Grebb,J.A. (1994). Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry. Behavioral Sciences/Clinical Psychiatry., H.I.Kaplan, B.J.Sadock, and J.A.Grebb, editores. (Baltimore: Williams & Wilkins).

Karalis,K., Sano,H., Redwine,J., Listwak,S., Wilder,R.L., y Chrousos,G.P. (1991). Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 254, 421-423.

Karni,A., Tanne,D., Rubenstein,B.S., Askenasy,J.J., y Sagi,D. (1994). Dependence on REM sleep of overnight improvement of a perceptual skill. *Science* 265, 679-682.

Kirby,L.G., Allen,A.R., y Lucki,I. (1995). Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Research* 682, 189-196.

Kirby,L.G., Chou-Green,J.M., Davis,K., y Lucki,I. (1997). The effects of different stressors on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Research* 760, 218-230.

Kirby,L.G., Rice,K.C., y Valentino,R.J. (2000). Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 22, 148-162.

Kishimoto,T., Radulovic,J., Radulovic,M., Lin,C.R., Schrick, C, Hooshmand,F., Hermanson,O., Rosenfeld,M.G., y Spiess,J. (2000). Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nature Genetics*. 24, 415-419.

Köhler,C. (1982). On the Serotonergic Innervation of the Hippocampal Region: An Analysis Employing Immunohistochemistry and Retrograde Fluorescent Tracing in the Rat Brain. In *Cytochemical Methods in Neuroanatomy*, (New York), pg. 387-405.

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

Koob,G.F. y Heinrichs,S.C. (1999). A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. [Review]. *Brain Research* 848, 141-152.

Kozicz,T., Yanaihara,H., y Arimura,A. (1998). Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 391, 1-10.

Kreiss,D.S. y Lucki,I. (1994). Differential regulation of serotonin (5-HT) release in the striatum and hippocampus by 5-HT_{1A} autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 269, 1268-1279.

Kreiss,D.S. y Lucki,I. (1995). Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 274, 866-876.

Krueger,J.M., Fang,J., y Floyd,R.A. (1999). Relationships Between Sleep and Immune Function. In *Regulation of Sleep and Circadian Rhythms*, F.W.Turek and P.C.Zee, editores. (New York: Marcel Dekker,Inc.), pg. 427-464.

Kuhn,D.M., Wolf,W.A., y Youdim,M.B. (1985). 5-Hydroxytryptamine release in vivo from a cytoplasmic pool: studies on the 5-HT behavioural syndrome in reserpinized rats. *British Journal of Pharmacology*. 84, 121-129.

Kuhn,D.M., Wolf,W.A., y Youdim,M.B. (1986). Serotonin neurochemistry revisited: a new look at some old axioms. *Neurochemistry International* 8, 141-154.

Kuhs,H. y Tolle,R. (1991). Sleep deprivation therapy. [Review]. *Biological Psychiatry* 29, 1129-1148.

Laaris,N., Haj-Dahmane,S., Hamon,M., y Lanfumey,L. (1995). Glucocorticoid receptor-mediated inhibition by corticosterone of 5-HT_{1A} autoreceptor functioning in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* 34, 1201-1210.

Laaris,N., Le Poul,E., Hamon,M., y Lanfumey,L. (1997). Stress-induced alterations of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptor sensitivity in the rat dorsal raphe nucleus--in vitro electrophysiological evidence. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 11, 206-214.

Laaris,N., Le Poul,E., Laporte,A.M., Hamon,M., y Lanfumey,L. (1999). Differential effects of stress on presynaptic and postsynaptic 5-hydroxytryptamine-1A receptors in the rat brain: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* 91, 947-958.

Lancel,M., van Riezen,H., y Glatt,A. (1991). Effects of circadian phase and duration of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the cat. *Brain Research* 548, 206-214.

Lancel,M. (1993). Cortical and subcortical EEG in relation to sleep-wake behavior in mammalian species. [Review]. *Neuropsychobiology* 28, 154-159.

Lancel,M., Cronlein,J., Muller-Preuss,P., y Holsboer,F. (1995). Lipopolysaccharide increases EEG delta activity within non-REM sleep and disrupts sleep continuity in rats. *American Journal of Physiology* 268, R1310-R1318.

Lavicky,J. y Dunn,A.J. (1993). Corticotropin-releasing factor stimulates catecholamine release in hypothalamus and prefrontal cortex in freely moving rats as assessed by microdialysis. *Journal of Neurochemistry* 60, 602-612.

Leung,L.S. (1998). Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. [Review]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 22, 275-290.

Linthorst,A.C.E., Flachskamm,C., Holsboer,F., y Reul,J.M.H.M. (1994). Local administration of recombinant human interleukin-1 beta in the rat hippocampus increases serotonergic neurotransmission, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity, and body temperature. *Endocrinology* 135, 520-532.

Linthorst,A.C.E., Flachskamm,C., Muller-Preuss,P., Holsboer,F., y Reul,J.M.H.M. (1995). Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 beta on hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, and free corticosterone levels: an in vivo microdialysis study. *Journal of Neuroscience* 15, 2920-2934.

Linthorst,A.C.E., Flachskamm,C., Holsboer,F., y Reul,J.M.H.M. (1996). Activation of serotonergic and noradrenergic neurotransmission in the rat hippocampus after peripheral administration of bacterial endotoxin: involvement of the cyclo-oxygenase pathway. *Neuroscience* 72, 989-997.

Linthorst,A.C.E., Flachskamm,C., Hopkins,S.J., Hoadley,M.E., Labeur,M.S., Holsboer,F., y Reul,J.M.H.M. (1997). Long-term intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing hormone alters neuroendocrine, neurochemical, autonomic, behavioral, and cytokine responses to a systemic inflammatory challenge. *Journal of Neuroscience* 17, 4448-4460.

Linthorst, A. C. E., Penalva, R. G., Flachskamm, C., y Reul, J. M. H. M.(1999). Effect of forced swimming on hippocampal serotonergic neurotransmission in the rat: role of corticotropin-releasing hormone. *Society for Neuroscience Abstracts* 25[173].

Linthorst,A.C.E., Flachskamm,C., Barden,N., Holsboer,F., y Reul,J.M.H.M. (2000). Glucocorticoid receptor impairment alters CNS responses to a psychological stressor: an in vivo microdialysis study in transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*. 12, 283-291.

Liu,R., Jolas,T., y Aghajanian,G. (2000). Serotonin 5-HT(2) receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Research* 873, 34-45.

- Lovejoy,D.A. y Balment,R.J. (1999). Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates. [Review]. *Gen.* 115, 1-22.
- Lovenberg,T.W., Liaw,C.W., Grigoriadis,D.E., Clevenger,W., Chalmers,D.T., De Souza,E.B., y Oltersdorf,T. (1995). Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 92, 836-840.
- Lowry,C.A., Rodda,J.E., Lightman,S.L., e Ingram,C.D. (2000). Corticotropin-releasing factor increases in vitro firing rates of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus: Evidence for activation of a topographically organized mesolimbocortical serotonergic system [Review]. *Journal of Neuroscience* 20, 7728-7736.
- Maes,M. y Meltzer,H.Y. (1995). The serotonin hypothesis of major depression. In *Psychopharmacology, the Fourth Generation of Progress*, F.E.Bloom and D.J.Kupfer, editores. (New York: Raven Prress), pg. 933-944.
- Mann,J.J. (1999). Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* 21, S99-S105.
- Marinesco,S., Poncet,L., Debilly,G., Jouvett,M., y Cespuglio,R. (1996). Effects of tianeptine, sertraline and clomipramine on brain serotonin metabolism: a voltammetric approach in the rat. *Brain Research* 736, 82-90.
- Marrosu,F., Fornal,C.A., Metzler,C.W., y Jacobs,B.L. (1996). 5-HT_{1A} agonists induce hippocampal theta activity in freely moving cats: role of presynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Brain Research* 739, 192-200.
- Marrosu,F., Pinna,A., Fadda,P., Fratta,W., y Morelli,M. (1996). C-Fos expression as a molecular marker in corticotropin-releasing factor-induced seizures. *Synapse* 24, 297-304.
- Marsden,C.A. (1991). The neuropharmacology of serotonin in the central nervous system. In *Selective Serotonin Re-uptake Inhibitors*, J.P.Feighner and W.F.Boyer, editores. (Chichester: John Wiley & Sons), pg. 11-35.
- Maswood,S., Barter,J.E., Watkins,L.R., y Maier,S.F. (1998). Exposure to inescapable but not escapable shock increases extracellular levels of 5-HT in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Research* 783 , 115-120.
- Maudhuit,C., Jolas,T., Chastanet,M., Hamon,M., y Adrien,J. (1996). Reduced inhibitory potency of serotonin reuptake blockers on central serotonergic neurons in rats selectively deprived of rapid eye movement sleep. *Biological Psychiatry* 40, 1000-1007.
- McCarley,R.W. y Hobson,J.A. (1975). Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science* 189, 58-60.

- McCarley,R.W., Greene,R.W., Rainnie,D., y Portas,C.M. (1995). Brainstem neuromodulation and REM sleep. *Seminars in the Neurosciences* 7, 341-354.
- McGinty,D.J. y Harper,R.M. (1976). Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Research* 101, 569-575.
- McQuade,R. y Sharp,T. (1995). Release of cerebral 5-hydroxytryptamine evoked by electrical stimulation of the dorsal and median raphe nuclei: effect of a neurotoxic amphetamine. *Neuroscience* 68, 1079-1088.
- McQuade,R. y Sharp,T. (1997). Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *Journal of Neurochemistry* 69, 791-796.
- Meijer,O.C. y de Kloet,E.R. (1998). Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity. [Review]. *Critical Reviews in Neurobiology* 12, 1-20.
- Mendlin,A., Martin,F.J., Rueter,L.E., y Jacobs,B.L. (1996). Neuronal release of serotonin in the cerebellum of behaving rats: an in vivo microdialysis study. *Journal of Neurochemistry* 67, 617-622.
- Merchenthaler,I. (1984). Corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. *Peptides* 5 *Suppl* 1, 53-69.
- Mokler,D.J., Lariviere,D., Johnson,D.W., Theriault,N.L., Bronzino,J.D., Dixon,M., y Morgane,P.J. (1998). Serotonin neuronal release from dorsal hippocampus following electrical stimulation of the dorsal and median raphe nuclei in conscious rats. *Hippocampus* 8, 262-273.
- Mongeau,R., Blier,P., y de Montigny,C. (1997). The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. [Review]. *Brain Research - Brain Research Reviews* 23, 145-195.
- Moreau,J.L., Kilpatrick,G., y Jenck,F. (1997). Urocortin, a novel neuropeptide with anxiogenic-like properties. *Neuroreport* 8, 1697-1701.
- Morin,S.M., Ling,N., Liu,X.J., Kahl,S.D., y Gehlert,D.R. (1999). Differential distribution of urocortin- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivities in the rat brain. *Neuroscience* 92, 281-291.
- Munck,A., Guyre,P.M., y Holbrook,N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. [Review]. *Endocrine Reviews* 5, 25-44.

Neckelmann,D. y Ursin,R. (1993). Sleep stages and EEG power spectrum in relation to acoustical stimulus arousal threshold in the rat. *Sleep* 16, 467-477.

Nemeroff,C.B., Widerlov,E., Bissette,G., Walleus,H., Karlsson,I., Eklund,K., Kilts,C.D., Loosen,P.T., y Vale,W. (1984). Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226, 1342-1344.

Nemeroff,C.B., Owens,M.J., Bissette,G., Andorn,A.C., y Stanley,M. (1988). Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Archives of General Psychiatry* 45, 577-579.

Nemeroff,C.B. (1996). The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. [Review]. *Molecular Psychiatry* 1, 336-342.

Nemeroff,C.B. (1998). Psychopharmacology of affective disorders in the 21st century. [Review]. *Biological Psychiatry* 44, 517-525.

Nicoll,R.A., Malenka,R.C., y Kauer,J.A. (1990). Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. [Review]. *Physiological Reviews* 70, 513-565.

Nitz,D.A. y Siegel,J. (1997). GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *American Journal of Physiology* 273, R451-R455.

Owens,M.J. y Nemeroff,C.B. (1991). Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. [Review]. *Pharmacological Reviews*. 43, 425-473.

Owens,M.J. y Nemeroff,C.B. (1993). The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. [Review]. *Ciba Foundation Symposium* 172, 296-308.

Ozawa,M., Oki,Y., Watanabe,F., Iino,K., Masuzawa,M., Iwabuchi,M., y Yoshimi,T. (1998). Effect of urocortin and its interaction with adrenocorticotropin (ACTH) secretagogues on ACTH release. *Peptides* 19, 513-518.

Park,S.P., Lopez-Rodriguez,F., Wilson,C.L., Maidment,N., Matsumoto,Y., y Engel,J., Jr. (1999). In vivo microdialysis measures of extracellular serotonin in the rat hippocampus during sleep-wakefulness. *Brain Research* 833, 291-296.

Parkes,D., Rivest,S., Lee,S., Rivier,C., y Vale,W. (1993). Corticotropin-releasing factor activates c-fos, NGFI-B, and corticotropin-releasing factor gene expression within the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Molecular Endocrinology* 7, 1357-1367.

Pauli, S. (1997) Untersuchungen zum hippocampalen serotonergen System nach Applikation exogener Immunstimulantien und endogener Immunmodulatoren, sowie in Abhängigkeit des Schlaf-Wach-Rhythmus der Ratte. Ludwig-Maximilians-Universität München, pg.,1-93

Paxinos,G. y Watson,C. (1982). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. (Sydney, Academic Press).

Pineyro,G., Demontigny,C., y Blier,P. (1995). 5-HT_{1D} receptors regulate 5-HT release in the rat raphe nuclei - in vivo voltammetry and in vitro superfusion studies. *Neuropsychopharmacology* 13, 249-260.

Portas,C.M. y McCarley,R.W. (1994). Behavioral state-related changes of extracellular serotonin concentration in the dorsal raphe nucleus: a microdialysis study in the freely moving cat. *Brain Research* 648 , 306-312.

Portas,C.M., Thakkar,M., Rainnie,D., y McCarley,R.W. (1996). Microdialysis perfusion of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) in the dorsal raphe nucleus decreases serotonin release and increases rapid eye movement sleep in the freely moving cat. *Journal of Neuroscience* 16, 2820-2828.

Portas,C.M., Bjorvatn,B., Fagerland,S., Gronli,J., Mundal,V., Sorensen,E., y Ursin,R. (1998). On-line detection of extracellular levels of serotonin in dorsal raphe nucleus and frontal cortex over the sleep/wake cycle in the freely moving rat. *Neuroscience* 83, 807-814.

Portas,C.M., Bjorvatn,B., y Ursin,R. (2000). Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. [Review]. *Progress in Neurobiology*. 60, 13-35.

Potter,E., Behan,D.P., Fischer,W.H., Linton,E.A., Lowry,P.J., y Vale,W.W. (1991). Cloning and characterization of the cDNAs for human and rat corticotropin releasing factor-binding proteins. *Nature* 349, 423-426.

Prevot,E., Maudhuit,C., Le Poul,E., Hamon,M., y Adrien,J. (1996). Sleep deprivation reduces the citalopram-induced inhibition of serotonergic neuronal firing in the nucleus raphe dorsalis of the rat. *Journal of Sleep Research* 5, 238-245.

Price,M.L., Curtis,A.L., Kirby,L.G., Valentino,R.J., y Lucki,I. (1998). Effects of corticotropin-releasing factor on brain serotonergic activity. *Neuropsychopharmacology* 18, 492-502.

Puizillout,J.J., Gaudin-Chazal,G., Daszuta,A., Seyfritz,N., y Ternaux,J.P. (1979). Release of endogenous serotonin from "encephale isole" cats. II - Correlations with raphe neuronal activity and sleep and wakefulness. *Journal de Physiologie* 75, 531-537.

Raadsheer,F.C., Hoogendijk,W.J., Stam,F.C., Tilders,F.J., Swaab, y DF. (1994). Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60, 436-444.

Raadsheer,F.C., van Heerikhuize,J.J., Lucassen,P.J., Hoogendijk, WJ, Tilders,F.J., y Swaab,D.F. (1995). Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression. *American Journal of Psychiatry* 152, 1372-1376.

Radulovic,J., Ruhmann,A., Liepold,T., y Spiess,J. (1999). Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: Differential roles of CRF receptors 1 and 2. *Journal of Neuroscience* 19, 5016-5025.

Rapport,M.M., Green,A.A., y Page,I.H. (1948). Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and characterization. *Journal of Biological Chemistry* 176, 1243-1251.

Rechtschaffen,A., Bergman,B.M., Gilliland,M.A., y Bauer,K. (1999). Effects of method, duration, and sleep stage on rebounds from sleep deprivation in the rat [Review]. *Sleep* 22 , 11-31.

Reul,J.M. y de Kloet,E.R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117, 2505-2511.

Reul,J.M.H.M., Stec,I., Soder,M., y Holsboer,F. (1993). Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology* 133, 312-320.

Reul,J.M.H.M. y Linthorst,A.C.E. (2000). Responses in the Raphe-Hippocampal Serotonergic System During Peripheral Inflammation: Putative Role in Sickness Behaviour. In *Research and perspectives in neurosciences. Neuro-immune interactions in neurologic and psychiatric disorders*, P.Patterson, C.Kordon, and Y.Christen, editores. (Berlin: Springer-Verlag), pg. 89-109.

Reul,J.M.H.M., Gesing,A., Droste,S., Stec,I.S.M., Weber,A., Bachmann,C., Bilang-Bleuel,A., Holsboer,F., y Linthorst,A.C.E. (2000). The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function [Review]. *European Journal of Pharmacology* 405, 235-249.

Risold,P.Y. y Swanson,L.W. (1996). Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science* 272, 1484-1486.

Romero,L., Bel,N., Artigas,F., Demontigny,C., y Blier,P. (1996). Effect of pindolol on the function of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors - in vivo microdialysis and electrophysiological studies in the rat brain. *Neuropsychopharmacology* 15, 349-360.

Rosner,W. (1990). The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. [Review]. *Endocrine Reviews* 11, 80-91.

Rosner,W. (1991). Plasma steroid-binding proteins. [Review]. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America* 20, 697-720.

Rueter,L.E. y Jacobs,B.L. (1996a). A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. *Brain Research* 739, 57-69.

Rueter,L.E. y Jacobs,B.L. (1996b). Changes in forebrain serotonin at the light-dark transition: correlation with behaviour. *Neuroreport* 7, 1107-1111.

Rueter,L.E., Fornal,C.A., y Jacobs,B.L. (1997). A critical review of 5-HT brain microdialysis and behavior. [Review]. *Reviews in the Neurosciences* 8, 117-137.

Ruggiero,D.A., Underwood,M.D., Rice,P.M., Mann,J.J., y Arango,V. (1999). Corticotropin-releasing hormone and serotonin interact in the human brainstem: behavioral implications. *Neuroscience* 91, 1343-1354.

Sajdyk,T.J., Schober,D.A., Gehlert,D.R., y Shekhar,A. (1999). Role of corticotropin-releasing factor and urocortin within the basolateral amygdala of rats in anxiety and panic responses. *Behavioural Brain Research* 100, 207-215.

Sanford,L.D., Ross,R.J., Seggos,A.E., Morrison, AR, Ball,W.A., y Mann,G.L. (1994). Central administration of two 5-HT receptor agonists: effect on REM sleep initiation and PGO waves. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 49, 93-100.

Saper,C.B. (1995) Central autonomic system. In: *The rat nervous system*, Ed 2, (Paxinos G, editor), San Diego: Academic. Pg 107 –128.

Sawchenko,P.E. y Swanson,L.W. (1985). Localization, colocalization, and plasticity of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat brain. *Federation Proceedings* 44, 221-227.

Sherin,J.E., Shiromani,P.J., McCarley,R.W., y Saper,C.B. (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271, 216-219.

Shouse,M.N., Staba,R.J., Saquib,S.F., y Farber,P.R. (2000). Monoamines and sleep: microdialysis findings in pons and amygdala. *Brain Research* 860, 181-189.

Singh,A. y Lucki,I. (1993). Antidepressant-like activity of compounds with varying efficacy at 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology* 32, 331-340.

Singh, V.B., Corley, K.C., Phan, T.H., y Boadle-Biber, M.C. (1990). Increases in the activity of tryptophan hydroxylase from rat cortex and midbrain in response to acute or repeated sound stress are blocked by adrenalectomy and restored by dexamethasone treatment. *Brain Research* 516, 66-76.

Singh, V.B., Hao-Phan, T., Corley, K.C., y Boadle-Biber, M.C. (1992). Increase in cortical and midbrain tryptophan hydroxylase activity by intracerebroventricular administration of corticotropin releasing factor: block by adrenalectomy, by RU 38486 and by bilateral lesions to the central nucleus of the amygdala. *Neurochemistry International* 20, 81-92.

Singh, V.B., Corley, K.C., Krieg, R.J., Phan, T.H., y Boadle-Biber, M.C. (1994). Sound stress activation of tryptophan hydroxylase blocked by hypophysectomy and intracranial RU 38486. *European Journal of Pharmacology* 256, 177-184.

Smagin, G.N., Howell, L.A., Ryan, D.H., De Souza, E.B., y Harris, R.B. (1998). The role of CRF2 receptors in corticotropin-releasing factor- and urocortin-induced anorexia. *Neuroreport* 9, 1601-1606.

Smagin, G.N. y Dunn, A.J. (2000). The role of CRF receptor subtypes in stress-induced behavioural responses. *European Journal of Pharmacology* 405, 199-206.

Smith, C. (1985). Sleep states and learning: a review of the animal literature. [Review]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 9, 157-168.

Smith, C.L. y Hammond, G.L. (1992). Hormonal regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the male rat. *Endocrinology* 130, 2245-2251.

Smith, G.W., Aubry, J.M., Dellu, F., Contarino, A., Bilezikjian, LM, Gold, L.H., Chen, R., Marchuk, Y., Hauser, C., Bentley, C.A., Sawchenko, P.E., Koob, G.F., Vale, W., y Lee, K.F. (1998). Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 20, 1093-1102.

Song, C., Earley, B., y Leonard, B.E. (1995). Behavioral, neurochemical, and immunological responses to CRF administration. Is CRF a mediator of stress? *Annals of the New York Academy of Sciences* 771, 55-72.

Spina, M., Merlo-Pich, E., Chan, R.K., Basso, A.M., Rivier, J., Vale, W., y Koob, G.F. (1996). Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science* 273, 1561-1564.

Spruijt, B.M., van Hooff, J.A., y Gispen, W.H. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. [Review]. *Physiological Reviews* 72, 825-852.

- Staley, J.K. y Malison, R.T. (1998). Imaging of the serotonergic system - interactions of neuroanatomical and functional abnormalities of depression [Review]. *Biological Psychiatry* 44, 534-549.
- Steckler, T. y Holsboer, M. (1999). Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biological Psychiatry* 46, 1480-1508.
- Steinbusch, H.W.M. (1984). Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol 3: Classical Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS. Part II*, A. Björklund, T. Hökfelt, and M.J. Kuhar, editores. (Elsevier Science Publishers), pg. 68-118.
- Steriade, M., McCormick, D.A., y Sejnowski, T.J. (1993). Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. [Review]. *Science* 262, 679-685.
- Stockmeier, C.A., Shapiro, L.A., Dilley, G.E., Kolli, T.N., Friedman, L, y Rajkowska, G. (1998). Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *Journal of Neuroscience* 18, 7394-7401.
- Sutton, R.E., Koob, G.F., Le Moal, M., Rivier, J., y Vale, W. (1982). Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. *Nature* 297, 331-333.
- Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., y Vale, W.W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36, 165-186.
- Swanson, P.E. (1988). Foundations of immunohistochemistry. A practical review. [Review]. *American Journal of Clinical Pathology* 90, 333-339.
- Sze, P.Y. (1976). Glucocorticoid regulation of the serotonergic system of the brain. [Review]. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 15, 251-265.
- Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T.L., y McGinty, D. (1998). Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Research* 803, 178-188.
- Thakkar, M.M., Strecker, R.E., y McCarley, R.W. (1998). Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the mesopontine cholinergic nuclei: a simultaneous unit recording and microdialysis study. *Journal of Neuroscience* 18, 5490-5497.
- Timo-laria, C., Negro, N., Schmidek, W.R., Katsumasa, H., Lobato de Menezes, C.E., y Leme da Rocha, T. (1970). Phases and States of Sleep in the rat. *Physiology & Behavior* 5, 1057-1062.

- Timpl,P., Spanagel,R., Sillaber,I., Kresse,A., Reul,J.M.H.M., Stalla,G.K., Blanquet,V., Steckler,T., Holsboer,F., y Wurst,W. (1998). Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1 [110 comments]. *Nature Genetics* 19, 162-166.
- Tobler,I. y Borbely,A.A. (1986). Sleep EEG in the rat as a function of prior waking. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology* 64, 74-76.
- Tobler,I. y Borbely,A.A. (1990). The effect of 3-h and 6-h sleep deprivation on sleep and EEG spectra of the rat. *Behavioural Brain Research* 36, 73-78.
- Toru,M., Mitsushio,H., Mataga,N., Takashima,M., y Arito,H. (1984). Increased brain serotonin metabolism during rebound sleep in sleep-deprived rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 20, 757-761.
- Traskman-Bendz,L., Asberg,M., Bertilsson,L., y Thoren,P. (1984). CSF monoamine metabolites of depressed patients during illness and after recovery. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 69, 333-342.
- Trulson,M.E. y Jacobs,B.L. (1979). Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Research* 163, 135-150.
- Trulson,M.E., Crisp,T., y Trulson,V.M. (1984). Activity of serotonin-containing nucleus centralis superior (Raphe medianus) neurons in freely moving cats. *Experimental Brain Research* 54, 33-44.
- Turnbull,A.V., Smith,G.W., Lee,S., Vale,W.W., Lee,K.F., y Rivier,C. (1999a). CRF type I receptor-deficient mice exhibit a pronounced pituitary-adrenal response to local inflammation. *Endocrinology* 140, 1013-1017.
- Turnbull,A.V., Vaughan,J., Rivier,J.E., Vale,W.W., y Rivier,C. (1999b). Urocortin is not a significant regulator of intermittent electrofootshock-induced adrenocorticotropin secretion in the intact male rat. *Endocrinology* 140, 71-78.
- Ueda,K., Okamura,N., Hirai,M., Tanigawara,Y., Saeki,T., Kioka,N., Komano,T., y Hori,R. (1992). Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *Journal of Biological Chemistry* 267, 24248-24252.
- Ungerstedt,U. (1991). Microdialysis--principles and applications for studies in animals and man. [Review]. *Journal of Internal Medicine* 230, 365-373.
- Vahabzadeh,A. y Fillenz,M. (1994). Comparison of stress-induced changes in noradrenergic and serotonergic neurons in the rat hippocampus using microdialysis. *European Journal of Neuroscience*, 6, 1205-1212.

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

van Asperen, J., Mayer, U., van Tellingen, O., y Beijnen, J.H. (1997). The functional role of P-glycoprotein in the blood-brain barrier. [Review]. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86, 881-884.

van Cauter, E. y Spiegel, K. (1999). Circadian and Sleep Control of Hormonal Secretions. In *Regulation of Sleep and Circadian Rhythms*, F.W. Turek and P.C. Zee, editores. (New York: Marcel Dekker, Inc.), pg. 397-425.

Vaughan, J., Donaldson, C., Bittencourt, J., Perrin, M.H., Lewis, K., Sutton, S., Chan, R., Turnbull, A.V., Lovejoy, D., y Rivier, C. (1995). Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378, 287-292.

Veasey, S.C., Fornal, C.A., Metzler, C.W., y Jacobs, B.L. (1997). Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to specific motor challenges in freely moving cats. *Neuroscience* 79, 161-169.

Vertes, R.P. y Kocsis, B. (1994). Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 340, 11-26.

Vertes, R.P., Fortin, W.J., y Crane, A.M. (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 407, 555-582.

Watanabe, Y., Sakai, R.R., McEwen, B.S., y Mendelson, S. (1993). Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors and transport sites for serotonin. *Brain Research* 615, 87-94.

Wesemann, W. y Weiner, N. (1990). Circadian rhythm of serotonin binding in rat brain. [Review]. *Progress in Neurobiology* 35, 405-428.

Whitaker-Azmitia, P.M. (1999). The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 21, 2S-8S.

Wiersma, A., Baauw, A.D., Bohus, B., y Koolhaas, J.M. (1995). Behavioural activation produced by CRH but not alpha-helical CRH (CRH-receptor antagonist) when microinfused into the central nucleus of the amygdala under stress-free conditions. *Psychoneuroendocrinology* 20, 423-432.

Wirz-Justice, A. y Van den Hoofdakker, R.H. (1999). Sleep deprivation in depression: what do we know, where do we go?. [Review]. *Biological Psychiatry* 46, 445-453.

Wolf,W.A., Youdim,M.B., y Kuhn,D.M. (1985). Does brain 5-HIAA indicate serotonin release or monoamine oxidase activity? *European Journal of Pharmacology* 109, 381-387.

Wong,M.L., al Shekhlee,A., Bongiorno,P.B., Esposito,A., Khatri,P., Sternberg, EM, Gold,P.W., y Licinio,J. (1996). Localization of urocortin messenger RNA in rat brain and pituitary. *Molecular Psychiatry* 1, 307-312.

Wu,J.C. y Bunney,W.E. (1990). The biological basis of an antidepressant response to sleep deprivation and relapse: review and hypothesis. [Review]. *American Journal of Psychiatry* 147, 14-21.

Zee,P.C. y Turek,F.W. (1999). Introduction to Sleep and Circadian Rhythms. In *Regulation of Sleep and Circadian Rhythms*, F.W.Turek and P.C.Zee, editores. (New York: Marcel Dekker,Inc.), pg. 1-18.

Zobel,A.W., Nickel,T., Kunzel,H.E., Ackl,N., Sonntag,A., Ising, M, y Holsboer,F. (2000). Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *Journal of Psychiatric Research* 34, 171-181.