

IMPACTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE EL NPY ADRENAL EN RATAS GESTANTES

Magdalena Bertorello Cuenca¹, Alicia Rolando Giordano¹, Débora Cots Negri¹, Tomás Díaz Torres¹, Fabrisio Alustiza Fedorak¹, Andrea Bozzo Chiavassa¹.

¹ Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

mbertorellocuenca@gmail.com

RESUMEN

El estrés crónico durante la gestación, puede alterar diversos factores y mecanismos que mantienen la homeostasis del organismo. El NPY tiene una función ansiolítica y está involucrado en la modulación de la respuesta al estrés. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del estrés crónico sobre los niveles plasmáticos de corticosterona y estrógenos, y sobre la inmunomarcación del NPY en la corteza adrenal de ratas gestantes. El estrés por inmovilización intermitente fue aplicado desde el cuarto día de la gestación hasta el sacrificio a los 12, 17 y 21 días de la gestación. Se combinaron técnicas de inmunomarcación, radioinmunoanálisis, análisis estereológico y cuantificación de imágenes en diferentes poblaciones de la corteza adrenal. En las ratas estresadas se presentó un incremento significativo en los niveles plasmáticos de corticosterona a los 12, 17 y 21 días de la gestación, de estrógenos a los 12 y 17 días de la gestación y una disminución del I_{NPY} en los días 12 y 17 de la gestación, mientras que en el día 21 no se presentaron diferencias significativas. Se puede concluir que el incremento de los niveles plasmáticos de corticosterona y estrógenos ejerce un efecto inhibitorio sobre la inmunomarcación del NPY adrenal a los 12 y 17 días de la gestación.

INTRODUCCIÓN

La exposición a eventos de estrés durante períodos como la gestación, puede desencadenar trastornos de ansiedad, depresión, y desbalances hormonales (Murray, 2004). El estrés agudo es necesario para que el organismo sea capaz de afrontar amenazas reales o imaginarias a corto plazo. Sin embargo, el estrés crónico puede alterar la respuesta inmune, la remodelación neuronal y ocasionar déficit de la memoria, que son algunas de las características que presentan los individuos depresivos (Sapolsky, 2000; Erickson et al., 2003; Morales-Medina et al., 2009). La mayoría de estos procesos, se asocian con alteraciones del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (HHA). La respuesta de este

eje frente a determinados estresores decrece progresivamente a medida que avanza la gestación. Sin embargo se comprobó que frente al estrés crónico las ratas gestantes no son capaces de adaptarse y en consecuencia los niveles plasmáticos de corticosterona (CORT) se mantienen elevados (Moozavi et al., 2011).

Otras hormonas afectadas por el estrés son la prolactina (PRL) y los estrógenos (Angoa y Rivas 2006) que se incrementan proporcionalmente con la intensidad de los estímulos estresantes (Armario et al., 2012) y se ha descrito que la corteza adrenal presenta receptores específicos para estas hormonas (Glasow et al., 1996; Kuiper et al., 1997). El neuropéptido Y (NPY) es un péptido ansiolítico que está involucrado en la modulación de la respuesta al estrés y en desórdenes psiquiátricos (Adam y Epel, 2007). De acuerdo a los diferentes estímulos que recibe, la adrenal es capaz de actuar como un potente efector de respuestas celulares (Hoeflich y Bielohuby, 2009). Los circuitos neurológicos que utilizan como señal al NPY, se activan cuando el organismo atraviesa situaciones estresantes para regular su homeostasis (Thiele y Heilig, 2004).

En ratas sometidas a estrés crónico se determinaron incrementos del NPY plasmático acompañados de la síntesis y secreción del NPY adrenal (Bernet et al., 1998). Tanto el NPY central como el adrenal interactúan con el eje HHA; a nivel central la expresión y la liberación del NPY aumentan la vulnerabilidad frente a un agente estresor (Hirsch y Zukowska, 2012).

Actualmente existen escasos trabajos de modelos "in vivo" bajo condiciones de estrés crónico por inmovilización (IMO) durante la gestación (Mugnaini et al., 2006; Buljubacich et al., 2009; Bozzo et al., 2011; Bozzo et al., 2013). En trabajos previos, comprobamos que el estrés crónico por IMO aplicado durante la segunda mitad de la gestación incrementó el número de neuronas NPY inmunomarcadas en los encéfalos fetales, actuando como un sistema de alarma endógeno en condiciones de estrés prenatal (Buljubacich et al., 2009), pero no se demostró aún el efecto que tiene éste sobre el NPY adrenal en ratas gestantes.

El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del estrés crónico sobre los niveles plasmáticos de corticosterona y de estrógenos y sobre la inmunomarcación del NPY en la corteza adrenal de ratas a los 12, 17 y 21 días de la gestación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y condiciones de laboratorio

Se utilizaron 30 ratas hembras albinas de la cepa Wistar, de 90 a 120 días de edad, de 200 a 300 gramos de peso corporal al comienzo del experimento, mantenidas en condiciones estándar de bioterio, con fotoperíodo controlado (12 horas de luz) y administración de alimento y agua *ad-libitum*. Las instalaciones cumplieron con los requisitos de la disposición 6344/96 de la Administración Nacional de Medicamentos,

Alimentos y Tecnología Médica, Argentina. Para el experimento se siguieron las recomendaciones sobre la reducción, el refinamiento y el reemplazo de animales de laboratorio (Russell y Burch, 1959). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los principios y procedimientos de la Guía del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH publicación N° 85-23, revisado 1985, <http://www.nih.gov/sigs/bioética>).

Las ratas se ciclaron por medio de colpocitogramas en fresco y fueron apareadas durante el proestro con un macho de la misma cepa durante 18 horas. El día cero de la preñez fue establecido al visualizar espermatozoides en el fluido vaginal, a los fines del sacrificio programado. Las ratas preñadas se separaron en dos grupos: controles (RC) y experimentales (RE) que permanecieron aislados físicamente entre sí.

Tratamiento experimental

Al grupo RE se le aplicó sesiones de estrés por IMO en tubo, con el objetivo de restringir los movimientos del animal. Se utilizó un tubo de plástico perforado sujeto a una base de madera acolchada para el confort del animal. Las sesiones se realizaron a partir del 4^{to} día de la gestación para evitar muertes embrionarias, con una duración de 45 minutos cada una, en días alternados y hasta el día previo del sacrificio. Este método fue adaptado en el bioterio de la Universidad Nacional de Río Cuarto, bajo las normas éticas para el manejo de animales de experimentación.

El sacrificio de los animales se realizó por decapitación a los 12, 17 y 21 días de gestación. Se utilizaron 5 ratas por edad gestacional para cada grupo (RC y RE). Posteriormente a la decapitación, se extrajeron las adrenales, se fijaron en formol tamponado al 10% durante 12 horas y se procesaron de acuerdo a la técnica histológica convencional. Se obtuvieron cortes alternados de la corteza adrenal de 5 μm cada uno usando un micrótopo Reichert-Young 2065 y fueron montados en portaobjetos tratados con adhesivo Vectabond (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA). Se procesaron tres portaobjetos por animal, montados cada uno con tres cortes de la misma glándula pero a distinto nivel de la corteza. La identificación de las diferentes zonas de la corteza adrenal fue realizada de acuerdo a sus características histológicas.

Detección de Corticosterona por Radioinmunoensayo

Posteriormente al sacrificio de los animales de ambos grupos en los días de la gestación estudiados, se recolectó la sangre en tubos con heparina sódica. Se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15 minutos a 4° C. Posteriormente, se separó la fracción plasmática y se conservó a -20° C hasta el momento del análisis. Se utilizó un antisuero de conejo anti-

corticosterona de Bioclin (Cardiff, UK) y el patrón de COR (4-pregnene-11, 21 diol-3, 20 dione; Sigma, Boston, MA, USA). Las RE fueron sometidas a la última sesión de estrés 24 horas previas al día de sacrificio establecido. Los niveles plasmáticos de CORT fueron medidos por radioinmunoensayo (Kreyet al., 1975) con un anticuerpo de oveja de alta especificidad (TECNOLAB). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 8,8%.

Determinación del NPY adrenal

Se utilizó un método inmunocitoquímico indirecto (Vectastain ABC elite kit 6200, Vector). Los cortes se desparafinaron e hidrataron, posteriormente se realizó el bloqueo de peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno al 30% y el bloqueo de anticuerpos inespecíficos con suero de caballo (Vector) durante 30 minutos. Se utilizó un anticuerpo primario policlonal anti-NPY 1:500 (RXB, Merck Milipore, Billerica, USA) en cámara húmeda, durante 20 horas a 4° C, como segundo anticuerpo una anti-inmunoglobulina biotinilada y el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC elite kit 6200, Vector). Se reveló con diaminobencidina (DAB-Vector).

Análisis estereológico de imágenes

De cada corte histológico de la corteza adrenal se digitalizaron de 10 a 12 imágenes de las zonas glomerular, fascicular y reticular de RC y RE. Se utilizó un microscopio Zeiss Axiophot con cámara digital Axio Vision Zeiss y software asociados (video Printer Sony 3000 y análisis de imágenes estereológicas Scion Corp). Se procesó cada una de las imágenes, cuantificando las células positivas y negativas para NPY y se obtuvo el índice de NPY (I_{NPY}) como el cociente entre las células positivas y negativas y se multiplicó por 100. Se utilizó para el conteo celular el programa Image J 1.46, con la aplicación cell counter.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software Infostat 2010. Se realizó ANOVA de una vía para la comparación de las medias obtenidas de las determinaciones de los niveles plasmáticos de CORT y estrógenos entre los grupos y ANOVA de tres vías para evaluar el efecto del tratamiento, día de la gestación y zona de la corteza adrenal y sus interacciones. En los casos en que se observaron diferencias significativas, se realizó un test a posteriori (DGC). Las diferencias fueron consideradas significativas si $p < 0.05$ (Pagano y Gauvreau, 2000).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la determinación de los niveles plasmáticos de CORT demostraron que las RE tuvieron un incremento estadísticamente significativo en relación a sus controles del mismo día de la gestación, en todos los tiempos estudiados. En las RE

los niveles plasmáticos de estrógenos se presentaron en mayor concentración en el día 12 ($p= 0.007$) y en el día 17 ($p= 0.032$) de la gestación, con respecto a las RC. En el día 21 de la gestación no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

La distribución de la inmunomarcación del NPY presentó un patrón semejante en la corteza adrenal de RC y RE en los tres días de gestación estudiados. Las células NPY positivas fueron observadas en las zonas reticular y fascicular, mientras que no se presentaron en la zona glomerular (Figura 1).

El ANOVA trifactorial evidenció una interacción triple ($p=0,02$) en el I_{NPY} entre las zonas, los grupos y los días de gestación estudiados. El análisis a posteriori (DGC) reveló que en la zona fascicular se presentó una disminución significativa del I_{NPY} en RE con respecto a RC a los 12 días ($p<0,05$), mientras que a los 17 y 21 días de la gestación no se presentaron diferencias significativas. Por otro lado, en la zona reticular se observó una disminución significativa de I_{NPY} en RE con respecto a RC en el día 17 ($p<0,05$) y en los días 12 y 21 de la gestación no se presentaron diferencias significativas (Figura 2)

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La glándula adrenal responde continuamente a estímulos repetidos y transitorios como las situaciones de estrés. El NPY adrenal está involucrado en la respuesta adaptativa al estrés, frente a estas situaciones se producen alteraciones en los niveles del ARNm NPY y del péptido en la glándula (Wang y Whim, 2013). Según Hinson et al. (1995) la concentración del NPY adrenal es inversamente proporcional a la intensidad del estrés; a mayor intensidad se produce una disminución en los niveles del NPY. En concordancia, en este trabajo se encontró que el NPY adrenal presentó una disminución en las zonas fascicular y reticular en ratas estresadas a los 12 y 17 días de la gestación. Asimismo, en ratas estresadas se observó una disminución de la proliferación en las zonas fascicular y reticular en los mismos días de la gestación (Bozzo et al., 2011).

En condiciones de estrés se comprobó que la PRL provoca un incremento de los niveles plasmáticos de CORT (Mera et al., 2006), los que podrían ejercer un efecto indirecto en la disminución del I_{NPY} en los días 12 y 17 de la gestación.

En estudios recientes se demostró que los estrógenos actúan inhibiendo la liberación del NPY (Dwayne et al., 2010; Dhillon y Belsham, 2011). En este modelo experimental observamos que los niveles plasmáticos de estrógenos se presentaron en mayor concentración en el día 12 y 17 de la gestación en las ratas estresadas con respecto a sus controles, lo que estaría relacionado con la disminución del I_{NPY} adrenal.

El incremento de los niveles de la ACTH produce una disminución del NPY adrenal, evidenciando que el eje HHA es capaz de regular indirectamente la liberación del NPY a través de los glucocorticoides (Hirsch y Zukowska, 2012). En las ratas estresadas

observamos un incremento en los niveles plasmáticos de CORT en todos los días de la gestación estudiados, lo que estaría relacionado con la disminución del I_{NPY} adrenal en los días 12 y 17 de la gestación. En el día 21 determinamos que las concentraciones de CORT se mantuvieron elevadas, sin embargo no evidenciamos diferencias significativas en la inmunomarcación del NPY entre los grupos. Esto podría deberse al enmascaramiento de los receptores de glucocorticoides en respuesta al incremento sostenido de la CORT (Mizoguchi et al., 2001).

Se puede concluir que la exposición crónica al estrés y la consecuente hiperactividad del eje HHA con niveles plasmáticos incrementados de CORT, acompañado de niveles plasmáticos elevados de estrógenos, provocan alteraciones en la expresión del NPY adrenal. Estos factores podrían estar involucrados en el aumento de la susceptibilidad a desordenes psiquiátricos como la depresión en condiciones de estrés crónico.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam T, Epel E (2007) Stress, eating and the reward system. *PhysiolBehav* 91:449-458.
- Angoa M, Rivas S (2006) Acciones protectoras de los estrógenos en el sistema nervioso central. *Ryu89ev Fac Med UNAM* 49: 248-251.
- Armario A, Daviu N, Muñoz-Abellán C, Rabasa C, Fuentes S, Belda X, Gagliano H, Nadal R (2012) What can we know from Pituitary-Adrenal Hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors? *Cell Mol Neurobiol*32: 749-758.
- Bernet F, Dedieu J, Laborie C, Montel V, Dupouy P (1998) Circulating neuropeptide Y (NPY) and catecholamines in rat under resting and stress conditions. Arguments for extra-adrenal origin of NPY, adrenal and extra-adrenal sources of catecholamines. *NeurosciLett* 250: 45-48.
- Bozzo A, Soñez C, Monedero Cobeta I, Avila R, Rolando A, Romanini N, Lazarte M, Gauna H, Mugnaini M(2011) Chronic stress effects on adrenal cortex cellular proliferation in pregnant rats. *Int J Morphol* 29(4):1148-1157.

- Bozzo A, Soñez C, Monedero Corbeta I, Rolando A, Romanini MC, Cots D, Lazarte M, Gauna H, Mugnaini, MT (2013) Chronic stress and its effects on the adrenal cortex apoptosis of pregnant rats. *Biotechnic & Histochemistry* Early Online: 1–8. DOI: 10.3109/10520295.2013.846478
- Bozzola J, Russell L (1992) Principles and techniques for biologists. Boston. Jones and Bartlett (Eds.) 58–97.
- Buljubacich K, Mugnaini M, Soñez C, Rolando A, Romanini M, Bozzo A, Soñez M, Gauna H (2009). Chronic stress effects on NPY neuronal population during rat development. *Int J Morphol* 27:879-889.

- Dhillon S, Belsham D (2011) Estrogen inhibits NPY secretion through membrane-associated estrogen receptor (ER)- α in clonal, immortalized hypothalamic neurons. *Int J Obes* 35:198-207.
- Dwayne J, Ellis C, Shoemaker K (2010) Estrogen modulates the contribution of neuropeptide Y to baseline hind limb blood flow control in female Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:1351-1357.
- Erickson K, Drevets, W.; Schulkin, J (2003) Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 233-246.
- Glasow A, Breidert M, Haidan A, Anderegg U, Kelly P, Bornstein S (1996) Functional aspects of the effect of prolactin (PRL) on adrenal steroidogenesis and distribution of the PRL receptor in the human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 81(8):3103-3111; 1996.
- Hinson J, Cameron L, Kapas S (1995) Neuropeptide Y modulates the sensitivity of the rat adrenal cortex to stimulation by ACTH. *J Endocrinol* 145:283-289.
- Hirsch D, Zukowska Z (2012) NPY and stress 30 years later: The Peripheral View. *Cell Mol Neurobiol* 32:645-659
- Hoelfich A, Bielohuby M (2009) Mechanisms of adrenal gland growth: signal integration by extracellular signal regulated kinases 1/2. *J Mol Endocrinol* 42: 191-203.
- Idelman, S (1978) General comparative and clinical endocrinology of adrenal cortex. In: *Adrenal cortex*. London. (Ed. Jones IC) Academic Press. 1-119.
- Kuiper G, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson J (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870.
- Mera T, Fujihara H, Kawasaki M, Hashimoto H, Saito T, Shibata M, Saito J, Oka T, Tsuji S, Onaka T, Ueta Y (2006) Prolactin-releasing peptide is a potent mediator of stress responses in the brain through the Hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci* 141:1069–1086.
- Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui D, Tabira T (2001) Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinol* 26:443-459.
- Morales-Medina JC, Dumont Y, Benoit CE, Quirion R (2009) Morphological reorganization after repeated corticosterone administration in the hippocampus, nucleus accumbens and amygdala in the rat. *J Chem Neuroanat* 38: 266-272.
- Moosavi M, Ghasemi R, Maghsoudi N, Rastegar K, Zarifkar A (2011) The relation between pregnancy and stress in rats: considering corticosterone level hippocampal caspase-3 and MAPK activation. *Eur J Obstet Gynecol*. 158:199-203.

- Mugnaini MT, Soñez CA, Rolando A, Romanini MC, Bozzo A, Pastorino I, Gauna HF, Paz, AD (2006) Maternal chronic stress induces premature telencephalic vesicles development. *Int. J. Morphol.* 24(4):525-530.
- Murray A (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116:221-234.
- Pagano, M, Gauvreau, K (2000) Principles of Biostatistics. 2da Ed. Pacific Grove, C.A. Duxbury Press.
- Soñez C, Mugnaini M, Becú D, Rolando A, Romanini, M, Díaz M, Rodriguez M, Gauna H (1996) Effects of chronic stress upon the plasmatic levels of PRL, FSH, LH, estradiol and progesterone in pregnant rats. *Biocell* 14: 81.
- Thiele T, Heilig M (2004) Behavioral effects of NPY. In: NPY and related peptides. *Michael, M.C.* 255-282.
- Sapolsky, R (2000). Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 57: 925-935.
- Wang Q, Whim M (2013) Stress-induced changes in adrenal neuropeptide Y expression are regulated by negative feedback loop. *J Neurochem* 125:16-25.

ANEXOS

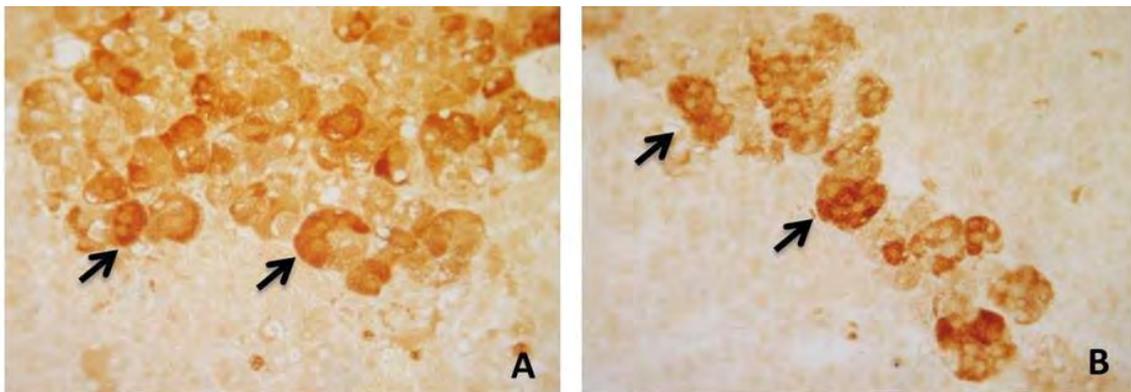


Figura 1. Microfotografía óptica de la zona reticular adrenal de ratas gestantes con células NPY positivas (400x) **A)** Rata control de 12 días **B)** Rata estresada de 12 días.

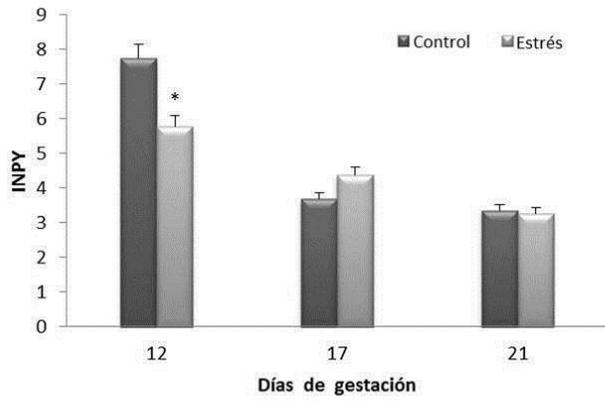


Figura 2: Índice de NPY en la zona fascicular de la corteza adrenal de ratas gestantes. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (* $p < 0.05$).

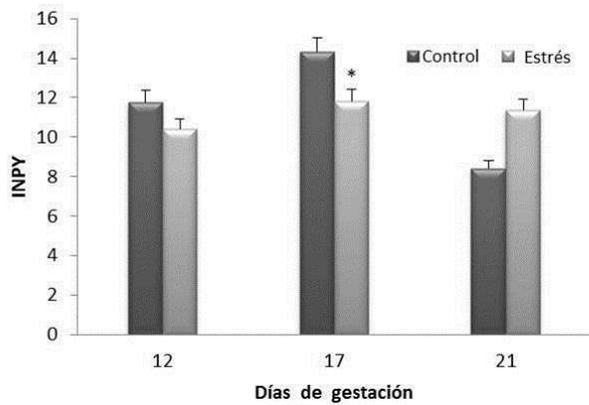


Figura 3: Índice de NPY en la zona reticular de la corteza adrenal de ratas gestantes. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (* $p < 0.05$).