

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**“EFECTOS DEL ÉSTRES CRÓNICO SOBRE LA
APOPTOSIS Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LA
CORTEZA ADRENAL DE RATAS GESTANTES”**

**Trabajo de Tesis para optar al
Título de Doctora en Ciencias de la Salud
Mención en Biomedicina**

Aída Andrea BOZZO

**CÓRDOBA
REPUBLICA ARGENTINA
2012**

COMISION DE SEGUIMIENTO DE TESIS

Directora: Prof. Dra. María Teresa Mugnaini

Co-Director de Tesis: Prof. Dr. Rodolfo Esteban Avila

Integrantes: Prof. Dra. María Elisa Dionisio de Cabalier

Prof. Dra. Viviana Rivarola

Artículo 30 del REGLAMENTO DE LA CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA:

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS”

A la memoria de mi madre y de mi amiga Carina.

A mis hijos: Agustina, Valentina y Joaquín.

AGRADECIMIENTOS

En la realización de esta tesis he recibido el apoyo de muchas personas, a las que quiero expresar mi reconocimiento. Realizarla no hubiera sido posible sin sus colaboraciones:

A la **Universidad Nacional de Río Cuarto** por brindarme las herramientas para desarrollarme como profesional en el área de las ciencias.

Muy especialmente a mi madre **Aída** por enseñarme el valor de las cosas y por su apoyo constante, que me ha permitido llegar hasta aquí.

A mi familia: **Franco, Agustina, Valentina y a mi pequeño Joaquín**, por el tiempo que les resté y por acompañarme siempre en la concreción de mis sueños.

Al Dr. **Prof. Héctor Fernando Gauna** por hacerme partícipe y permitirme trabajar con libertad en el programa de investigación que el dirige.

A la **Prof. Dra. María Teresa Mugnaini** por la confianza, estímulo y por el apoyo incondicional durante el desarrollo del trabajo.

Al **Prof. Dr. Rodolfo Esteban Avila**, por su co-dirección y sus valiosas observaciones.

A los miembros de la Comisión de Tesis, **Prof. Dra. María Elisa Dionisio de Cabalier** y a la **Prof. Dra. Viviana Rivarola** por sus críticas constructivas durante las sesiones de informes.

Al **Prof. Dr. Carlos Alberto Soñez**, por su amistad, consejos, paciencia y ayuda en las técnicas de microscopía electrónica.

A la **Prof. Dra. Alicia Rolando** y a la **Prof. Dra. Cristina Romanini** por su amistad, compañerismo y por brindarme su ayuda siempre que la necesité.

A la **Prof. Dra. Mónica Balzarini**, de la Universidad Nacional de Córdoba y a **Ignacio Monedero Cobeta**, de la Universidad Autónoma de Madrid, por el asesoramiento en el análisis estadístico.

A **Mario Lazarte** por su amistad y ayuda en el asesoramiento en Informática.

Agradezco también al **personal No Docente de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto**, por su apoyo general en el trabajo de bioterio.

Médica Veterinaria Andrea Bozzo

ÍNDICE

INDICE

ResumenIX

SummaryX

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

Estrés: conceptos generales 1

Respuesta Neuroendocrina de estrés..... 4

Clasificación de estímulos estresantes 4

Procesamiento de estímulos estresantes en el SNC 5

Sistema de respuesta al estrés 5

Muerte celular: apoptosis y necrosis..... 9

Mecanismo molecular de la apoptosis 12

Regulación de la apoptosis 18

Ciclo celular 19

Reguladores del ciclo celular..... 22

Control extracelular de la división celular..... 24

Matriz extracelular e interacción célula-matriz 26

Homeostasis de la glándula adrenal..... 27

Teorías de zonalización adrenal..... 28

Algunas consideraciones sobre el estrés crónico 29

HIPÓTESIS 31

OBJETIVOS 32

Capítulo 2: MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental 33

Tratamiento experimental..... 34

Obtención del material y técnicas utilizadas 34

Análisis estereológico de imágenes..... 40

Documentación microfotográfica 40

Análisis estadístico 41

Capítulo 3: RESULTADOS

Experimento 1: Efectos del estrés crónico sobre la apoptosis en la corteza adrenal de ratas gestantes	42
Resultados Estadísticos	
1. Índice apoptótico en la corteza adrenal de ratas gestantes.....	43
2. Índice apoptótico en cada zona de la corteza adrenal de ratas gestantes	45
3. Índice apoptótico en las diferentes zonas de la corteza adrenal de ratas gestantes	47
4. Interacción de la zona y el tratamiento sobre el índice apoptótico en 12, 17 y 21 días de gestación	48
Experimento 2: Evaluación de los efectos del estrés crónico sobre la proliferación en la corteza adrenal de ratas gestantes con la técnica de PCNA	51
5. Índice de proliferación en la corteza adrenal de ratas gestantes	52
6. Índice proliferativo en cada zona de la corteza adrenal de ratas gestantes	54
7. Índice proliferativo en las diferentes zonas de la corteza adrenal de ratas gestantes	56
8. Interacción de la zona y el tratamiento sobre el índice proliferativo en 12, 17 y 21 días de gestación.....	57
Experimento 3: Efectos del estrés crónico sobre la proliferación en la corteza adrenal de ratas gestantes mediante la técnica de BrDU	60
9. Índice de proliferación en la corteza adrenal de ratas gestantes	61
10. Índice proliferativo en cada zona de la corteza adrenal de ratas gestantes	63
11. Índice proliferativo en las diferentes zonas de la corteza adrenal de ratas gestantes	65
12. Interacción de la zona y el tratamiento sobre el índice proliferativo en 12, 17 y 21 días de gestación.....	67
Experimento 4: Evaluación de los efectos del estrés crónico sobre la apoptosis en la corteza adrenal de ratas gestantes con la técnica de microscopía electrónica	69

Capítulo 4: DISCUSIÓN

Respuesta del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en situaciones de estrés.....	74
Remodelación y homeostasis del tejido adrenal	77
Influencia de la regulación hormonal sobre la vasculatura y remodelación de la corteza adrenal	79
Caracterización morfológica del proceso apoptótico.....	81
Efectos del estrés crónico sobre la apoptosis celular	85
Efectos del estrés crónico sobre la proliferación celular.....	90
Efectos del estrés crónico sobre el crecimiento y peso adrenal	101
CONCLUSIONES	105
PERSPECTIVAS	108

Capítulo 5: BIBLIOGRAFÍA..... 110

Abreviaturas	125
--------------------	-----

RESUMEN

La homeostasis de los tejidos que constituyen a los seres vivos es regulada por los procesos de proliferación y apoptosis celular. El modelo de estrés crónico intermitente por inmovilización durante la gestación puede alterar diversos mecanismos que mantienen la homeostasis del organismo, los cuales son motivo de estudios actuales. En estudios previos se comprobó variaciones significativas en el peso de las glándulas adrenales y en los niveles plasmáticos de PRL, estrógenos y CORT. Bajo la **hipótesis** que el estrés crónico produce modificaciones en los procesos de proliferación y apoptosis en las glándulas adrenales de ratas gestantes, **los objetivos** fueron cuantificar las células en proliferación y apoptosis mediante la utilización de técnicas inmunocitoquímicas en la corteza adrenal de ratas en la segunda mitad de la gestación, y comprobar las características ultraestructurales del proceso apoptótico con microscopía electrónica de transmisión. **Material y Métodos:** En condiciones de bioterio controladas, se estudió la glándula adrenal de ratas de 12, 17 y 21 días de gestación, controles (RC) y experimentales (RE) sometidas a un estrés crónico, intermitente, homotípico e intenso. Se usaron técnicas combinadas de inmunomarcación, análisis estereológico y cuantificación de imágenes de cortes alternados para determinar las variaciones del fenómeno apoptótico y proliferativo que presentan las diferentes poblaciones celulares de la corteza adrenal. El tratamiento estadístico se realizó con los Softwares InfoStat y el SAS 9.1. Se aplicó ANOVA de una y tres vías y la distribución de Poisson de un modelo logarítmico lineal con efecto de grupo, tiempo e interacciones. Las diferencias fueron consideradas significativas si $p < 0.05$. **Resultados Apoptosis:** **a. En Ratas Gestantes Controles y Estresadas:** **1.** El índice apoptótico disminuyó a medida que progresó la gestación. Se encontraron diferencias significativas entre los días 12 vs. 17 y 12 vs. 21 ($p < 0.05$) en ambos grupos. **b. En Ratas Gestantes Controles:** **1.** El IA se incrementó desde la zona glomerular hasta la reticular, donde alcanzó los valores más elevados. En el día 12 el IA de la zona reticular fue significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto a las otras zonas. En el día 17 el IA presentó diferencias significativas entre las tres zonas de la corteza adrenal y en el día 21 el IA de la zona glomerular fue significativamente menor ($p < 0.05$) con respecto a las dos zonas restantes. **c. En Ratas Gestantes Estresadas:** **1.** El IA se incrementó desde la zona glomerular hasta la reticular, donde presentó los valores más elevados. En el día 17 y 21 de gestación el IA de la zona glomerular fue significativamente menor ($p < 0.05$) con respecto a las dos zonas restantes. **2.** En el día 17 hubo interacción entre las zonas fascicular y reticular con el tratamiento estrés sobre el IA. El IA de RE fue significativamente menor con respecto a RC. **Proliferación:** **a. En Ratas Gestantes Controles.** **1.** El IPC de la zona reticular presentó una disminución significativa ($p < 0.001$) con respecto a las otras zonas en los tres días de la gestación. En el día 12 el IPC presentó diferencias significativas entre las tres zonas de la corteza adrenal. En el día 17 y 21 el IPC de la zona reticular fue significativamente menor ($p < 0.001$) con respecto a las zonas glomerular y fascicular. **b. En Ratas Gestantes Estresadas:** **1.** El IPC total presentó diferencias significativas entre los tres días de la gestación. Siendo los menores valores en el día 17; mientras que en el 21 se encontraron los valores más elevados. **2.** El IPC total presentó una disminución significativa en la corteza adrenal en los días 12 y 17. **3.** A los 12 días se presentó una disminución del IPC en las zonas fascicular y reticular con PCNA; y en la zona fascicular con BrDU. A los 17 días se presentó una disminución del IPC en las tres zonas con PCNA y en las zonas glomerular y fascicular con BrDU. **Conclusiones:** **1.** Se estableció que el estrés crónico por IMO disminuye el IA y el IPC en la corteza adrenal, lo que estaría relacionado con la disminución de factores de crecimiento específicos y con las variaciones plasmáticas de CORT, PRL y estrógenos. **2.** Los resultados en los IA e IPC obtenidos en las zonas de la corteza adrenal son concordantes con lo propuesto por la teoría de la migración celular. **3.** El mecanismo involucrado en el incremento de peso adrenal es la hipertrofia celular.

SUMMARY

Homeostasis of tissues is regulated by cellular proliferation and apoptosis processes. Intermittent chronic stress by immobilization during gestation may alter several mechanisms that maintain the organism homeostasis. Those mechanisms are object of several studies. Previous studies using the immobilization model have shown significant variations in adrenal glands weight and plasmatic levels of PRL, estrogens and CORT. Under the **hypothesis** that chronic stress causes changes in proliferation and apoptosis processes in adrenal glands of gestant rats, the main **objectives** of this study were: 1) to identify and quantify cell nuclei in proliferation and apoptosis using immunocytochemical techniques in adrenal cortex samples of rats in the second half of gestation and, 2) to check the ultrastructural characteristics of apoptotic process by means of transmission electronic microscopy. **Materials and Methods:** In controlled lab conditions, the adrenal glands of control (RC) and experimental (RE) rats at 12, 17 and 21 days of gestation were studied. Experimental rats were subject to an intermittent, chronic, homotypic and intense stress in order to avoid habituation. A combination of labeling techniques, stereological analysis and image quantification of alternate sections was used to determine the changes in proliferation and apoptosis in the different cell populations of the adrenal cortex. Statistical analyses were performed with InfoStat and SAS 9.1 softwares. Data was analyzed with one and three-way ANOVAs and, a linear logarithmic model with Poisson distribution including group, time and interactions effects. Differences were considered significant at $p < 0.05$. **Results Apoptosis:**

a. Control and Stressed Gestant Rats: 1. IA showed a similar behaviour in both RC and RE; it decreased as gestation progressed. Significant differences were found for days 12 vs.17 and 12 vs. 21 ($p < 0.05$) in both groups. **b. Gestant Control Rats:** 1. IA increased from glomerular to reticular zone, where it reached the highest values. IA of reticular zone was significantly ($p < 0.05$) higher than that of fascicular and glomerular zones at gestation day 12. Besides, there were significant differences in IA among the three adrenal cortex zones at day 17 and, at gestation day 21 the IA of glomerular zone was significantly lower ($p < 0.05$) than that of the other two zones. **c. Stressed Gestant Rats:** 1. IA increased from glomerular to reticular zone in which it reached the highest values. At gestation days 17 and 21, glomerular zone IA was lower ($p < 0.05$) than that of the other two zones. 2. At gestation day 17, there was a significant interaction between fascicular and reticular zones with the stress treatment. Experimental rats showed a significantly lower IA than control rats. **Proliferation:**

a. Control Gestant Rats. 1. IPC of reticular zone showed a significant ($p < 0.001$) reduction compared to glomerular and fascicular zones in the three gestation moments under consideration. IPC was significantly different in the three adrenal cortex zones at gestation day 12. At days 17 and 21, IPC was significantly ($p < 0.001$) lower in reticular zone. **b. Stressed Gestant Rats:** 1. Total IPC showed significant differences in the three gestation moments considered. The lowest values were recorded at day 17, while the highest were found at day 21. 2. The total IPC in the adrenal cortex significantly decreased at days 12 and 17. 3. At gestation day 12 there was a decrease of IPC in fascicular and reticular zones treated with PCNA and in the fascicular zone treated with BrDU. A reduction of IPC was observed in the three adrenal cortex zones with PCNA and, in glomerular and fascicular zones with BrDU at gestation day 17. **Conclusions:** 1. Immobilization chronic stress diminishes IA and IPC in the adrenal cortex. This reduction may be related to changes in the plasmatic concentrations of CORT, PRL and estrogens. 2. Results obtained regarding IA and IPC in the adrenal cortex are consistent with cell migration theory. 3. The mechanism responsible for the increase in adrenal weight is cellular hypertrophy.

I N T R O D U C C I Ó N

|Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

Estrés: Conceptos generales.

El estrés constituye un problema importante de salud pública que afecta a las sociedades modernas y el gran desafío de los investigadores se centra en encontrar los mecanismos que rigen el estrés crónico en humanos. Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el investigador es el intento de reproducir, en modelos animales, situaciones de estrés equiparables a los modelos actuales. Armario, A. ⁽¹⁴⁾ señala que, tanto en animales como en humanos, los efectos de las situaciones estresantes dependen de la naturaleza del estímulo, la intensidad, la duración y las posibilidades de resolver la situación de forma adecuada, aspectos que justifican la búsqueda de marcadores fisiológicos de estrés como instrumento para valorar el nivel de estrés experimentado.

El creciente interés de diferentes disciplinas en la investigación del estrés es debido principalmente a que las experiencias adversas severas y sostenidas por largos períodos de tiempo, pueden ser la causa del desarrollo de diversas patologías que afectan el eje hipotálamo hipofisario adrenal (HHA) como el desorden de estrés postraumático o la depresión ⁽¹¹¹⁾.

Junto con la influencia de la carga genética del individuo, el estrés crónico ha sido propuesto como uno de los principales factores desencadenantes de la depresión ^(76, 79). Por esta razón, varios modelos animales de estrés son utilizados en estudios preclínicos de estos desórdenes psiquiátricos.

En la actualidad resulta evidente que esta área del conocimiento recién se encuentra en sus comienzos, por lo que el descubrimiento de los mecanismos involucrados en las situaciones de estrés crónico que alteran el eje HHA constituye un atractivo tema de investigación para las ciencias básicas.

El término “estrés” deriva del latín *stringere*, que significa originalmente “oprimir”, “apretar” o “atar”. En el siglo XVII, la palabra estrés se utilizó frecuentemente para expresar el sufrimiento, la privación, las pruebas y adversidades que tenían que padecer las personas. Durante el siglo XVIII, el concepto estrés dejó de referirse a las consecuencias emocionales y comenzó a denotar el factor desencadenante de tales reacciones en el individuo ⁽¹⁾. La palabra “estrés” se relaciona con el vocablo inglés *strain*, que alude a la tensión excesiva, conducente a comprimir y constreñir y que, en el caso de las ciencias biológicas, se usa para describir las características fisiológicas de las respuestas corporales al estrés ⁽⁶¹⁾.

En 1920, el fisiólogo Walter B. Cannon introdujo el término “estrés” en la medicina para hacer referencia a las condiciones internas y externas bajo las cuales el organismo responde con activación del sistema nervioso simpático para restaurar el equilibrio del medio interno ⁽¹³⁸⁾.

Años más tarde, el término estrés irrumpe en la medicina, a través del investigador canadiense Hans Selye, quien lo utilizó para designar el conjunto de cambios fisiopatológicos observados en ratas tales como pérdida de peso, inhibición tímica y ulceración gástrica después de la administración de diferentes extractos glandulares. A este conjunto de síntomas los agrupó bajo el concepto de “Síndrome General de Adaptación” y definió al estrés como la respuesta no específica del organismo frente a cualquier demanda sobre él; destacando la activación corticoadrenal como el aspecto fisiológico más relevante ^(3, 90, 101).

Con el surgimiento de nuevas investigaciones el concepto de estrés fue evolucionando y en 1980, Vigas y col. ⁽¹⁶⁵⁾ definieron al estrés como “la respuesta del organismo desarrollada en el curso de la filogenia a agentes reales o simbólicamente nocivos para su integridad”.

Chrousos y col. ⁽³⁹⁾ definieron al estrés como un estado de homeostasis amenazada o de disarmonía, que es contrarrestado por un complejo repertorio de respuestas conductuales y fisiológicas que restablecen el estado homeostático conocido como Respuesta Adaptativa al Estrés.

El concepto de estrés es absolutamente comprensible en el marco de una lógica evolucionista, ya que es una respuesta ante una situación de adaptación y la

respuesta al estrés sería el conjunto de estrategias puestas en marcha ante una situación de cambio. Ser capaces de adaptarse a los cambios es esencial para la supervivencia desde la perspectiva evolucionista. Sin embargo, se debe señalar que ciertas circunstancias actúan como estresores porque la evolución no ha capacitado a los organismos para adaptarse a ellas de modo natural ⁽²⁾.

El estrés se utiliza para aludir a cualquier condición que perturbe seriamente la homeostasis fisiológica y psicológica que el individuo percibe como adversa. La palabra estrés es un concepto multidimensional, que también se ha empleado para denotar sus tres componentes: el estresor, que se define como cualquier estímulo externo o interno que de manera directa o indirecta produzca desestabilización en el equilibrio dinámico del individuo; la respuesta del organismo al estresor, y los estados fisiológicos intermediarios entre estresor y reacción corporal o proceso de evaluación cognoscitiva y emocional. La respuesta al estrés puede definirse como el conjunto de reacciones fisiológicas y conductuales dirigidas a restablecer la homeostasis del organismo y está determinada por la percepción que el organismo tiene del estímulo estresante correspondiente ⁽⁶¹⁾.

En los sistemas biológicos, el estrés está íntimamente relacionado con los conceptos de homeostasis y alostasis. Consecuentemente, Mc Ewens y col. definen al estrés como un proceso fisiológico adaptativo, que mantiene estables las demandas internas y externas del organismo ⁽¹⁰³⁾. El estrés excesivo puede originar una respuesta biológica acumulativa (carga alostática) y alterar los mecanismos adaptativos desarrollando una respuesta alostática ineficiente y un notable cambio en los mediadores del estrés. El continuo desequilibrio entre la capacidad de adaptación y el estresor produce una sobrecarga alostática, que puede conducir a un estado de enfermedad y afectar a los diferentes sistemas del organismo ⁽¹⁴⁸⁾.

Respuesta neuroendócrina de estrés.

Cualquiera sea la naturaleza del estímulo estresante, éste es procesado por el Sistema Nervioso Central (SNC) y de allí se desprende si la situación puede considerarse como estresante. Si no es considerada así, puede ser resuelta con la puesta en marcha de mecanismos homeostáticos específicos apropiados para cada situación. Si por el contrario, es considerada estresante requiere la puesta en marcha de mecanismos de emergencia ⁽¹⁰⁰⁾.

El estrés provoca un estado de alerta general en el SNC que se caracteriza por la aparición de estados emocionales particulares, asociados a las características específicas del estímulo estresante y por un incremento en los estados de atención y vigilancia, cambios que permiten no sólo mejorar la capacidad para responder apropiadamente a la situación, sino también para favorecer la memoria. Las propiedades estresantes de la situación no serán iguales para todos los individuos ya que dependerá de las características psicológicas y físicas individuales, es decir de los recursos disponibles para resolver la situación ⁽¹⁰⁰⁾.

Clasificación de estímulos estresantes.

Los tipos de estímulos estresantes estudiados en animales y en humanos pueden ser psicológicos (situaciones desconocidas, exámenes o entrevistas, charlas en público, la inminencia de una intervención quirúrgica, el aislamiento o separación social, las guerras, las catástrofes naturales); físicos (metales pesados, exposición a rayos x), o mixtos (dolor, heridas, hemorragia, hipotensión, hipoglucemia, frío o calor, actividad física intensa, ayuno, malnutrición) ⁽⁹⁰⁾.

Desde el punto de vista de su predictibilidad pueden ser estímulos predecibles (por regularidad temporal o por señal de aviso) e impredecibles. Por las posibilidades que se dispongan para evitar la presentación del estresor, serán controlables e incontrolables. Por su duración pueden ser agudos (puntuales o continuos) y crónicos (continuos, intermitentes repetidos o variables) ⁽⁹⁰⁾.

Procesamiento de estímulos estresantes en el SNC.

En general las situaciones de estrés provocan una activación del organismo con cambios de comportamiento neuroquímicos, inmunológicos, endócrinos y metabólicos que tienen como objetivo fundamental asegurar la capacidad del organismo para desarrollar un comportamiento activo, al tiempo que inhibe los procesos anabólicos como la ingesta, el crecimiento y la reproducción.

La activación de estos cambios es coordinada por el SNC el cual incluye la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y neuronas noradrenérgicas ubicadas en el hipotálamo y tallo cerebral; y a nivel periférico están involucrados el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) y simpático médulo-adrenal (SMA) ⁽¹⁴⁹⁾.

Se ha observado en roedores que la activación de los ejes SMA ⁽⁴³⁾ e hipofisario-adrenal (HA) son proporcionales a la intensidad de los estímulos estresantes y los resultados obtenidos en humanos apuntan en la misma dirección ⁽¹³⁾.

En relación al eje SMA, los datos indican que la respuesta de la adrenalina (de origen méduloadrenal) es mejor marcador de estrés que la noradrenalina (sobre todo de origen simpático). Esto puede explicar que la hiperglucemia provocada por el estrés mediada por la adrenalina sea, al menos en la rata, un buen marcador de intensidad de estrés ^(43, 12).

Una hormona sensible a los efectos del estrés es la prolactina (PRL), que se incrementa proporcionalmente a la intensidad de los estímulos estresantes en ratas y existen evidencias que lo mismo sucede en humanos ⁽¹³⁾.

Sistema de Respuesta al estrés.

La secreción adenohipofisaria de la adrenocorticotrofina (ACTH) está bajo control hipotalámico, constituyéndose esta estructura cerebral en el punto de convergencia de la mayoría de los estímulos estresantes que actúan estimulando el eje HA. La CRH es el factor más importante en su secreción, y su incremento produce un aumento en la expresión del gen para la pro-opiomelanocortina (POMC), que por su clivaje molecular intracelular produce la hormona α -melanocito-estimulante, β endorfina y ACTH ⁽¹²³⁾.

Las neuronas CRH que intervienen en la secreción de ACTH se ubican en la porción del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo y sus axones se proyectan a la parte externa de la eminencia media donde descargan su contenido al sistema portal hipofisiario.

La respuesta de la ACTH es controlada también por otros factores hipotalámicos que actuarían de forma coordinada entre los que se destacan la oxitocina (OX), la angiotensina II (ANG) y las catecolaminas centrales (CA) ⁽¹²⁷⁾ estimuladas principalmente en el estrés por inmovilización (IMO) con aumento del c-fos cerebral ⁽¹²²⁾.

Dentro de los secretagogos de ACTH se encuentra la arginina-vasopresina (AVP) que es co-expresada en un conjunto de neuronas CRH en el PVN, y su rol en la inducción de la liberación de ACTH adquiere importancia en situaciones tales como en el estrés crónico donde el eje HHA se activa en forma sostenida. Se ha demostrado que la CRH estimula la síntesis y liberación de ACTH, mientras que la AVP estimula sólo la liberación ⁽⁴⁴⁾.

La liberación de ACTH estimula la síntesis de glucocorticoides (GC) en la corteza adrenal, y la corticosterona (CORT) es el principal GC en la rata. La reducción progresiva de la ACTH es, principalmente, consecuencia de la retroalimentación negativa ejercida por los GC y en forma secundaria, por una disminución del contenido de ACTH de la hipófisis. Se considera que la retroalimentación se ejerce básicamente en el hipocampo, el PVN y la adenohipófisis ⁽¹⁰⁹⁾.

Los GC ejercen su acción inhibitoria actuando a través de dos tipos de receptores esteroidales citosólicos, designados como tipo I o receptor mineralocorticoide (MR) de alta afinidad y el tipo II o receptor glucocorticoide (GR) de baja afinidad. Mientras que los receptores tipo I están localizados principalmente en el sistema límbico, los receptores tipo II tienen una distribución más generalizada y se encuentran en las tres zonas que contribuyen a la retroalimentación negativa ⁽¹⁰⁹⁾.

Se ha demostrado que con niveles elevados de CORT en la rata como los que se determinan por la noche o en situaciones de estrés, se ocupan los receptores tipo II y es por esto que se consideran más importantes en relación al bloqueo de la respuesta HA a las situaciones de estrés ⁽¹¹⁷⁾.

Otra vertiente de respuesta al estrés está dada por neuronas CRH que inervan células noradrenérgicas en el locus coeruleus (LC) y otros sitios, que por retroalimentación positiva activan receptores adrenérgicos α_1 en el PVN para liberar CRH. Bajo situaciones estresantes el CRH estimula al LC induciendo la secreción de catecolaminas ⁽³²⁾. Los axones que provienen del PVN se ramifican en el LC donde hay producción de NA ⁽¹¹³⁾ **(figura 1)**.

Dado que cualquier estímulo es procesado dentro del SNC siguiendo vías nerviosas particulares que utilizan mensajeros específicos en cada una de sus sinapsis, es evidente que las vías nerviosas y neurotransmisores implicados en la respuesta a los estímulos estresantes dependerán del tipo de estímulo utilizado ⁽¹⁰⁰⁾.

Aunque las situaciones de estrés van acompañadas de la activación simultánea de los ejes SMA y HA, se ha postulado que ambas respuestas responden a características diferenciales de los estímulos. Así, el eje SMA se activaría en situaciones que requieren una conducta activa por parte del organismo, en tanto que el eje HA se activaría en situaciones en las cuales existe incertidumbre acerca de los cambios en el ambiente que el animal espera; ya sea porque aparece una situación nueva o porque no se cumplen con las expectativas esperadas ⁽¹⁰⁰⁾. La activación del eje HA sería especialmente marcada cuando no se disponen de recursos para buscar soluciones adecuadas para la situación ⁽¹⁰⁾.

A nivel periférico, la activación de los ejes SMA y HA tienen como función preparar al organismo para la acción mediante la activación del sistema cardiovascular y de la disponibilidad de glucosa para el SNC y otros nutrientes, como ácidos grasos libres para órganos menos dependientes de glucosa como el músculo. A nivel cardiovascular, se incrementa la intensidad y frecuencia de la contracción cardíaca y la presión arterial por la acción del simpático y las catecolaminas meduloadrenales con una acción sinérgica positiva de los GC. A nivel metabólico, los GC favorecen el proceso de gluconeogénesis y las catecolaminas la glucogenólisis hepática y la lipólisis ⁽⁶⁴⁾.

ESTÍMULO ESTRESANTE

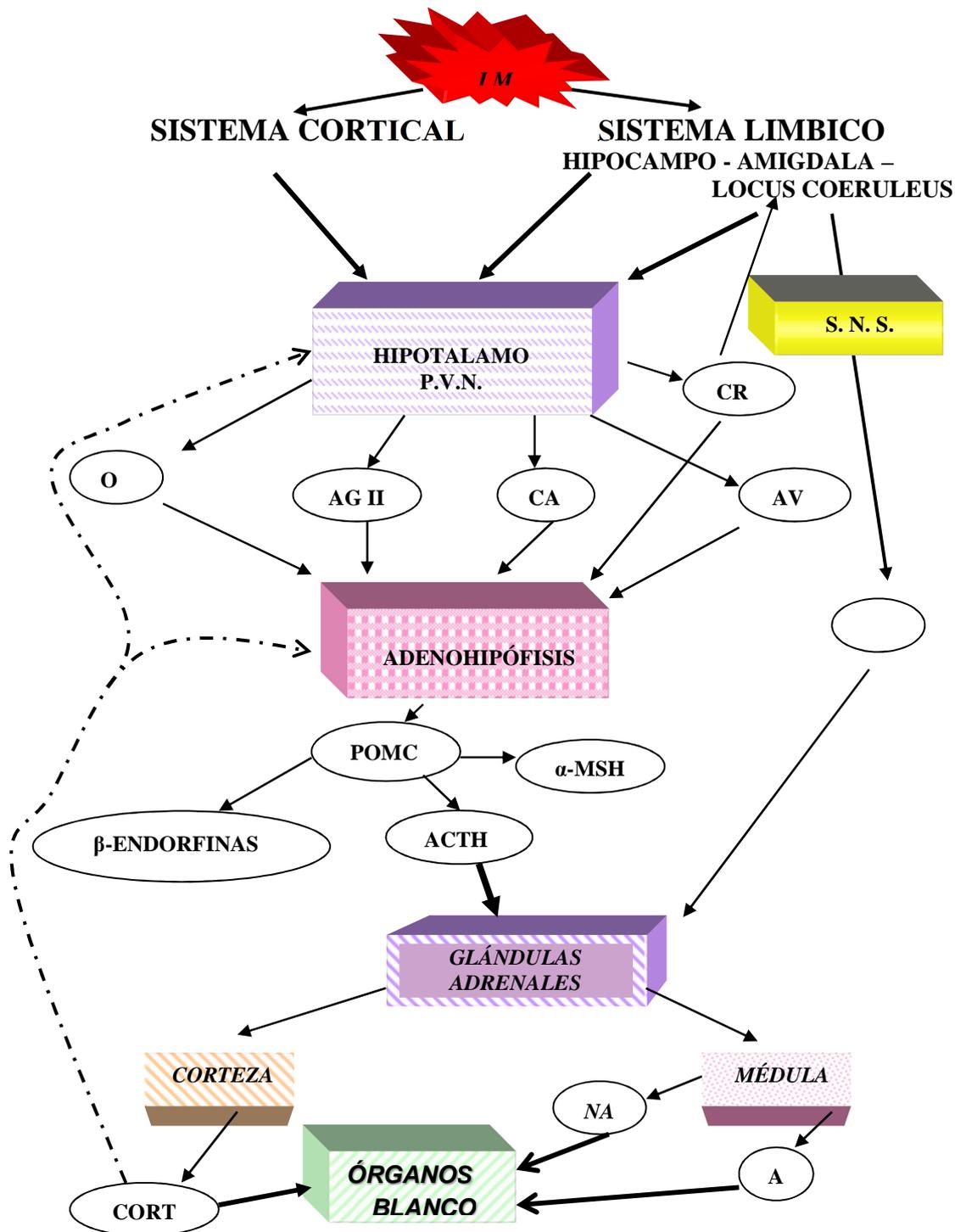


Figura 1. SISTEMA DE RESPUESTA AL ESTRÉS.

Las células de un organismo no viven indefinidamente y su vida media depende del tipo celular. Hay células cuyo período de vida es largo como las musculares o las neuronas, mientras que la vida de otras es efímera, como algunas células sanguíneas y epiteliales, que se renuevan a partir de sus células progenitoras.

El número de células que componen un tejido en un organismo adulto permanece constante, dentro de ciertos límites. Las células que mueren se sustituyen por otras, proceso que está regulado y asegura el mantenimiento de un balance adecuado entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular. El recambio celular en los tejidos se fundamenta en el mantenimiento de un equilibrio (homeostasis) entre la apoptosis y la proliferación celular con el fin de garantizar la población adecuada en cada momento ⁽⁹¹⁾.

Muerte celular: apoptosis y necrosis.

La apoptosis es un proceso de autodestrucción celular controlada que es esencial durante el desarrollo, morfogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos, así como para controlar el número de células y eliminar células infectadas, mutadas o dañadas ⁽⁵⁷⁾.

Las observaciones, provenientes en su mayor parte de sistemas de desarrollo embrionario, pusieron de manifiesto algunas particularidades morfológicas de las células que morían en condiciones fisiológicas. De esta forma se acuñó el término apoptosis por contraposición a la muerte accidental o necrosis ⁽⁷⁷⁾.

La muerte se puede producir por necrosis cuando el daño es letal. Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una condición patológica que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y/o de resistencia. Puede ser desencadenada por diferentes factores como deficiencias en el aporte nutricional, respiratorio o circulatorio; eventos físicos como calor, frío, radiaciones, traumatismos, agentes biológicos (microorganismos) y agentes químicos (sustancias tóxicas). Estos factores provocan que las células y sus organelas se hinchen debido a la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática para controlar el paso de iones y agua. Se produce la liberación de enzimas lisosomales y la consecuente ruptura de las membranas, con liberación de

proteínas desnaturalizadas y fragmentos de ácido desoxiribonucleico (DNA) en el espacio intercelular. Esto genera una respuesta inflamatoria local al atraer células del sistema inmune ⁽¹¹⁸⁾.

La apoptosis implica una programación genética común en todas las células nucleadas que se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva entre organismos tan diversos como los nemátodos y los mamíferos ⁽⁴⁵⁾. Se define como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de estímulos fisiológicos o patológicos. En este caso, una serie de señales hacen que la célula decida su propia muerte; es lo que se ha calificado como “muerte que permite vivir”. Se considera como una medida fisiológica de remoción celular dependiente de energía, que afecta a las células individuales e involucra la participación de enzimas celulares endógenas liberadas en cercanía de la muerte ⁽⁵⁷⁾.

La mayoría de las células animales son capaces de seguir esta vía de muerte, incluso en aquéllas en las que no se activa este mecanismo. Este hallazgo implica que el programa genético de autodestrucción forma parte del repertorio de respuestas celulares a señales externas o a cambios en las condiciones celulares internas ⁽¹¹⁸⁾.

En la apoptosis los acontecimientos suceden de manera ordenada y silenciosa, por lo que a este proceso también se lo denomina muerte celular programada. Pueden diferenciarse tres fases:

Fase efectora: con adopción del compromiso de muerte en forma irreversible. Se caracteriza por incremento en el contenido de calcio intracelular, que origina la activación de enzimas (caspasas y endonucleasas) y es acompañada de cambios en el tamaño y forma celular. Asimismo, en la superficie de la célula se forman protuberancias o burbujas.

Fase degradativa: en esta fase las endonucleasas fragmentan al DNA, las caspasas degradan las proteínas y se producen cambios marcados en el citoesqueleto. Se condensa la cromatina y se rompen los fragmentos rodeados de membrana, denominados cuerpos apoptóticos.

Fase de eliminación: los macrófagos atraídos por ligandos específicos de fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas, fagocitan los cuerpos apoptóticos. Esto impide la salida del contenido celular al exterior, evitando el proceso inflamatorio ⁽³⁴⁾.

Las características generales de la muerte celular por apoptosis y necrosis se observan en la **figura 2**.

APOPTOSIS	NECROSIS
Muerte fisiológica. Proceso muy regulado y controlado.	Muerte no fisiológica; muerte accidental traumática. Proceso no regulado.
Se produce durante el desarrollo, mantiene la homeostasis tisular y elimina células dañadas.	No se produce durante el desarrollo
Inducida por estímulos intracelulares o extracelulares.	Inducida por un daño celular o tisular.
Proceso energéticamente activo y que requiere la biosíntesis de proteínas.	Proceso energéticamente pasivo.
Sigue un orden específico de eventos. Condensación de la cromatina y fragmentación internucleosomal del DNA genómico. Mantenimiento estructural de orgánulos.	La célula se hincha, se lisan orgánulos subcelulares y se desintegra de forma desordenada.
Mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática. El contenido celular queda englobado en los cuerpos apoptóticos. No se produce la liberación del contenido celular. No se produce inflamación.	La ruptura de la membrana conduce a la liberación del contenido celular al espacio extracelular, asociada con inflamación.
Participación activa de componentes celulares. Degradación mediada por caspasas.	Proceso pasivo.
Fagocitosis de cuerpos apoptóticos.	Lisis celular, y daño a las células vecinas.

Figura 2. Características generales de la muerte por apoptosis y necrosis. Tomado de Lizarbe Iracheta, M.A.; 2007.

Existen diferentes procesos en los cuales las células activan este mecanismo de muerte. El primero, constituye un proceso fundamental en la organogénesis durante el desarrollo embrionario y la metamorfosis. Ejemplos de ello es la remoción de tejido durante la formación de los dedos del feto, la eliminación de la zona fetal de la corteza adrenal durante el período posnatal temprano y la pérdida de la cola del renacuajo en la metamorfosis de la rana ⁽¹¹⁸⁾.

El segundo mecanismo implica la destrucción de las células que representan una amenaza para la integridad del organismo. Las células con daño en su DNA aumentan la producción de la proteína p53, la cual es un potente inductor de la apoptosis. De la misma manera, es importante para el sistema inmune durante el proceso de selección de linfocitos T en el timo, en la eliminación de células autorreactivas después que se ha completado la respuesta inmune, y en la muerte de los neutrófilos maduros ⁽⁹⁶⁾.

Algunos tejidos y órganos están sujetos a hormonas o factores de crecimiento y la remoción o adición de los mismos resulta en apoptosis. Entre estos órganos podemos incluir a la próstata después de la castración, el útero postparto, la zonalización de las capas de la corteza adrenal posterior al nacimiento y a la glándula mamaria después del destete ⁽¹¹⁸⁾.

Mecanismo molecular de la apoptosis.

La apoptosis como proceso dependiente de energía se puede iniciar por una gran variedad de estímulos, intra o extracelulares, participando las células en su propia muerte de una forma organizada y eficiente. Un conjunto variado de moléculas que pueden activarse o inhibirse, están implicadas en la apoptosis. Así, la estimulación de moléculas pro-apoptóticas o la inhibición de factores anti-apoptóticos dependen del tipo celular y del insulto recibido ⁽⁹¹⁾.

Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas como elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula, lesión del DNA por luz ultravioleta, oxidantes, radiaciones ionizantes, quimioterápicos, glucocorticoides, etc; moléculas que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el programa apoptótico ⁽⁴²⁾.

Este proceso está conducido por dos clases de proteasas especializadas, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Las caspasas efectoras o ejecutoras son activadas por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las "caspasas" es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera sea el estímulo ⁽⁵⁴⁾.

Estas proteasas son las verdaderas ejecutoras de la apoptosis y presentan las siguientes características:

- 1) son **Cisteín-proteASAS**, tienen cisteína como grupo nucleofílico para la hidrólisis del sustrato y un requerimiento específico por el residuo de ácido **ASP**ártico de sus sustratos.
- 2) Son sintetizadas como procaspasas y adquieren su actividad por proteólisis. Efectúan la proteólisis en una serie específica de sustratos, proceso que es irreversible.
- 3) Las caspasas y sus inhibidores coexisten siempre en las células normales, lo que evita una activación accidental y la muerte innecesaria de las células normales.

Las procaspasas (30-50 kD) contienen tres dominios: un predominio N- terminal, una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). En base a la similitud de la secuencia entre los dominios de las subunidades las caspasas se dividen en tres grupos: grupo inflamatorio (1, 4, 5, 11, 12, 13, 14), grupo iniciador (8, 9, 10) y grupo efector (3, 6 y 7) ⁽³⁴⁾.

La procaspasa es inactiva y una vez que sufre dos roturas proteolíticas se separan las tres subunidades. La grande y la pequeña forman un heterodímero por unión de sus sitios activos. La unión de dos heterodímeros se verifica en dirección opuesta con dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las subunidades grandes (**figura 3**).

La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie de proteínas que conducirán a la muerte de la célula. Se producen modificaciones en la membrana plasmática con disminución de la adhesión a otras células y a la matriz extracelular, condensación de la cromatina, activación de endonucleasas (fragmentación del DNA), ruptura de las mitocondrias con pérdida de su contenido al citoplasma, desorganización del citoesqueleto con pérdida de la forma celular y aparición de protuberancias en la membrana plasmática (zeiosis). Se expresan señales (fosfatidilserina) para inducir la fagocitosis y se activan proteínas específicas para preparar a la célula en el bloqueo de las funciones metabólicas ⁽¹¹⁸⁾.

Hay diferentes vías que conducen a la activación de las caspasas. Una es la intrínseca, mediada por el estrés celular o por lesión en el DNA y la otra es la extrínseca, mediada por ligandos que se unen a sus receptores en la superficie celular ⁽⁵⁷⁾.

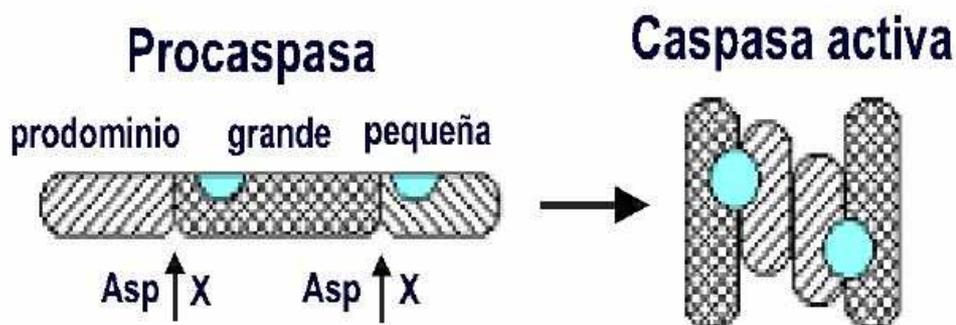


Figura 3. Activación de procaspasa. Tomado de Cascales Angosto, M; 2003.

En la vía intrínseca mitocondrial las modificaciones del equilibrio interno de la célula provocan alteraciones en el potencial de la membrana mitocondrial asociado a un desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico y síntesis de adenosintrifosfato (ATP). La permeabilidad de la membrana mitocondrial está controlada por un poro complejo conocido como megacanal mitocondrial que mantiene la homeostasis de la matriz mitocondrial. La apertura de este canal poliproteico conduce a la liberación al citoplasma de diversas proteínas apoptogénicas como el citocromo c, AIF (factor inductor de apoptosis), la endonucleasa G, Smac/ DIABLO, la serínproteasa Omi/Htr A2, entre otras. Además se genera un flujo de calcio y se liberan ROS (especies reactivas de Oxígeno) ⁽⁹¹⁾.

El citocromo c interacciona con la proteína citosólica Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas) e induce la unión del dATP a Apaf-1, el cual se activa y expone una superficie de oligomerización. Varias unidades Apaf-1 se unen formando el apoptosoma dejando la zona CARD (dominio de reclutamiento de las caspasas) en el centro, que es donde va a unirse la procaspasa 9. La misma sufre

una autoproteólisis, se activa y activa a su vez, a la cascada de las caspasas efectoras ⁽³⁴⁾.

Otra de las proteínas liberada de la mitocondria es AIF que una vez en el citoplasma se transloca al núcleo y activa a la poli ADP ribosa polimerasa (PARP-I). Como resultado el DNA se fragmenta de forma independiente de la actividad de las caspasas. Cuando Smac/DIABLO se libera al citoplasma interacciona con inhibidores endógenos de las caspasas (IAP) neutralizándolos y por lo tanto, previniendo el bloqueo de la apoptosis.

Si bien la mitocondria desempeña un rol central en la vía intrínseca, no es la única organela implicada. Los lisosomas y el retículo endoplasmático liberan otros factores de muerte como catepsinas, calpaínas y otras proteasas. Así el estrés del retículo endoplasmático, que se caracteriza por la alteración de la homeostasis del calcio y por la acumulación de proteínas incorrectamente plegadas, activa la procaspasa 12 localizada en la cara citosólica del retículo endoplasmático. La caspasa 12 activa provoca la activación de la caspasa 9 y ésta de la 3, pero de forma independiente del citocromo c. Además la liberación de calcio también induce la activación de calpaínas que normalmente están en su forma inactiva como zimógenos ⁽⁹¹⁾.

Otra vía intrínseca de inducción del proceso apoptótico se inicia por daños en el DNA. Las respuestas celulares a daños genéticos están mediadas por quinasas, de las que se destacan ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) y la proteínquinasa dependiente de DNA (DNA-PK). Ambas dirigen una serie de respuestas como la detención del ciclo celular para que se repare el DNA o si el daño es excesivo, para que se induzca la apoptosis. El factor de transcripción p53 está implicado en este control ⁽⁵⁷⁾.

La vía extrínseca está mediada por los receptores de muerte celular pertenecientes a la superfamilia del receptor de TNF (TNFR) cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína, un dominio de transmembrana y una secuencia en su dominio citoplasmático para acoplar el receptor con la maquinaria apoptótica. La señal se inicia con la unión del ligando con su respectivo receptor, entre los que se encuentran FAS o CD95, TRAIL

(DR4/DR5) y TNFR1 ⁽⁵²⁾. La unión del ligando provoca la homotrimerización del receptor y de este modo, el receptor de muerte es capaz de reclutar proteínas adaptadoras hacia la membrana celular. Este proceso implica la interacción homofílica entre los dominios de muerte (DD) de los receptores con los de las moléculas adaptadoras (proteínas puente entre el receptor y la caspasa) como la proteína FADD. Las moléculas adaptadoras poseen los dominios efectores de muerte (DED), capaces de interactuar homofílicamente con las caspasas provocando su activación. Se forma un complejo de señalización de muerte (DISC) que contiene a la proteína FADD y las caspasas 8 o 10. La caspasa 8 se activa, y desencadena a su vez, la activación de otras caspasas, entre las que se incluyen la caspasa 3 (caspasa ejecutora). Paralelamente, la caspasa 3 puede eliminar un dominio de la proteína Bid amplificando la señal de muerte celular dado que causa daño a la mitocondria ⁽⁵⁷⁾.

Por otro lado, a través de la vía de receptores de muerte, la activación de las caspasas puede ser regulada por la proteína FLIP. Esta contiene el dominio DED, lo que le permite unirse al prodominio de la procaspasa 8 bloqueando la interacción de esta caspasa con los complejos receptor proteína adaptadora e interfiriendo con el proceso apoptótico.

La muerte apoptótica es inducida reversiblemente hasta que los ejecutores de caspasas son activados. Su activación conduce a la degradación de una variedad de proteínas y a la activación de enzimas degradadoras como las nucleasas, que se encargan de la fragmentación del DNA cromosómico en sus posiciones más accesibles, el DNA espaciador o internucleosómico, originándose fragmentos cuyo tamaño es múltiplo de 180 pares de bases (longitud aproximada del DNA de cada nucleosoma). Por lo que una de las “marcas” de la apoptosis es la observación de un patrón de bandas en escalera (DNA ladder), al estudiar el DNA por electroforesis ⁽⁸⁷⁾.

La PARP fue la primera proteína nuclear identificada como sustrato de las caspasas. Está involucrada en la reparación de los sitios de ruptura espontánea del DNA y además inhibe las endonucleasas dependientes de calcio y magnesio que degradan al DNA durante la apoptosis. Esta proteína mantiene la integridad

del DNA, su degradación provoca una reparación reducida del DNA y un incremento en el daño de los cromosomas ⁽¹⁵¹⁾.

La DNA topoisomerasa II es una enzima nuclear esencial para la replicación y reparación del DNA. Las caspasas inactivan esta enzima y conducen a la lesión del DNA ⁽¹³³⁾.

Las láminas A, B y C son proteínas intranucleares que mantienen la forma del núcleo y median las interacciones entre la cromatina y la membrana nuclear. La degradación de las láminas por la caspasa 6 origina la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear ⁽⁸⁹⁾ **(figura 4)**.

En la fase final de la apoptosis las protuberancias externas de las células formadas durante la etapa de ejecución terminan por separarse formando los cuerpos apoptóticos, fragmentos celulares cerrados por membrana que tienen en su interior una variedad de organelas citoplasmáticas intactas y fragmentos nucleares. Son característicos de la apoptosis y su presencia constituye una de las diferencias con la necrosis celular ⁽¹¹⁸⁾.

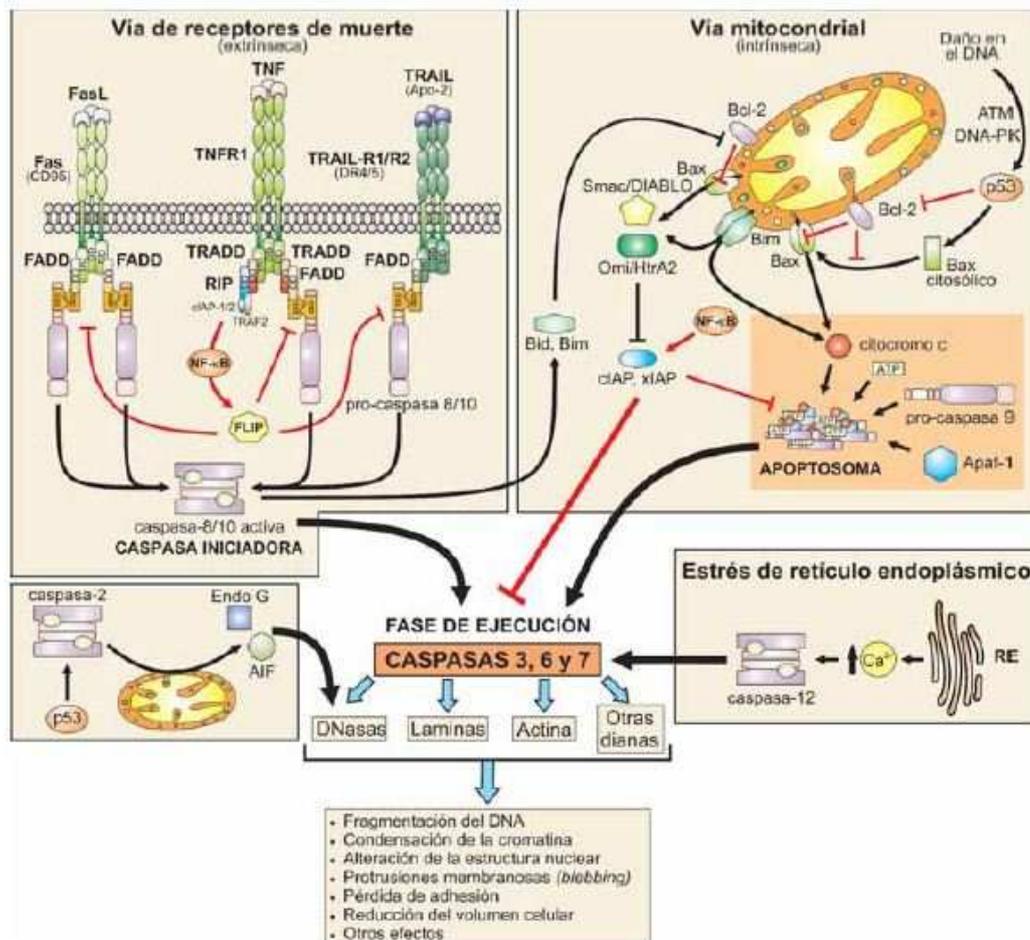


Figura 4. Vías de señalización que conducen a la apoptosis.
Tomado de Lizarbe Iracheta, M.A.; 2007.

Regulación de la Apoptosis.

La apoptosis es controlada por proteínas implicadas en varios niveles de señalización celular y están codificadas por protooncogenes y genes oncosupresores (57).

Existen diversos activadores (citocromo c, smac/DIABLO, AIF, BIR3) y reguladores negativos (IAP, Hsp, Bcl-2 y BclXL) (155). La activación del apoptosoma se encuentra estrechamente controlado por proteínas de la familia Bcl-2 asociadas a la mitocondria, algunas de las cuales son apoptóticas y otras antiapoptóticas. Las células están protegidas por los factores antiapoptóticos de la

familia Bcl-2, los cuales limitan el reclutamiento de los componentes del apoptosoma. Son factores antiapoptóticos la proteína Hsp70 y las IAP. La Hsp70 secuestra Apaf-1 y con ello impide la formación del apoptosoma y las IAP bloquean la actividad de las propias caspasas ⁽⁵⁷⁾.

La inhibición de la apoptosis es importante para el mantenimiento de la homeostasis de los organismos superiores. Durante el ciclo de vida normal las IAP tienen una amplia capacidad antiapoptótica por silenciar la actividad de las caspasas. Su acción es bloqueada por smac/DIABLO ⁽⁹¹⁾.

Existen proteínas Bcl-2 proapoptóticas y antiapoptóticas. La familia Bcl-2 se divide en tres grupos según los dominios BH que las integran:

- a) Antiapoptóticas, las que comparten la homología de secuencia en los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4. Por ejemplo: Bcl-2 y Bcl-XL.
- b) Proapoptóticas, las que comparten la homología de los dominios B1, B2 y B3, por ejemplo: Bax y Bak,
- c) Proapoptóticas, las que comparten la secuencia de homología sólo en el dominio BH3, por ejemplo Bid, Bik, y Bim.

Se demostró que el dominio BH4 se requiere para la actividad apoptótica y que el dominio BH3 es esencial para la actividad proapoptótica.

Se observan modificaciones en el proceso de apoptosis en condiciones fisiológicas caracterizadas por una gran proliferación celular como en el desarrollo embrionario y posnatal temprano, por mecanismos de acción de hormonas y factores parácrinos, así como en situaciones patológicas como el estrés, cáncer, enfermedades autoinmunes o infecciones víricas.

Ciclo celular.

El ciclo celular está constituido por una serie ordenada de acontecimientos macromoleculares que conducen al crecimiento de la célula y a la división celular.

Todas las células se originan únicamente de otra existente con anterioridad. De esta manera, el ciclo celular se inicia en el instante en que aparece una nueva célula, descendiente de otra que se divide, y termina cuando esta célula por división subsiguiente, origina dos nuevas células hijas ⁽³³⁾.

Este ciclo comprende dos períodos fundamentales: la interfase, formada por los períodos G1, S y G2 y la división celular que puede tener lugar por mitosis en células somáticas o meiosis en las células sexuales.

Fase G1: es la primera fase del ciclo que transcurre entre el final de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. Durante este tiempo la célula duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes, como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Se produce crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN.

Fase S (síntesis): en esta etapa la célula duplica su material genético para pasarle una copia completa del genoma a cada una de sus células hijas. Al finalizar esta etapa, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al comienzo del ciclo.

Fase G2: es la fase de crecimiento del ciclo celular en la que continúa la síntesis de proteínas y ARN. Al final de este período se observan cambios en la estructura celular que indican el principio de la división celular. Termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis, teniendo ahora cada célula el doble contenido de cromatina.

Fase M (mitosis y citocinesis): división celular en la que una célula progenitora (célula somática) se divide en dos células hijas idénticas. Esta fase incluye la mitosis, a su vez dividida en: profase, metafase, anafase, telofase; y la citocinesis que se inicia ya en la telofase mitótica ⁽⁹²⁾.

Cuando las células no están en actividad proliferante se dice que han salido del ciclo celular y se encuentran en estado de quiescencia o fase G0. El aumento en el número de células de un determinado tejido es inherente a la proliferación. Por el contrario, en estado de quiescencia la célula cumple con todas sus funciones específicas, al igual que en el caso anterior, pero sin duplicar su contenido genómico ni dividirse **(figura 5)**.

Una instancia crucial del ciclo es el que ocurre en el punto R (restrictivo) de la fase G1, momento en el cual la célula decide si debe continuar en el ciclo celular dando otra ronda de división o, por el contrario, quedar en estado de quiescencia ⁽³³⁾.

En células en estado G0 o en G1 (punto de restricción), los factores E2F se encuentran formando un complejo con una proteína con dominio “bolsillo” pRB (proteína del retinoblastoma). Este complejo interacciona con sitios específicos en los promotores de los genes implicados en la síntesis de DNA y reprime su transcripción. Los complejos cdk-ciclina que se activan en la fase G1 fosforilan a las proteínas con “bolsillo”, las cuales se disocian del complejo, lo que favorece a E2F para estimular la transcripción ⁽¹⁶⁴⁾.

Por consiguiente, la regulación de la expresión de los genes implicados en el control del ciclo celular está estrechamente coordinada con las señales extracelulares del medio. En ausencia de factores estimuladores de la transcripción, la célula permanece en G0 impidiendo la producción de componentes del ciclo celular. En respuesta a factores de crecimiento, la cascada de señales generada da lugar a la activación de una serie de genes de forma secuencial, lo que tendrá como respuesta biológica la inhibición del bloqueo del ciclo, la entrada en G1/S y la proliferación celular ⁽¹⁶⁴⁾.

Durante el desarrollo temprano, muy pocas células abandonan el ciclo celular, pero en estado adulto la mayoría de ellas se encuentran en estado quiescente. Sólo células especializadas como las del sistema hematopoyético, el epitelio intestinal o hepáticas, mantienen una proliferación activa en el organismo adulto ⁽⁹⁸⁾.

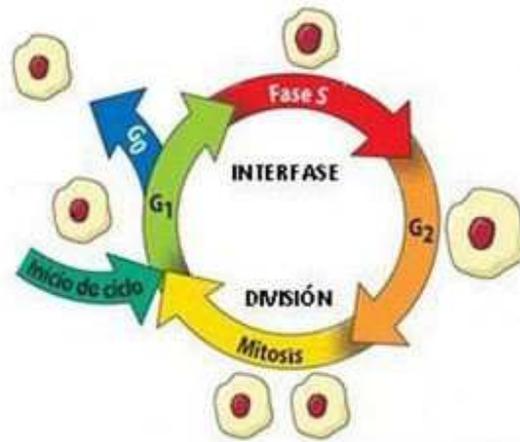


Figura 5. Etapas del ciclo celular.

Extraído de <http://benitobios.blogspot.com.ar/2009/05/ciclo-celular.html>

Reguladores del ciclo celular.

Estimuladores.

Como ocurre en muchos otros procesos celulares, para que el ciclo celular de una célula se ponga en marcha es necesario la presencia de un estímulo que la célula sea capaz de interpretar a través de sus receptores para poder encender la maquinaria molecular del ciclo. Las proteínas que constituyen el estímulo o señal extracelular que le indica a la célula que entre en proliferación, son conocidas como factores de crecimiento y son producidas naturalmente por el organismo.

Los factores de crecimiento regulan la proliferación celular a través de una compleja red de cascadas intracelulares de señalización, que finalmente induce la transcripción de una serie de genes que son vitales para la activación de los complejos de control del ciclo celular. Dentro de los genes regulados se encuentran los genes de respuesta temprana cuya transcripción se activa rápidamente y en ausencia de síntesis de proteínas como myc, fos y jun. La inducción de estos genes se debe a modificaciones postraduccionales (fosforilaciones) de factores específicos, implicados en la transcripción de genes preexistentes en la célula de forma inactiva. Estas fosforilaciones son

responsables de la activación transcripcional de los factores y son llevadas a cabo por una o más quinasas intracelulares (MAPKs, PKA, PKC), las se activan tras la exposición a diferentes factores de crecimiento u otros estímulos proliferativos ⁽¹⁴⁴⁾. Los productos de los genes tempranos son a su vez, factores de transcripción que pueden provocar la activación de la transcripción de genes de respuesta intermedia o tardía. Los productos de algunos de estos genes son reguladores del ciclo celular.

De esta forma, el tránsito por las diferentes fases del ciclo celular está dirigido por una red de interacción de proteínas como las enzimas de acción fosforilante denominadas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que forman complejos heterodiméricos activos al unirse a sus subunidades regulatorias, las ciclinas ⁽⁹⁸⁾.

Las CDK4 y CDK6 están involucradas en el pasaje durante G1 temprano, mientras que CDK2 es requerida para completar G1 e iniciar la fase S.

Las dos primeras forman complejos activos sólo con las ciclinas tipo D. Por su parte, la CDK2 es activada secuencialmente por las ciclinas tipo E durante la transición entre las fases G1 y S, y por las ciclinas A durante la fase S.

Las ciclinas tipo D desempeñan un papel importante en la integración de las señales mitógenas y constituyen el punto de conexión entre el medio extracelular y el ciclo celular. Una vez que los factores de crecimiento interaccionan con sus receptores localizados en la membrana plasmática, se dispara una cascada de transducción de señales cuyo eje principal es la vía Ras/Raf/MAPK y cuyo evento fundamental es la síntesis de ciclina D1. Esta ciclina interacciona con CDK4/6 y permite la entrada de la célula en la fase G1 del ciclo celular. La ciclina D1 es el blanco de la ubiquitinación por la ligasa SCF y, luego de su transporte desde el núcleo al citoplasma, es degradada por el sistema de proteosomas ⁽¹¹⁰⁾.

Inhibidores de la proliferación celular.

Los inhibidores de las ciclinas (CKI) se dividen en dos familias, cada una de ellas constituida por varios miembros, de acuerdo a las CDK que inhiben. La familia INK4 consta de cuatro proteínas, p15, p16, p18 y p19, que ejercen su acción inhibitoria sobre las CDK4 y CDK6, uniéndose a ellas e impidiendo su asociación con las ciclinas de tipo D.

La familia restante, la de los inhibidores Cip/Kip, la constituyen tres miembros conocidos como p21, p27 y p57. Estos forman complejos heterotriméricos con las CDK y ciclinas restantes inhibiendo, de este modo, su actividad quinasa ⁽⁹⁸⁾.

Los principales sustratos de las CDK4/6 y CDK2 son las proteínas que se incluyen en la familia retinoblastoma (Rb), es decir p107 y p130. Estas proteínas interaccionan con la familia de factores de transcripción E2F de modo de mantenerlos inactivos durante la fase M y en G0. Los complejos Rb-E2F participan en la represión de los promotores de ciertos genes, involucrados en la proliferación celular. Este mecanismo de represión involucra el reclutamiento, por medio del complejo Rb-E2F, de proteínas involucradas en el mantenimiento de una estructura cerrada de la cromatina, tales como histona deacetilasas e histona metiltransferasas. La actividad de las proteínas Rb es modulada por la fosforilación secuencial catalizada por los complejos CDK4/6-ciclina D y CDK2-ciclina E. La hiperfosforilación de las proteínas Rb, libera las moléculas que permanecían unidas en las isoformas hipofosforiladas de Rb, principalmente los factores E2F, permitiendo la prosecución hacia otras etapas del ciclo celular ⁽⁹⁸⁾.

Control extracelular de la división celular.

Las células de un organismo pluricelular deben ser controladas de manera que se dividan sólo y cuando el organismo necesite otras células, ya sea para permitir el crecimiento de los tejidos o reponer las células perdidas. En consecuencia, para que una célula animal se divida, no es necesario únicamente nutrientes, sino también señales químicas provenientes de otras células ⁽⁹²⁾.

La mayoría de las moléculas de señalización extracelular son proteínas solubles secretadas por otras células o proteínas unidas a la superficie de otras células o a

la matriz extracelular. Muchas de ellas actúan positivamente para estimular determinados procesos, pero otras tienen una función inhibitoria.

Estas proteínas se dividen en tres grupos dependiendo de su función:

1- Mitógenos: son proteínas que estimulan la división celular contrarrestando los mecanismos intracelulares de freno que bloquean la progresión del ciclo. Por ejemplo: somatomedina, eritropoyetina, etc.

Estas proteínas, actúan en la fase G1 para permitir la entrada de la célula a la fase S. Los mitógenos actúan uniéndose a receptores de la membrana con actividad tirosina-quinasa, los cuales activan la proteína G “Ras” cambiándola de su estado unido a GDP por GTP. Esta activación desencadena una cascada de fosforilaciones a través de las proteínas MAPK (quinasas activadas por mitógenos), las cuales transmiten el estímulo a diversas moléculas efectoras de transcripción produciendo la transcripción de “genes tempranos” (entre los que destacan los que codifican a las ciclinas de G1) y algunos de estos genes a su vez activan la transcripción de genes tardíos. De esta manera, la vía de señalización Ras-MAPK transmite señales extracelulares al núcleo activando la maquinaria del ciclo celular ⁽¹⁷⁹⁾.

2- Factores de crecimiento: estimulan el crecimiento celular mediante la promoción de la síntesis y la inhibición de proteínas y otras macromoléculas. Al igual que la mayoría de los mitógenos, los factores de crecimiento se unen a receptores de superficie celular que luego activan diversas vías de señalización intracelular, las cuales podrán inducir aumento de la síntesis proteica o bien una disminución de la degradación proteica. Todo ello conducirá al crecimiento celular. Ejemplos: factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), citoquinas como: IL-1, TNF, entre otros. ⁽³³⁾.

3- Factores de supervivencia: promueven la supervivencia celular por supresión de los programas de suicidio intracelular o apoptosis. Esta necesidad de señales de otras células para la supervivencia, contribuye a que las células sólo sobrevivan cuando y donde se las requiera.

Al igual que los mitógenos y los factores de crecimiento, los factores de supervivencia suelen unirse a receptores de la membrana celular, lo cual activa vías de señalización intracelular que inhiben la muerte celular, en general mediante la regulación de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2. Algunos factores de supervivencia son: IL-3, IGF-1 ⁽⁹²⁾.

Matriz extracelular (MEC) e interacción célula-matriz.

La MEC es un complejo macromolecular dinámico y en constante remodelación que se sintetiza a nivel local y que constituye una proporción importante de cualquier tejido. Los principales componentes de la MEC son los proteoglicanos, las proteínas estructurales (principalmente el colágeno) y las proteínas de adhesión como laminina y fibronectina.

Cada una desempeña funciones de manera integrada con las demás; esto hace que la matriz sea calificada como un verdadero complejo funcional. El colágeno y el sistema elástico constituyen la arquitectura de la matriz extracelular, las glicoproteínas actúan como moléculas de adhesión del sustrato intercelular, importantes en las interacciones célula-célula y célula-matriz y los glucosaminoglicanos y proteoglicanos tienen un papel fundamental en el equilibrio hidroelectrolítico y ácido básico ⁽⁹²⁾.

Con todo ello la MEC es imprescindible en la regulación del crecimiento, el movimiento y la diferenciación de las células que residen en ella. En el crecimiento y la diferenciación celular intervienen al menos dos tipos de señales que actúan en conjunto. Una procede de moléculas solubles como los factores de crecimiento polipeptídicos y los inhibidores del crecimiento, y en la otra participan componentes insolubles de la MEC que interactúan con las integrinas celulares. La interacción entre la MEC y los factores de crecimiento pueden influir en el crecimiento, la movilidad, la diferenciación y la síntesis proteica celular. Las integrinas se unen a la MEC e interactúan con el citoesqueleto en complejos de adherencia focal. Esto puede iniciar la síntesis de segundos mensajeros intracelulares o mediar directamente las señales nucleares. Los receptores de los factores de crecimiento situados en la superficie celular también pueden iniciar las

segundas señales. Todos son integrados por la célula para generar distintas respuestas, como variaciones del crecimiento, la locomoción o la diferenciación celular ⁽⁹²⁾.

La perturbación de este equilibrio de interacciones célula-matriz puede provocar pérdida de la arquitectura tisular con varias consecuencias para el tejido, por ejemplo pérdida en los patrones de diferenciación, proliferación y muerte celular.

Homeostasis de la glándula adrenal.

La glándula adrenal como órgano que responde al estrés, está sometida a cambios estructurales dinámicos que incluyen la proliferación y la muerte celular. El balance entre estos procesos es una condición previa para la integridad y la funcionalidad de esta glándula ⁽¹¹⁵⁾.

La ACTH liberada de la hipófisis es el regulador primario del desarrollo adrenal y del mantenimiento de la homeostasis a través de la producción y secreción de hormonas esteroideas. La ACTH ejerce su efecto principalmente a través de la proteína G unida a su receptor presente en la membrana plasmática de las células de la corteza adrenal ⁽⁸⁶⁾. Las células adrenocorticales producen tres grupos de hormonas esteroideas, los mineralocorticoides en la zona glomerular, y los glucocorticoides y las hormonas sexuales en la zona fascicular y reticular respectivamente ⁽⁷⁵⁾.

Las células corticales de los mamíferos adultos tienen escasa actividad proliferativa y toman un considerable tiempo para ser renovadas, lo cual trae aparejado dificultades para investigar la dinámica de su proliferación. Originalmente la ACTH fue considerada por tener un efecto antiproliferativo en la adrenal; aunque recientemente, se ha descrito que podría tener un efecto proliferativo actuando por medio de otra cascada de señales. Esto es relevante en humanos y animales sometidos a estrés crónico, dado que el incremento de los niveles de ACTH trae aparejado la hiperplasia de la corteza adrenal ⁽⁵¹⁾.

Actualmente se desconoce si las células adrenocorticales productoras de diferentes clases de esteroides se originan de la misma célula progenitora y cuánto tiempo demoran estas células en ser renovadas. De este modo, la

clarificación de la cinética celular de la corteza adrenal es importante no sólo para dilucidar su biología celular sino también en relación con aspectos clínicos y patológicos de la homeostasis esteroidea. En este contexto las teorías corrientes de la zonalización adrenal ⁽¹⁷⁴⁾ deben ser revisadas para hacer una reinterpretación sobre la regulación de la apoptosis y de la proliferación celular, bajo la luz de nuevos hallazgos sobre estos procesos

Teorías de zonalización adrenal.

Estas teorías intentan explicar el fenómeno de mantenimiento de la homeostasis estructural y la relación entre la proliferación y la muerte celular ⁽¹⁷⁴⁾. Están basadas en observaciones histológicas de mamíferos recién nacidos o bajo condiciones experimentales como manipulación farmacológica, castración o adrenalectomía unilateral, para inducir incrementos de la proliferación en la corteza adrenal, ya que el recambio celular en la glándula adrenal de mamíferos adultos es lento en condiciones normales ⁽⁷⁵⁾.

Teoría de la migración: describe la proliferación de células corticales en la parte externa de la corteza, migración y diferenciación de células de la zona glomerular a células fasciculares y éstas a reticulares. Éstas últimas degeneran y mueren ⁽⁷³⁾. Estos hallazgos son sustentados por la detección autorradiográfica de células en fase S con un incremento de la actividad mitótica. Investigaciones con privación de ACTH y estrés tóxico demostraron un incremento del recambio celular ⁽¹⁷⁴⁾.

Teoría de la transformación: sugiere dos direcciones de transformación, considerando el reemplazo del tejido zonal por células proliferantes de la zona intermedia. La misma se ubica entre la zona glomerular y fascicular y la migración de estas células se produce en dos direcciones opuestas; por un lado hacia la médula, y por otro lado hacia la cápsula. Esta transformación puede suceder localmente entre las zonas glomerular y fascicular o entre la fascicular y reticular, respectivamente ⁽¹⁷⁴⁾.

Teoría zonal: sostiene que la proliferación ocurre en las tres zonas, basado en la observación de células en fase S marcadas con timidina tritiada y por otro lado, que la apoptosis se presenta en todas las zonas de la corteza. De acuerdo a este

concepto, cada zona puede ser regulada localmente sin afectar a las otras en su comportamiento funcional ⁽¹⁵⁰⁾ (figura 6).

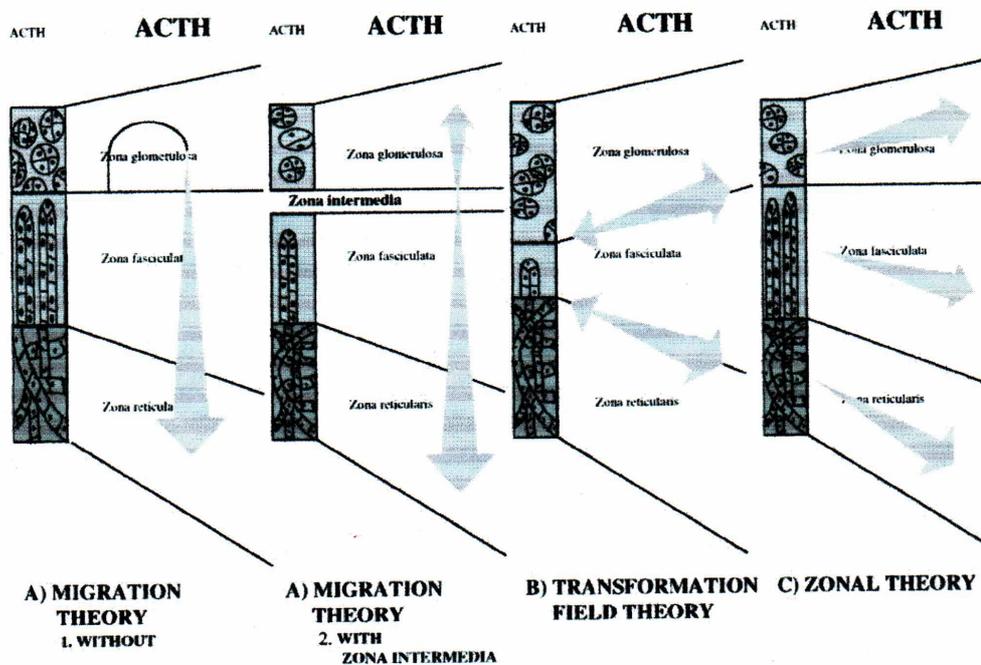


Figura 6. Teorías de zonalización adrenal.
Tomado de Wolkersdorfer, G. y Bornstein, S.; 1998.

Algunas consideraciones sobre el estrés crónico.

Cuando se aplica un estrés crónico intermitente de intensidad suficiente como la inmovilización se observa un aumento en el tamaño de la glándula adrenal, mucho más evidente siempre en el peso relativo debido a la pérdida de peso del animal, que está en relación con un incremento máximo de CORT en respuesta al efecto trófico de la liberación de ACTH. El aumento de tamaño de las adrenales va acompañado de un incremento de la respuesta (“in vivo” e “in vitro”) de la corteza adrenal a la ACTH ⁽¹¹⁾.

En estudios clínicos en animales y humanos se ha comprobado que los niveles circulantes de ACTH tienen una correlación positiva con el tamaño de la adrenal y que la hipersecreción crónica de ACTH induce hiperplasia difusa bilateral ⁽⁸⁵⁾.

Bajo condiciones de estrés crónico no se ha determinado si el aumento de peso adrenal es producido por hipertrofia o hiperplasia, ni si el crecimiento celular se presenta en todas las zonas de la corteza o con predominio en alguna de ellas.

En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, con la finalidad de correlacionar los efectos del estrés crónico sobre las concentraciones plasmáticas de las principales hormonas que ejercen su acción sobre la corteza adrenal, se demostró que:

- 1- los niveles plasmáticos de CORT luego de 24 horas de exposición al estrés por IMO, en los días 12, 15, 17, 19 y 21 de la gestación fueron mayores en las RE que en las RC del mismo día de la preñez en todos los tiempos estudiados ⁽¹³⁵⁾.
- 2- Los niveles plasmáticos de PRL en el día 17 de la gestación se presentaron elevados en las RE con respecto a las RC ⁽¹⁴⁶⁾.
- 3- Los niveles plasmáticos de estrógenos se presentaron en mayor concentración en el día 17 de la gestación en las RE con respecto a las RC ⁽¹⁴⁶⁾.

HIPOTESIS

Teniendo en cuenta el aumento de peso de las glándulas adrenales y los niveles plasmáticos de PRL, CORT y estrógenos en la segunda mitad de la gestación, acompañado de interacciones complejas de factores hormonales, parácrinos y autócrinos que intervienen en la homeostasis de los tejidos adultos para regular su masa celular se postula que el estrés crónico provoca modificaciones en los procesos de proliferación y apoptosis en las glándulas adrenales de ratas en la segunda mitad de la gestación.

OBJETIVO GENERAL:

Analizar los efectos del estrés crónico sobre la apoptosis y la proliferación celular en la corteza adrenal de ratas gestantes durante la segunda mitad de la gestación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Determinar el índice apoptótico en la corteza adrenal de madres controles y estresadas con la técnica inmunocitoquímica de caspasa-3 activada.
- 2) Determinar el índice de proliferación celular en la corteza adrenal de madres controles y estresadas con las técnicas inmunocitoquímicas de Antígeno de proliferación celular y de Bromodeoxiuridina.
- 3) Comprobar las características ultraestructurales de la apoptosis en la corteza adrenal de animales controles y estresados con técnicas de microscopía electrónica de transmisión.

M A T E R I A L E S

Y

M É T O D O S

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Animales y condiciones de bioterio.

Se manejaron los animales de acuerdo a las Normativas Internacionales para el cuidado y uso de acuerdo a los principios de cuidado de animales de laboratorio. <http://www.nih.gov/sigs/bioethics>. (NIH publicat. 8523, revised 1985).

Los animales de experimentación se obtuvieron de la cepa perteneciente al bioterio del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, el cual dispone de salas de cría, de aislamiento de los animales controles, salas de estrés y de muestreo, entre otras dependencias.

Se utilizaron ratas hembras albinas primíparas de la cepa Wistar, de 90 a 120 días de edad, de 200 a 300 gramos de peso corporal al inicio del experimento. Fueron alojadas de a tres ejemplares por jaula y mantenidas bajo condiciones estándar de bioterio: temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperiodo controlado (12 horas luz, de 7.30 a.m. a 7.30 p.m.), humedad ambiente, con alimentación e hidratación *ad-libitum*.

Las ratas fueron cicladas por medio de colpocitogramas en fresco para determinar el día del estro, por la mañana, entre las 10 y 11 horas. Las hembras en proestro se mantuvieron por el término de 12 a 18 horas con un macho de la misma cepa. Al día siguiente se comprobó si existían espermatozoides en el fluido vaginal. Si el hallazgo fue positivo, se consideró como el día cero de la gestación a los fines de sacrificio programado. Las hembras preñadas se separaron en dos grupos: control (RC) y experimental (RE). Las hembras del grupo control permanecieron en sus jaulas hasta el momento del sacrificio.

Tratamiento experimental.

En el laboratorio de estrés perteneciente al bioterio, a las RE se les aplicó sesiones de estrés por inmovilización (IMO) en plancha, tablas de madera de 20 x 20 cm con cuatro soportes de metal como apoya-miembros en sus respectivos ángulos, donde se sujetaron las extremidades del animal por medio de cinta adhesiva en posición prona, según el método descrito por Michajlovskij y col. ⁽¹⁰⁶⁾. De esta forma se logró una restricción de movimientos, siendo considerado un estímulo de estrés intenso.

Cada hembra recibió una sesión de estrés a partir del cuarto día de la gestación; por 45 minutos, con una frecuencia en días alternados y a horarios diferentes durante el día, a fin de evitar adaptación o habituación, hasta el día previo al sacrificio.

En nuestro modelo experimental el estrés por IMO aplicado se caracteriza por ser un estrés **de tipo mixto, crónico, intermitente, variable, de fuerte intensidad, impredecible e incontrolable** ⁽⁹⁰⁾.

Obtención de material:

El sacrificio de las ratas se realizó por decapitación, entre las 10 y 11 horas a los 12, 17 y 21 días de gestación, obteniéndose un mínimo de 5 ratas de cada grupo (control y estrés) por edad gestacional.

No se realizó anestesia porque el éter, compuestos de amonio, barbitúricos y otros anestésicos provocan alteraciones en SNC actuando como estresores ⁽⁴⁶⁾.

Posteriormente al sacrificio se extrajeron las adrenales, se fijaron en formol bufferado y se procesaron con la técnica histológica para microscopia óptica consistente en: fijación, deshidratación, penetración con solventes orgánicos, parafinización, cortes seriados con micrótopo Reicher-Young 2035 y montaje en portaobjetos con adhesivo Vectabond.

Se procesaron tres portaobjetos por animal; teniendo cada uno tres cortes de la misma glándula pero a distinto nivel de la corteza adrenal.

Para la determinación inmunocitoquímica de PCNA y caspasa 3 se formaron los grupos (control y estrés) por cada edad gestacional. Para el experimento de

determinación de proliferación con BrDU se formaron los siguientes grupos: ratas controles inyectadas con solución fisiológica (CF), ratas controles inyectadas con BrDU (CBrDU), ratas estresadas inyectadas con solución fisiológica (EF) y ratas estresadas inyectadas con BrDU (EBrDU).

Para cada una de las técnicas inmunocitoquímicas se utilizaron 270 cortes histológicos obtenidos de la corteza adrenal de las RC y RE.

Técnica inmunocitoquímica para la determinación de Caspasa 3 activada (30, 128).

- 1) Desparafinización con dos baños en xilol de 15 minutos cada uno.
- 2) Baño de alcohol/xilol de 10 minutos, seguido de baños en alcoholes en serie decreciente (100°, 96° y 70°) de 10 minutos cada uno.
- 3) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 4) Recuperación antigénica en microondas durante 6 minutos a 850 w.
- 5) Bloqueo de peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno al 20% durante 30 minutos.
- 6) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 7) Bloqueo de anticuerpos inespecíficos con suero de caballo (Vector) durante 30 minutos.
- 8) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 9) Primer anticuerpo (anti-Caspasa 3 activada, anticuerpo policlonal de conejo Chemicon International) 1:10 en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 24 horas.
- 10) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 11) Segundo anticuerpo (Vectastain ABC elite kit-6200, Vector) durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- 12) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 13) Tercer anticuerpo (Vectastain ABC elite kit-6200, Vector). Se cubrieron los portaobjetos y se incubaron por 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- 14) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.

- 15) Revelado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Vector).
- 16) Coloración de contraste nuclear con verde de metilo al 1% en acetato de sodio, durante 5 minutos.
- 17) Deshidratación en una serie creciente de alcoholes, (70°, 90°, 96° y 100°) de 10 minutos en cada uno.
- 18) Baño de alcohol/xilol de 10 minutos.
- 19) Dos baños de xilol de 20 minutos cada uno.
- 19) Montaje con DPX.

Fundamento: La caspasa 3 es sintetizada como una proenzima inactiva que es procesada por proteólisis en células en apoptosis. El procesamiento de la caspasa 3 consiste en la asociación de las subunidades pequeña (12 kDa) y grande (17 kDa) para formar la enzima activa. La caspasa 3 activa degrada y activa a otras caspasas que tienen diferentes sustratos en la célula apoptótica. La unión enzimática anticuerpo-peroxidasa genera una coloración permanente, intensa y localizada del sustrato cromogénico que provee una detección sensible en inmunocitoquímica.

Se realizó el control positivo en cortes de tejido de glándula mamaria postdestete y para el control negativo se realizó la técnica convencional en tejido adrenal exceptuando la colocación del primer anticuerpo.

Técnica inmunocitoquímica para la determinación del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) ^(30, 38).

- 1) Desparafinización con dos baños en xilol de 15 minutos cada uno.
- 2) Baño de alcohol/xilol de 10 minutos, seguido de baños en alcoholes en serie decreciente (100°, 96° y 70°) de 10 minutos cada uno.
- 3) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 4) Bloqueo de peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno al 20% durante 30 minutos.
- 6) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.

- 7) Bloqueo de anticuerpos inespecíficos con blotto (leche descremada en polvo al 5% en PBS + tritón al 1%) durante 30 minutos.
- 8) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 9) Primer anticuerpo anti-PCNA, anticuerpo monoclonal de ratón (Enzo Diagnostic) 1:50, en cámara húmeda a 4° C durante 24 horas.
- 10) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 11) Segundo anticuerpo (Vectastain ABC elite kit-6200, Vector) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- 12) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 13) Tercer anticuerpo (Vectastain ABC elite kit-6200, Vector) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- 14) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 15) Revelado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Vector).
- 16) Coloración de contraste nuclear con verde de metilo al 1% en acetato de sodio, durante 5 minutos.
- 17) Deshidratación en una serie creciente de alcoholes, (70°, 90°, 96° y 100°) de 10 minutos en cada uno.
- 18) Baño de alcohol/xilol de 10 minutos.
- 19) Dos baños de xilol de 20 minutos cada uno
- 20) Montaje con DPX.

Fundamento: El PCNA es una proteína accesoria de la DNA polimerasa, esencial para la síntesis del DNA y su síntesis alcanza el máximo durante la fase S del ciclo celular. El anticuerpo PC10 puede utilizarse como un indicador de la proliferación celular que reacciona con PCNA de todas las especies vertebradas y colorea las células en proliferación en un amplio rango de tejido.

Se realizó el control positivo en cortes de tejido de intestino delgado y para el control negativo se realizó la técnica convencional en tejido adrenal exceptuando la colocación del primer anticuerpo.

Técnica inmunocitoquímica para la determinación de BrDU (30, 38).

Veinticuatro horas previas al momento del sacrificio (12, 17 y 21 días de la gestación) se realizaron en los grupos correspondientes la inyección intraperitoneal de 5-bromo-2' deoxiuridina (100 mg/kg; Sigma). Posteriormente se siguieron los siguientes pasos:

- 1) desparafinización con dos baños en xilol de 15 minutos cada uno.
- 2) Baño de alcohol/xilol de 10 minutos, seguido de baños en alcoholes en serie decreciente (100°, 96° y 70°) de 10 minutos cada uno.
- 3) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 4) Bloqueo de peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno al 30% durante 30 minutos.
- 6) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 7) Baño de ácido clorhídrico 2N durante 30 minutos en estufa a 37° C.
- 8) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 9) Bloqueo de anticuerpos inespecíficos con suero de caballo (Vector) en cámara húmeda durante 30 minutos.
- 10) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 11) Primer anticuerpo anti-BrDU, anticuerpo monoclonal de ratón (NCL-BrDU. Novocastra) 1/200 durante 24 horas a 4° C en cámara húmeda.
- 12) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 13) Segundo anticuerpo (Vectastain ABC elite kit-6200, Vector) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- 14) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 15) Tercer anticuerpo (Vectastain ABC elite kit-6200, Vector) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- 14) Dos baños con PBS de 10 minutos cada uno.
- 15) Revelado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Vector).
- 16) Coloración de contraste nuclear con verde de metilo al 1% en acetato de sodio, durante 5 minutos.
- 17) Deshidratación en una serie creciente de alcoholes, (70°, 90°, 96° y 100°) de 10 minutos en cada uno.
- 18) Baño de alcohol/xilol de 10 minutos.

19) Dos baños de xilol de 20 minutos cada uno.

19) Montaje con DPX.

Fundamento: La BrDU es un análogo de la timidina que se introduce en las células proliferantes en el DNA durante la fase S, previo a la división celular. La coloración inmunocitoquímica es un método apropiado para medir la proliferación celular y detectar núcleos celulares de diferentes especies animales, los cuales incorporan BrDU en remplazo de timidina en su DNA.

Se realizó el control positivo en cortes de tejido de intestino delgado y para el control negativo se realizó la técnica convencional en tejido adrenal exceptuando la colocación del primer anticuerpo.

Técnica de Microscopía Electrónica ⁽³⁰⁾.

Se obtuvieron bloques de 1mm³ de grosor de tejido adrenal de las RC y RE en cada una de las tres edades de gestación (6 muestras en total).

1) Fijación con glutaraldehído bufferado al 4% durante 1 hora a 4° C.

2) Lavado en buffer cacodilato pH 7,4 por 20 minutos.

3) Postfijación con OsO₄ al 1% durante 1 hora a 4° C.

4) Tres lavados con buffer cacodilato de 10 minutos cada uno.

5) Deshidratación con acetona en distintas concentraciones: al 30% 15 minutos, al 50%, 70% y 90% 10 minutos cada uno y dos baños al 100% de 30 minutos cada uno.

6) Impregnación en acetona al 100% y resina epoxi (EPON 812) 1:1 por 18 horas a 4° C.

7) Inclusión en EPON 812 y polimerización a 60 °C durante 72 horas.

Posteriormente, se realizaron cortes gruesos de 1 um coloreados con azul de toluidina para identificación de las zonas. Se seccionó con ultramicrotomo Porter Blumm Sorval MT1-A, y las grillas montadas se contrastaron con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo. Se observaron con microscopio electrónico Jeol JEM 1200 EX II. del I.N.T.A. Córdoba y se realizó la documentación microfotográfica.

Análisis Estereológico de Imágenes.

Levantamiento de Imágenes crudas y Procesamiento de Imágenes.

Se clasificó cada portaobjeto y se establecieron criterios para evitar la superposición de planos e imágenes del objeto de estudio.

De cada corte histológico de la corteza adrenal se digitalizaron de 10 a 12 imágenes de las zonas glomerular, fascicular y reticular, constituyéndose un banco de imágenes crudas de las RC y RE que fueron guardadas en CD-ROM. Para ello se usó un microscopio Zeiss Axiophot de investigación con cámara digital AxioVision Zeiss y software asociados, video-Printer Sony 3000 acoplados a microscopio Olympus; Software de análisis estereológico de Imágenes Scion.

Se procesó cada una de las imágenes cuantificando las células marcadas positivamente con el anticuerpo anti-caspasa 3 activada (en proceso de apoptosis) y las células no marcadas con este anticuerpo (contrastadas con verde de metilo). Se obtuvo el índice apoptótico (IA) como el cociente entre células apoptóticas y células normales y se multiplicó por 100.

Asimismo, se cuantificaron las células marcadas en forma positiva con los anticuerpos anti- PCNA y anti- BrDU, (en proceso de proliferación) y las células contrastadas con verde de metilo. Posteriormente, se obtuvo el índice de proliferación celular (IPC) como el cociente entre células proliferantes y células normales y se multiplicó por 100.

Los datos obtenidos en la cuantificación se transfirieron a una base de datos usando el programa Excel para ser analizados estadísticamente.

Documentación Microfotográfica.

Se documentaron algunos campos de las glándulas adrenales para comprobar el fenómeno apoptótico y proliferativo mediante microfotografías obtenidas con fotocámara digital incorporada a microscopio Zeiss de campo claro.

Análisis Estadístico.

Se utilizó el Software InfoStat con la nueva versión que permite el ajuste de modelos mixtos y el SAS 9.1.

Se realizó un análisis descriptivo exploratorio para estudiar el comportamiento del IA y del IPC. Para la comparación de medias entre los grupos RC y RE se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Se utilizó ANOVA de tres vías para evaluar el efecto de tratamiento, día de gestación y zona de la corteza adrenal y sus interacciones. Para esto, las variables IA e IPC fueron transformadas a logaritmo. También se trabajó con la distribución de Poisson de un modelo logarítmico lineal con efecto de grupo, tiempo e interacciones. Las diferencias fueron consideradas significativas si $p < 0.05$ ⁽¹²¹⁾.

R E S U L T A D O S

Capítulo 3

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1: EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA APOPTOSIS EN LA CORTEZA ADRENAL DE RATAS GESTANTES.

Análisis cualitativo

Las células de la corteza adrenal positivas a caspasa 3 activada se presentaron en mayor proporción en las zonas fascicular y reticular, siendo muy escasas en la zona glomerular en los tres días de la gestación estudiados (Figuras 7 y 8).

Tanto en las RC como en las RE las células positivas a caspasa 3 activada se observaron en mayor proporción a los 12 días de la gestación y fueron disminuyendo a medida que progreso la gestación.

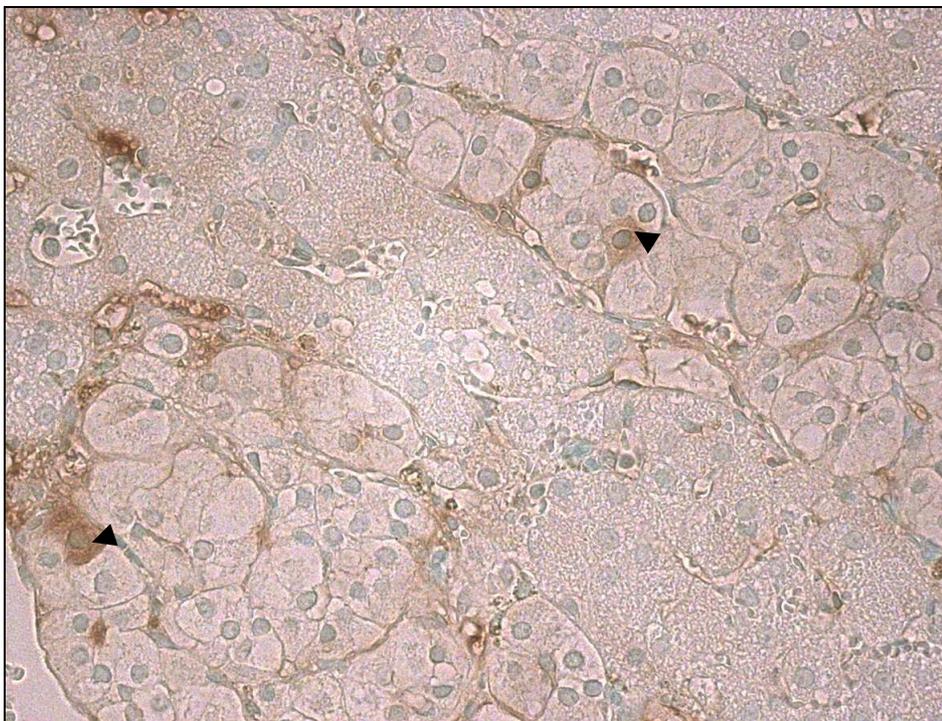


Figura 7: Microfotografía óptica de las zonas fascicular y reticular de la corteza adrenal de rata control de 12 días de gestación con caspasa 3 activada y verde de metilo (400x).

Las flechas indican células inmunomarcadas con caspasa 3 activada.

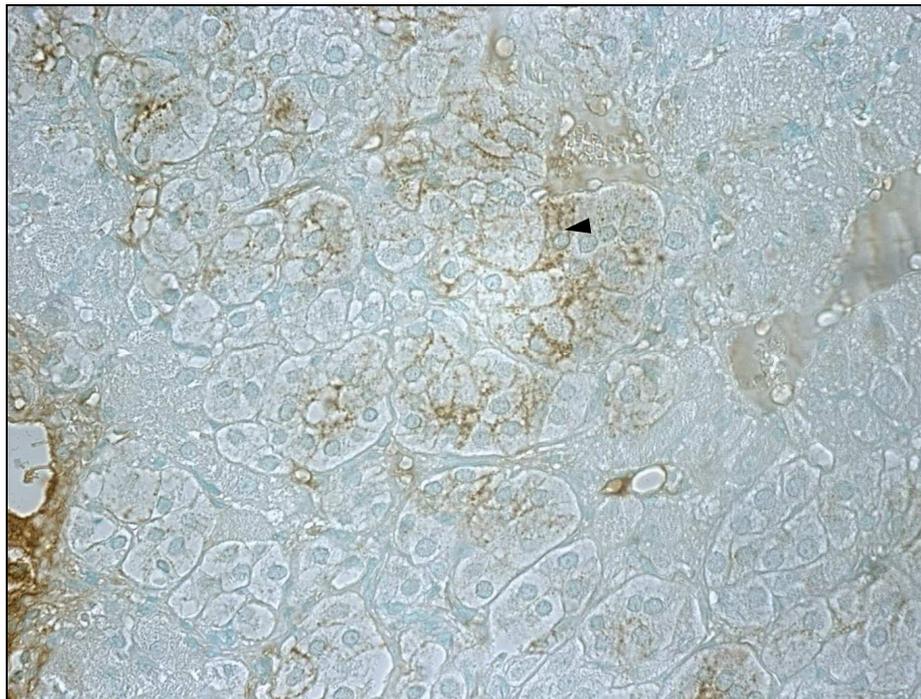


Figura 8: Microfotografía óptica de las zonas fascicular y reticular de la corteza adrenal de una ratona estresada a los 12 días de gestación con caspasa 3 activada y verde de metilo (400x).

La flecha indica células inmunomarcadas con caspasa 3 activada.

Resultados Estadísticos

1- Índice apoptótico en la corteza adrenal de ratas gestantes.

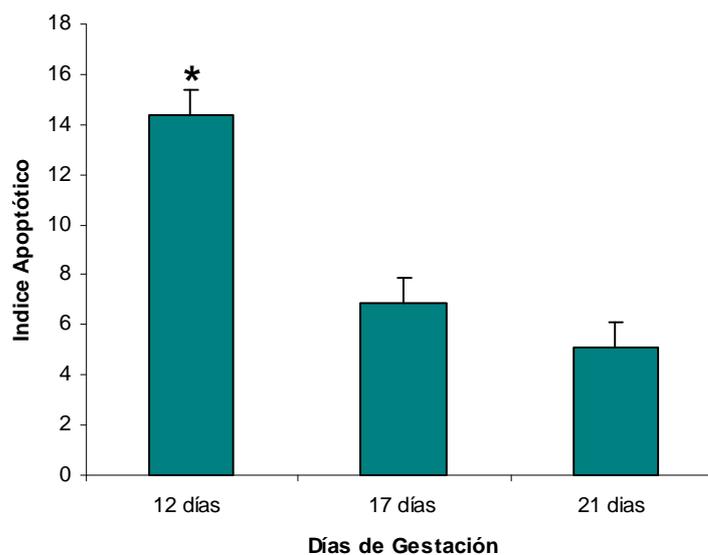


Figura 9. Índice apoptótico en la corteza adrenal de ratas control.

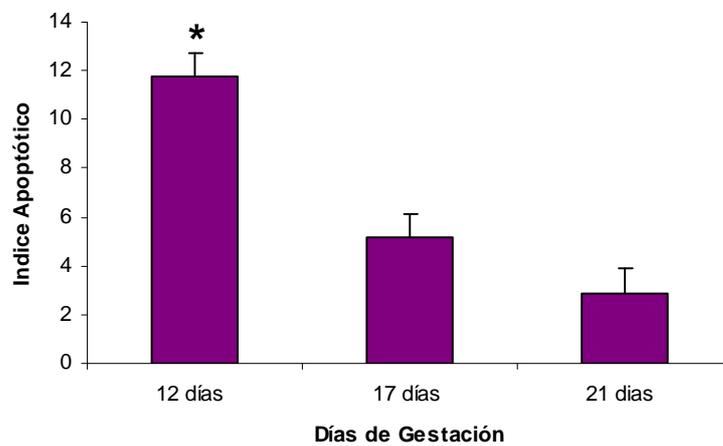


Figura 10. Índice apoptótico en la corteza adrenal de ratas estresadas.

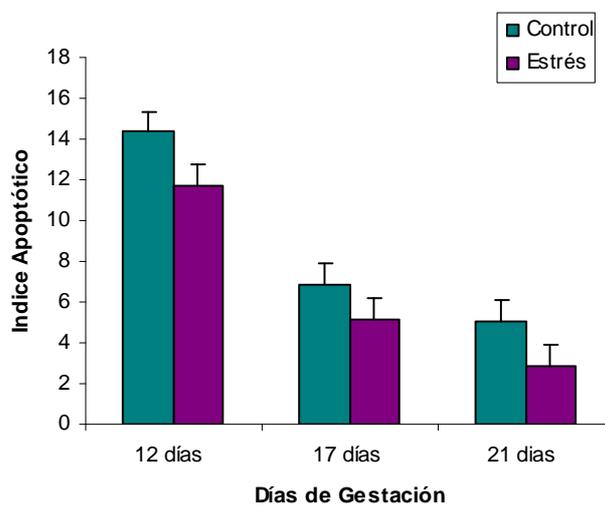


Figura 11. Interacción del tratamiento y día de gestación sobre el índice apoptótico.

Los resultados obtenidos evidenciaron que el IA se comportó de la misma forma en las RC y RE; disminuyó a medida que progresó la gestación. Se presentaron

diferencias significativas del IA entre los días 12 vs.17 y 12 vs. 21 ($p<0.05$) en ambos grupos. No se presentaron diferencias entre los días 17 y 21 días de la gestación (figuras 9 y 10).

No se evidenció interacción significativa en el IA con el tratamiento y el día de la gestación (figura 11).

2. Índice apoptótico en cada zona de la corteza adrenal de ratas gestantes.

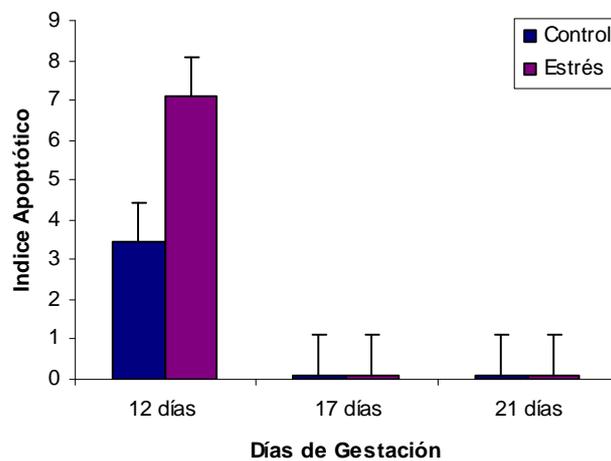


Figura 12. Índice apoptótico de la zona glomerular de ratas gestantes.

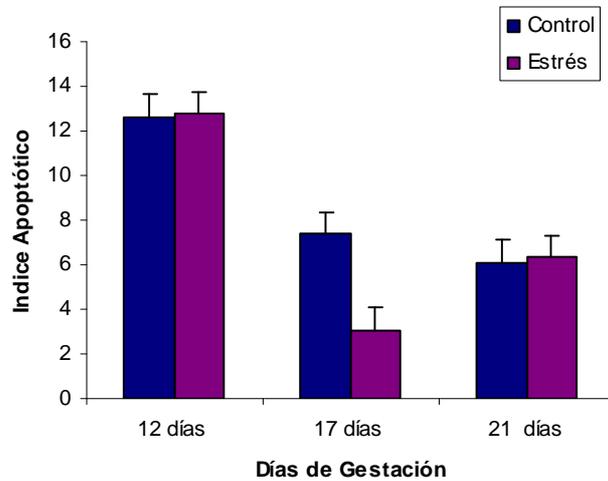


Figura 13. Índice apoptótico de la zona fascicular de ratas gestantes.

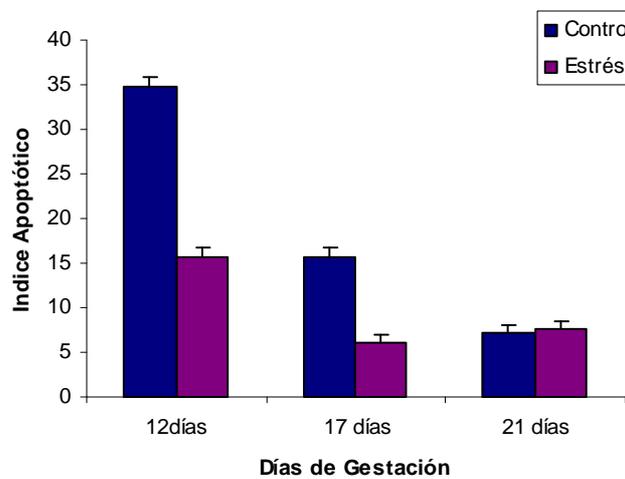


Figura 14. Índice apoptótico de la zona reticular de ratas gestantes.

Los resultados obtenidos evidenciaron que no se presentaron diferencias significativas en el IA en la zona glomerular (figura 12), fascicular (figura 13) y reticular (figura 14) de las RC y RE en ninguna de las tres edades estudiadas.

3. Índice apoptótico en las diferentes zonas de la corteza adrenal de ratas gestantes.

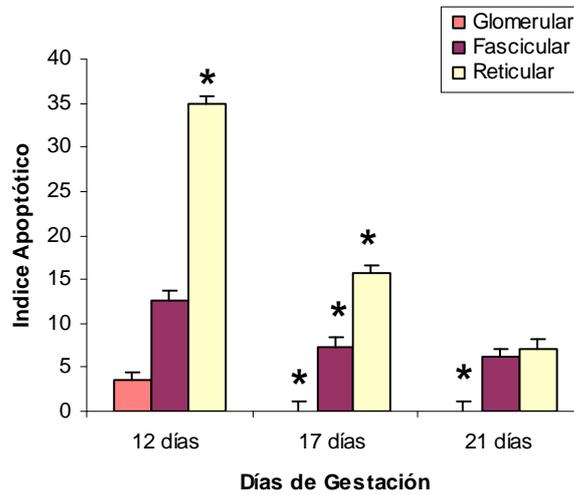


Figura 15. Índice apoptótico en la corteza adrenal de RC gestantes.

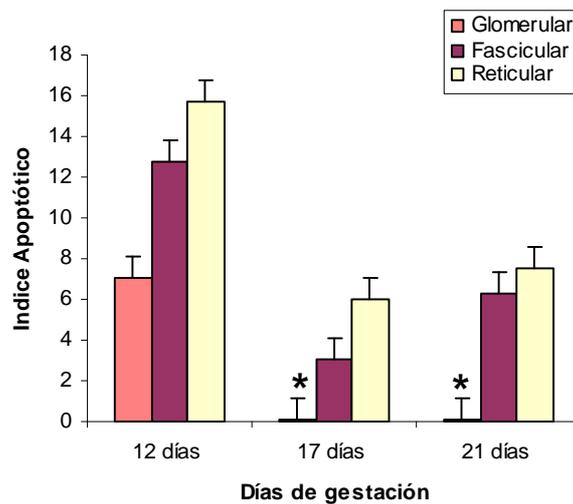


Figura 16. Índice apoptótico en la corteza adrenal de RE gestantes.

Los resultados obtenidos evidenciaron que en las RC el IA se incrementa desde la zona glomerular hasta la reticular, donde alcanza los valores más elevados.

En el día 12 el IA de la zona reticular fue significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto a las zonas fascicular y glomerular, mientras que estas dos últimas zonas no presentaron diferencias significativas entre sí. En el día 17 el IA presentó diferencias significativas entre las tres zonas de la corteza adrenal y en el día 21 el IA de la zona glomerular fue significativamente menor ($p < 0.05$) con respecto a las dos zonas restantes, sin encontrarse diferencias significativas entre las zonas fascicular y reticular (figura 15).

En las RE el IA se incrementa desde la zona glomerular y presenta los valores más elevados en la zona reticular. En el día 12 el valor del IA entre las tres zonas no presentó diferencias significativas. Mientras que en el día 17 y 21 el IA de la zona glomerular fue significativamente menor ($p < 0.05$) con respecto a las dos zonas restantes. No se presentaron diferencias significativas entre las zonas fascicular y reticular (figura 16).

4. Interacción de la zona y el tratamiento sobre el índice apoptótico en 12, 17 y 21 días de gestación.

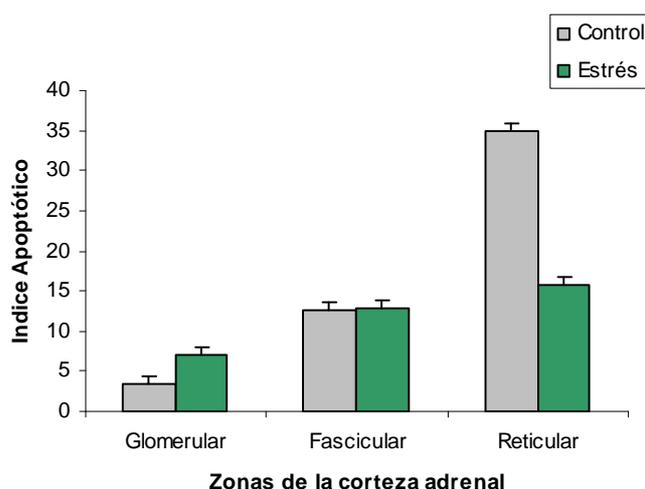


Figura 17. Índice apoptótico en la corteza adrenal de ratas de 12 días de gestación.

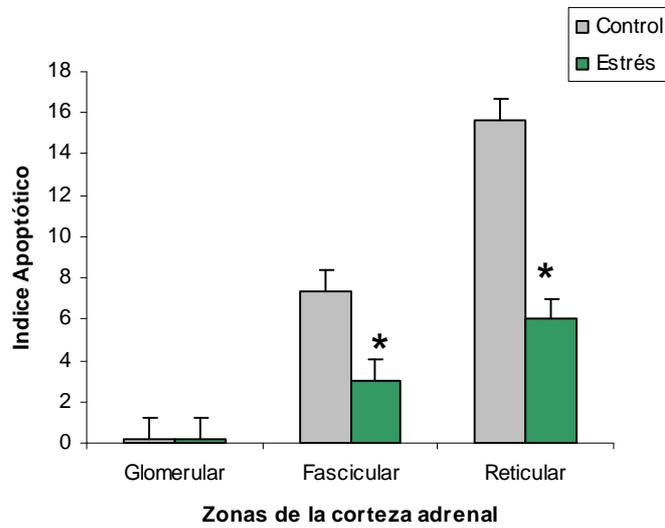


Figura 18. Índice apoptótico en la corteza adrenal de ratas de 17 días de gestación.

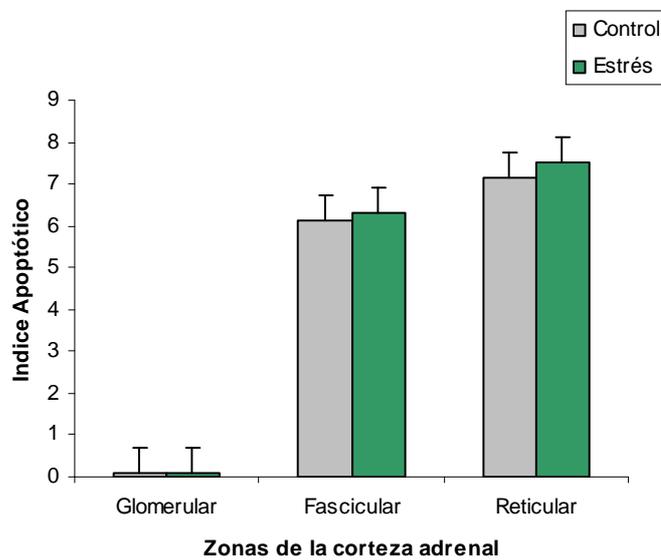


Figura 19. Índice apoptótico en la corteza adrenal de ratas de 21 días de gestación.

Los resultados obtenidos evidenciaron que en el día 12 y 21 de la gestación no hubo interacción entre la zona y el tratamiento sobre el IA (figuras 17 y 19).

En el día 17 de la gestación hubo interacción entre la zona fascicular y reticular con el tratamiento estrés sobre el IA. El IA de las RE fue significativamente menor con respecto a las RC (figura 18).

EXPERIMENTO 2: EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN LA CORTEZA ADRENAL DE RATAS GESTANTES CON LA TÉCNICA DE PCNA.

Análisis Cualitativo

Los núcleos marcados con PCNA se distribuyeron en las tres zonas de la corteza adrenal siendo más abundante su presencia en las zonas glomerular y fascicular (Figuras 20 y 21).

A los 12 y 17 días de la gestación los núcleos marcados con PCNA se observaron en menor proporción en las RE. Mientras que a los 21 días se distribuyeron en forma uniforme en ambos grupos.

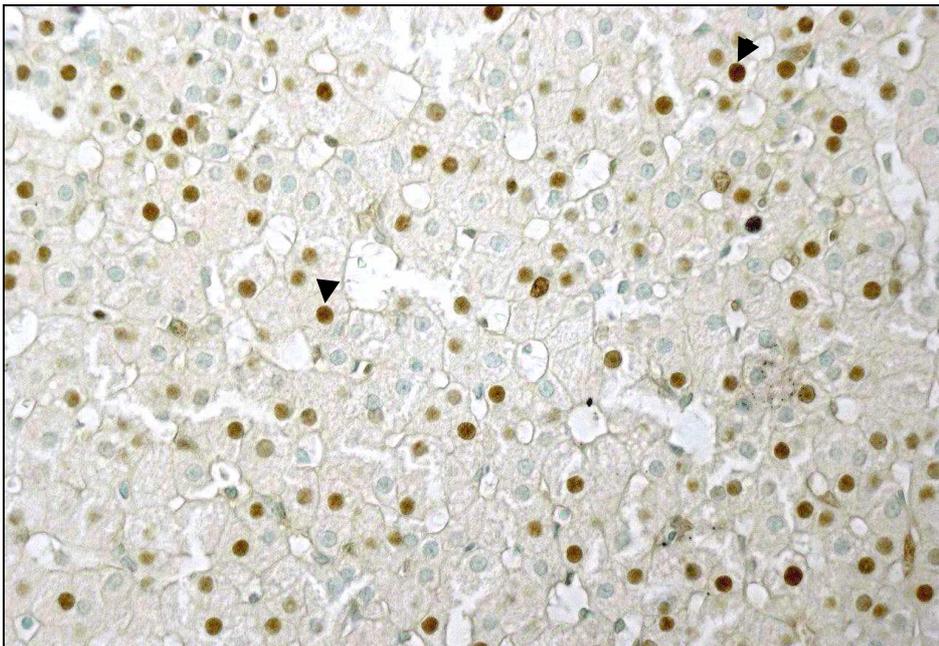


Figura 20. Microfotografía óptica de las zonas glomerular y fascicular de la corteza adrenal de rata control de 17 días de gestación con PCNA y verde de metilo (400x).

Las flechas indican núcleos inmunomarcados con PCNA.

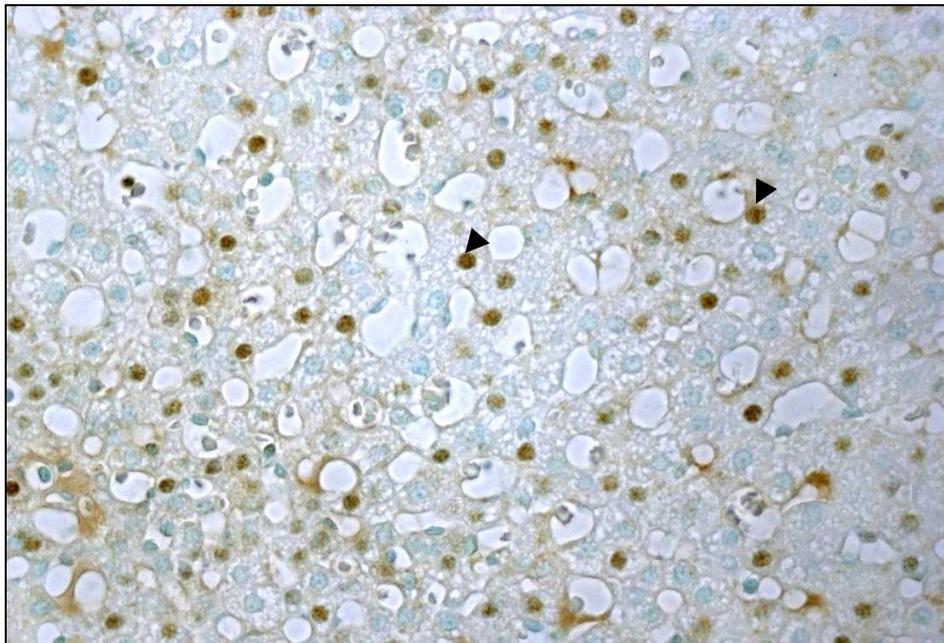


Figura 21. Microfotografía óptica de la zona fascicular de la corteza adrenal de una ratona estresada a los 17 días de gestación con PCNA y verde de metilo (400x).

Las flechas indican núcleos inmunomarcados con PCNA.

Resultados estadísticos.

5. Índice de proliferación en la corteza adrenal de ratas gestantes.

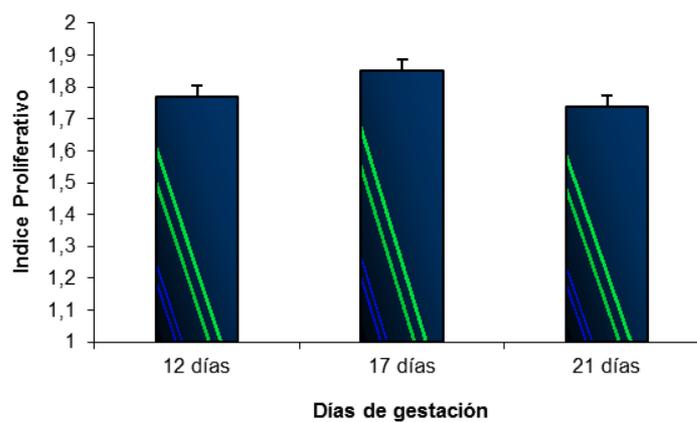


Figura 22. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas controladas.

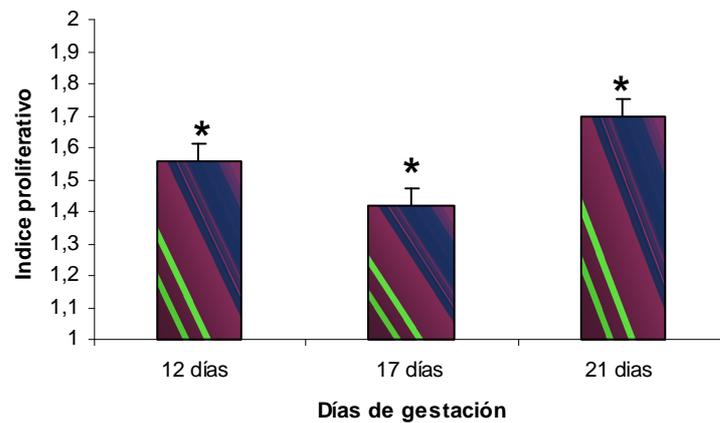


Figura 23. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas estresadas.

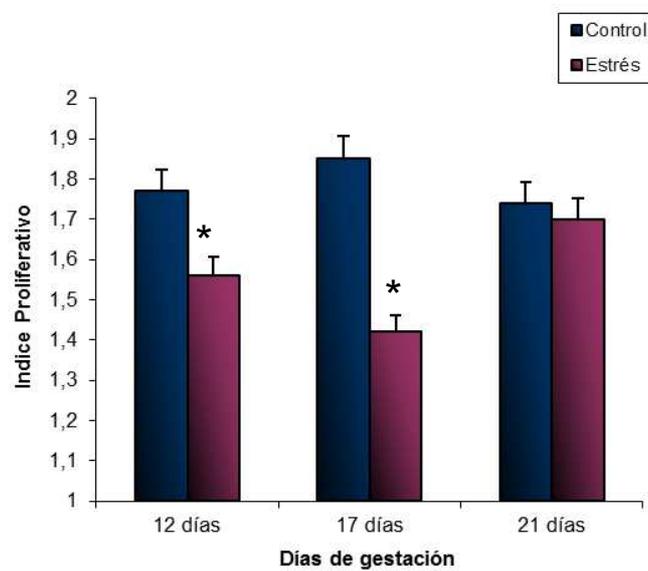


Figura 24. Interacción del tratamiento y día de gestación sobre el índice proliferativo.

Los resultados obtenidos evidenciaron que el IP en las RC no presentó diferencias significativas en ninguno de los tres días de la gestación estudiados (figura 22). En las RE el IP presentó diferencias significativas en los días 12 y 17 vs. el día 21

($p < 0.05$). No se presentaron diferencias entre los días 12 y 17 de la gestación (figura 23).

Los resultados obtenidos evidenciaron que se presentó interacción entre el tratamiento y día de gestación, siendo significativa ($p < 0.001$) en los días 12 y 17. Mientras que en el día 21 no se presentó interacción (figura 24).

6. Índice proliferativo en cada zona de la corteza adrenal de ratas gestantes.

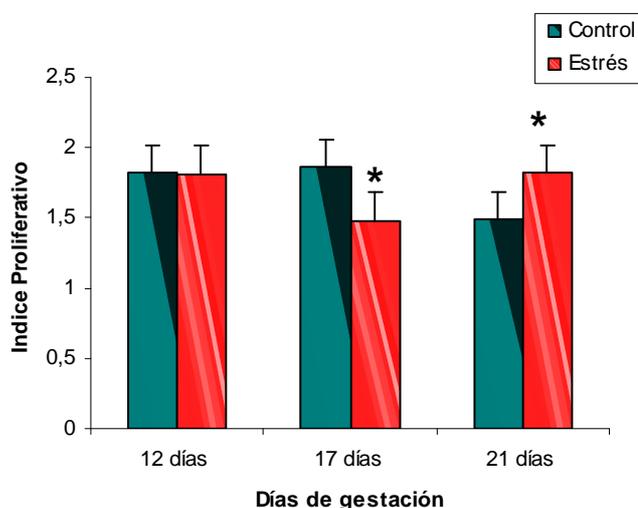


Figura 25. Índice proliferativo en la zona glomerular de ratas gestantes.

Los resultados obtenidos evidenciaron que el IP se comportó de diferente manera a lo largo de la gestación. A los 12 días no hubo diferencias significativas en la zona glomerular de las RC y las RE. Mientras que a los 17 días el IP de las RE presentó una disminución significativa con respecto a las RC y a los 21 días el IP de las RE presentó un aumento significativo con respecto a las RC (figura 25).

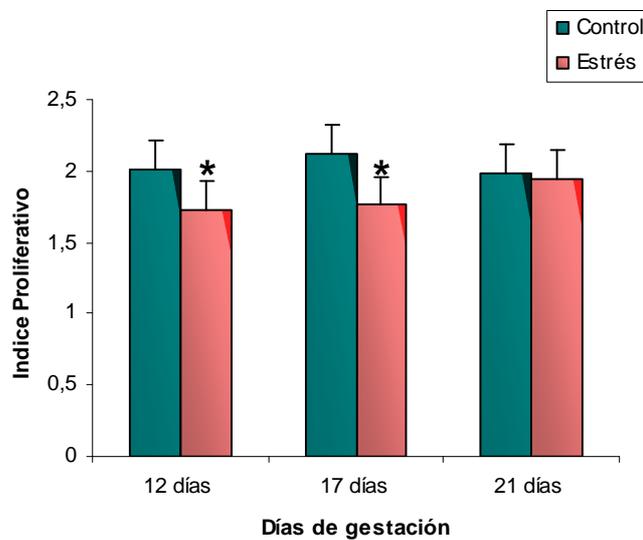


Figura 26. Índice proliferativo en la zona fascicular de ratas gestantes.

Los resultados obtenidos evidenciaron que a los 12 y 17 días el IP presentó una disminución significativa en la zona fascicular de las RE con respecto a las RC mientras que a los 21 días no hubo diferencias entre ambos grupos (figura 26).

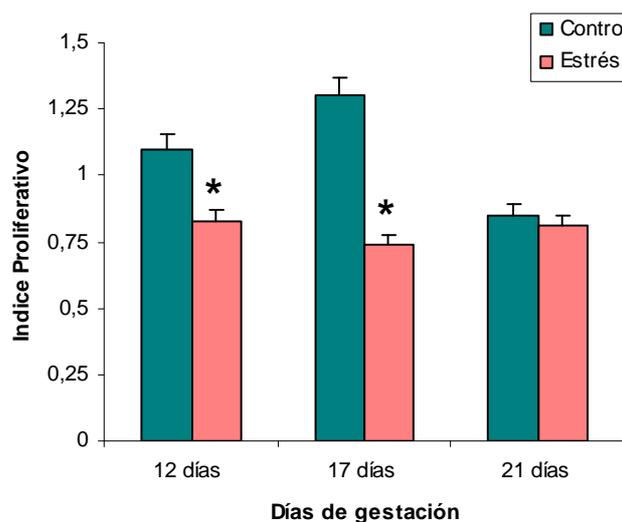


Figura 27. Índice proliferativo en la zona reticular de ratas gestantes.

Los resultados obtenidos evidenciaron que a los 12 y 17 días el IP de las RE presentó una disminución significativa con respecto a las RC, mientras que a los 21 días no hubo diferencias significativas en la zona reticular de las RC y las RE (figura 27).

7. Índice proliferativo en las diferentes zonas de la corteza adrenal de ratas gestantes.

Los resultados obtenidos evidenciaron que en las RC y las RE el IP de la zona reticular presentó una disminución significativa ($p < 0.001$) con respecto a las zonas glomerular y fascicular en los tres días de la gestación (figuras 28 y 29).

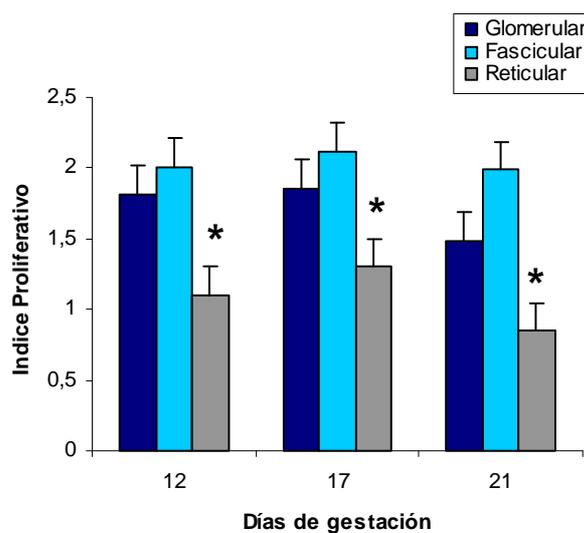


Figura 28. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas controles gestantes.

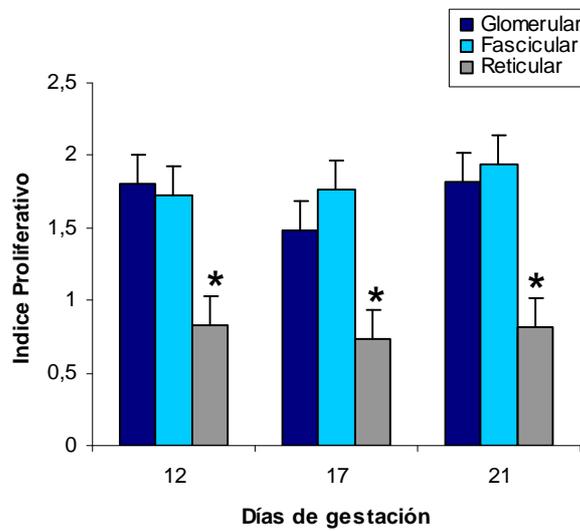


Figura 29. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas estresadas gestantes.

8. Interacción de la zona y el tratamiento sobre el índice proliferativo en 12, 17 y 21 días de gestación.

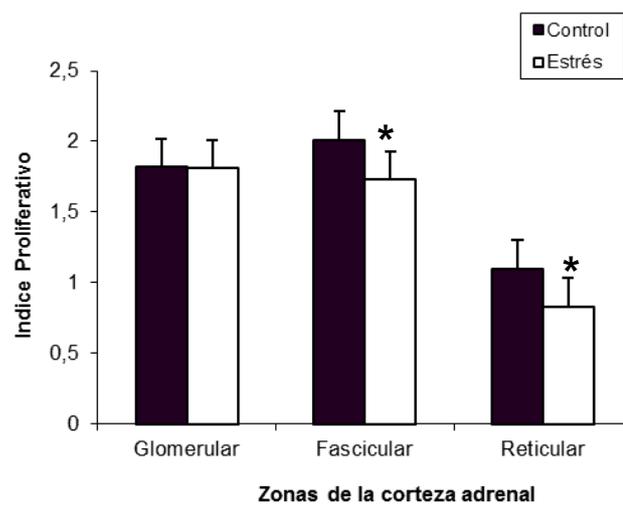


Figura 30. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas de 12 días de gestación.

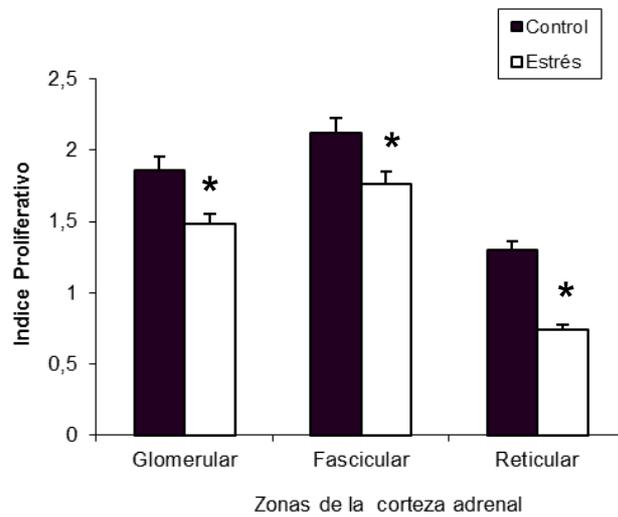


Figura 31. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas de 17 días de gestación.

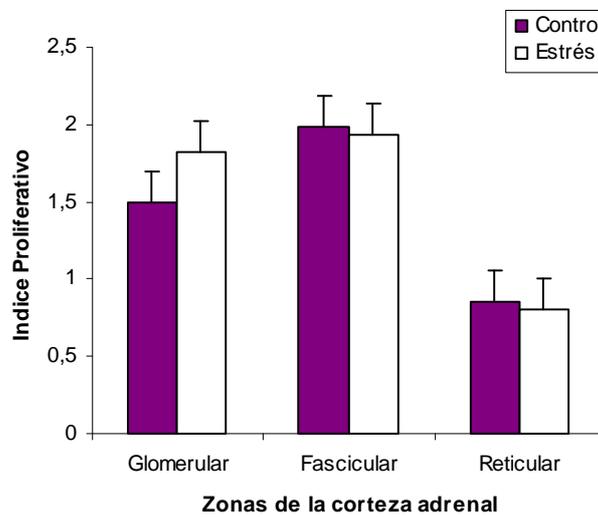


Figura 32. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas de 21 días de gestación.

Los resultados obtenidos evidenciaron que en el día 12 de gestación hubo interacción entre la zona fascicular y reticular con el tratamiento estrés sobre el IP.

El IP de las RE fue significativamente menor con respecto a las RC (figura 30).

En el día 17 de gestación hubo interacción entre la zona glomerular, fascicular y reticular con el tratamiento estrés sobre el IP. El IP de las RE fue significativamente menor con respecto a las RC (figura 31).

En el día 21 de la gestación no hubo interacción entre las zonas de la corteza adrenal con el tratamiento estrés sobre el IP (figura 32).

EXPERIMENTO 3: EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN LA CORTEZA ADRENAL DE RATAS GESTANTES MEDIANTE LA TÉCNICA DE BrDU.

Análisis Cualitativo

Teniendo en cuenta que en material y métodos se propuso dos grupos (uno estrés y otro control sin inyección de BrDU); se realizó una prueba de dos preparados de cada grupo con la aplicación del anticuerpo anti-BrDU para determinar si la inyección provocaba alguna alteración ocasionada por el estrés, dando ambos resultados negativos.

Los núcleos marcados con BrDU se presentaron en mayor proporción en las zonas glomerular y fascicular, siendo más escasos en la zona reticular en los tres días de la gestación estudiados, y al igual que con PCNA, su distribución fue menor en las RE.

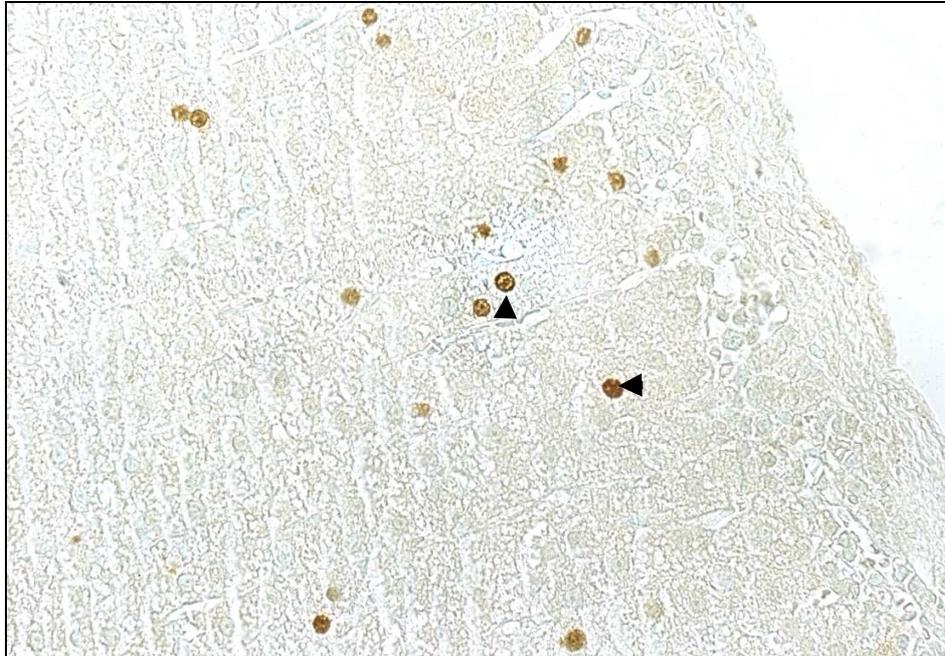


Figura 33. Microfotografía óptica de las zonas glomerular y fascicular de la corteza adrenal de rata control de 12 días de gestación con BrDU y verde de metilo (400x).

Las flechas indican núcleos inmunomarcados con BRdU.



Figura 34. Microfotografía óptica de las zonas glomerular y fascicular de la corteza adrenal de ratona estresada de 12 días de gestación con BrDU y verde de metilo (400x).

Las flechas indican núcleos inmunomarcados con BRdU.

Resultados estadísticos

9. Índice de proliferación en la corteza adrenal de ratas gestantes.

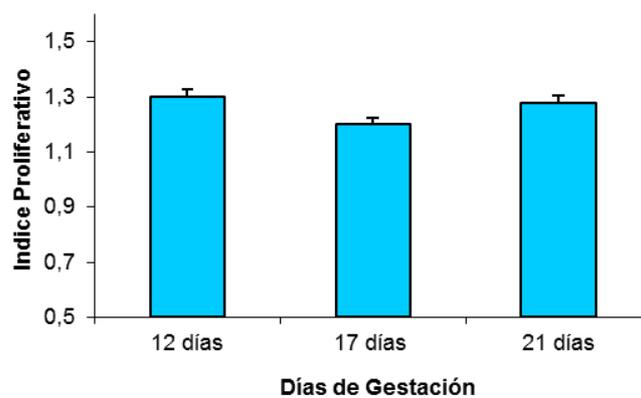


Figura 35. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas controlas.

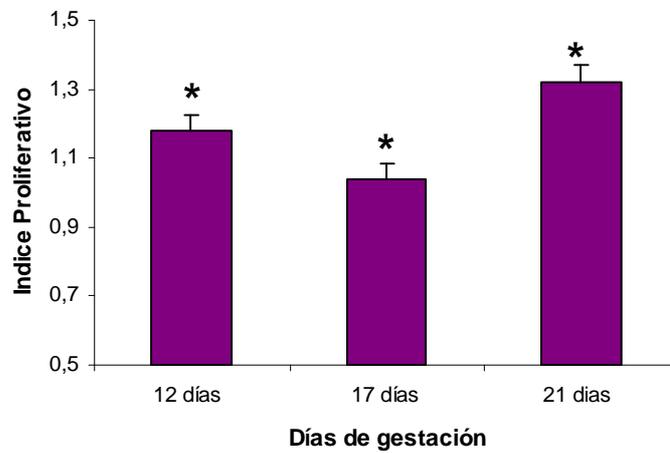


Figura 36. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas estresadas.

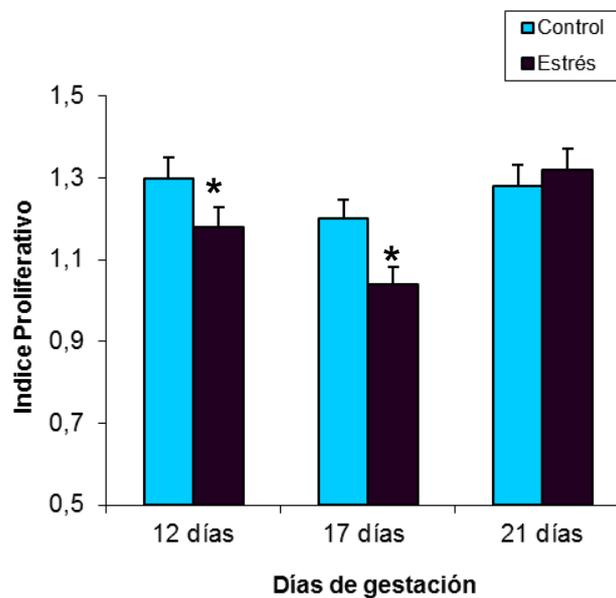


Figura 37. Interacción del tratamiento y día de gestación sobre el índice proliferativo.

Los resultados obtenidos evidenciaron que el IP en las RC no presentó diferencias significativas en ninguno de los tres días de la gestación (figura 35). Mientras que

en las RE el IP presentó diferencias significativas en los tres días de la gestación. En el día 17 se encontró los menores valores de IP y en el día 21 se presentaron los valores más elevados (figura 36).

Se presentó interacción entre el tratamiento y el día de la gestación, siendo significativa ($p < 0.001$) en los días 12 y 17. Mientras que en el día 21 no hubo interacción (figura 37).

10. Índice proliferativo en cada zona de la corteza adrenal de ratas gestantes.

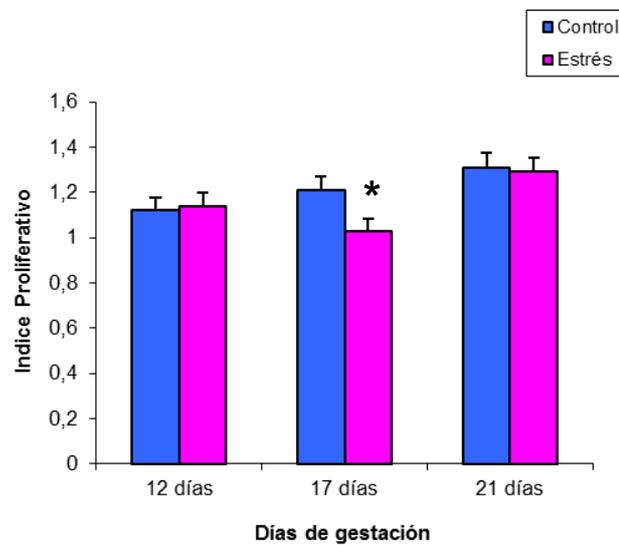


Figura 38. Índice proliferativo en la zona glomerular de ratas gestantes.

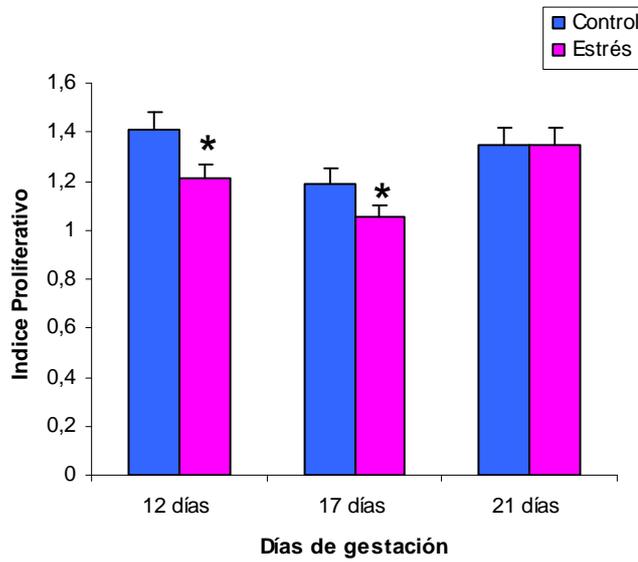


Figura 39. Índice proliferativo en la zona fascicular de ratas gestantes.

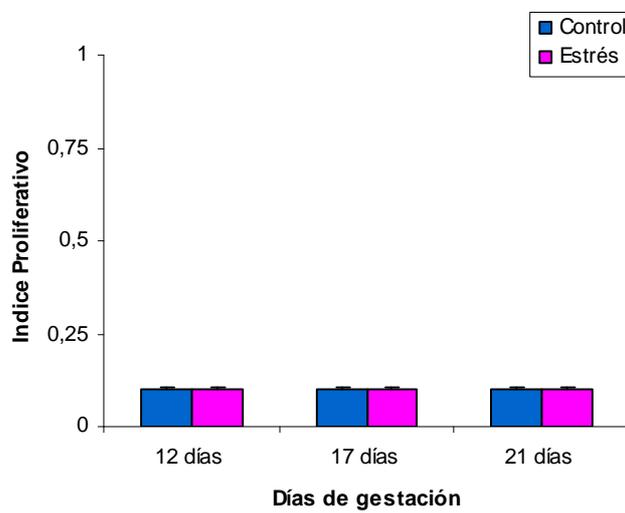


Figura 40. Índice proliferativo en la zona reticular de ratas gestantes.

Los resultados obtenidos evidenciaron que a los 12 y 21 días no hubo diferencias en la zona glomerular de las RC y las RE. Mientras que a los 17 días el IP de las RE presentó una disminución significativa con respecto a las RC (figura 38).

El IP se comportó de diferente manera a lo largo de la gestación, a los 12 y 17 días presentó una disminución significativa en la zona fascicular de las RE con respecto a las RC, mientras que a los 21 días no hubo diferencias entre ambos grupos (figura 39).

El IP de la zona reticular no presentó diferencias significativas entre las RC y las RE en ninguno de los tres días de la gestación estudiados (figura 40).

11. Índice proliferativo en las diferentes zonas de la corteza adrenal de ratas gestantes.

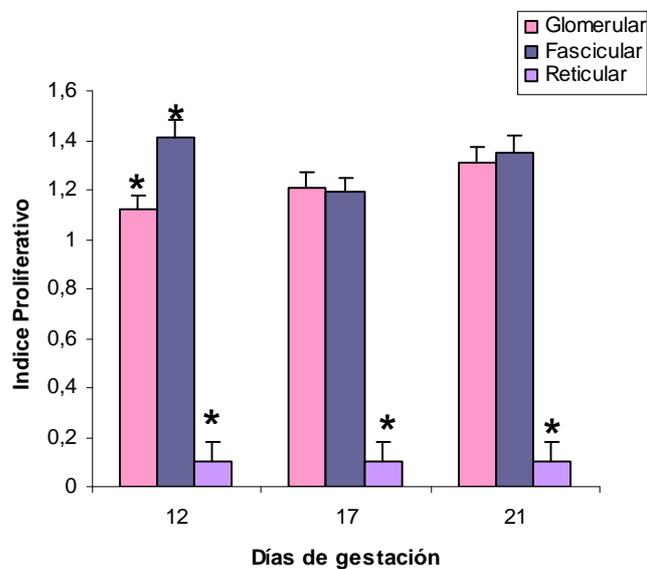


Figura 41. Índice proliferativo en corteza adrenal de ratas controles gestantes.

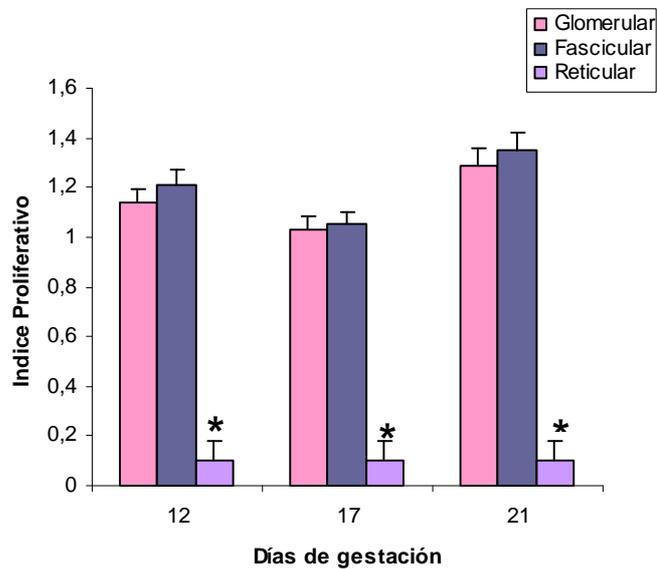


Figura 42. Índice proliferativo en corteza adrenal de ratas estresadas gestantes.

Los resultados obtenidos evidenciaron que en las RC en el día 12 el IP presentó diferencias significativas entre las tres zonas de la corteza adrenal. Mientras que en el día 17 y 21 el IP de la zona reticular fue significativamente menor ($p < 0.001$) con respecto a las zonas glomerular y fascicular. Estas dos últimas zonas no presentaron diferencias significativas entre sí (figura 41).

En las RE el IP de la zona reticular presentó una disminución significativa ($p < 0.001$) con respecto a las zonas glomerular y fascicular de la corteza adrenal en los tres días de la gestación estudiados (figura 42).

12. Interacción de la zona y el tratamiento sobre el índice proliferativo en 12, 17 y 21 días de gestación.

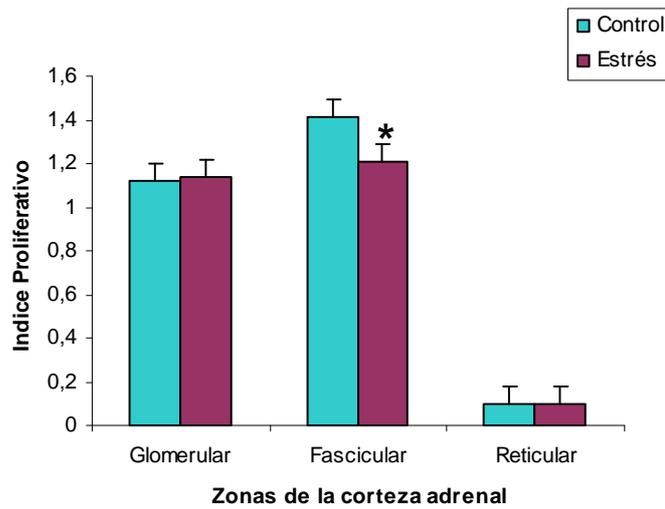


Figura 43. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas de 12 días de gestación.

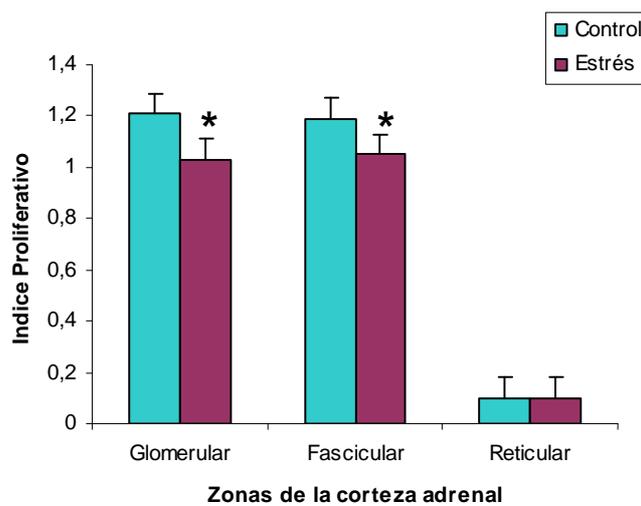


Figura 44. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas de 17 días de gestación.

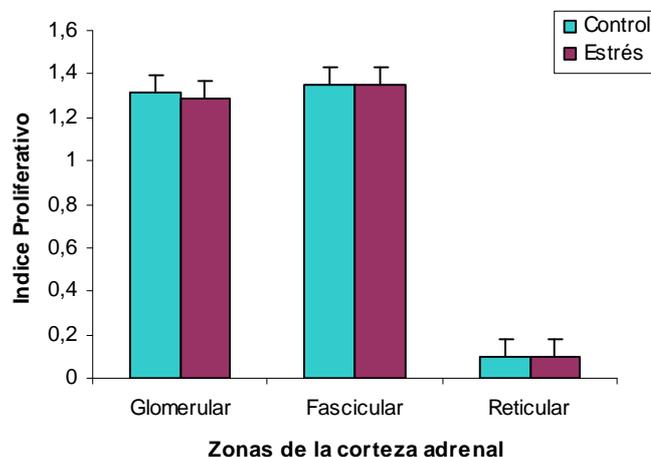


Figura 45. Índice proliferativo en la corteza adrenal de ratas de 21 días de gestación.

Los resultados obtenidos evidenciaron que en el día 12 de la gestación hubo interacción entre la zona fascicular con el tratamiento estrés sobre el IP. El IP de las RE fue significativamente menor con respecto a las RC. En las zonas glomerular y reticular no se presentó interacción con el tratamiento (figura 43).

En el día 17 de la gestación hubo interacción entre las zonas glomerular y fascicular con el tratamiento estrés sobre el IP. El IP de las RE fue significativamente menor con respecto a las RC. En la zona reticular no se presentó interacción con el tratamiento (figura 44).

En el día 21 de la gestación no hubo interacción entre las zonas de la corteza adrenal y el tratamiento sobre el IP (figura 45).

EXPERIMENTO 4: EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA APOPTOSIS EN LA CORTEZA ADRENAL DE RATAS GESTANTES CON LA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Como resultados de la realización del tercer objetivo se obtuvieron las siguientes microfotografías ópticas y electrónicas:

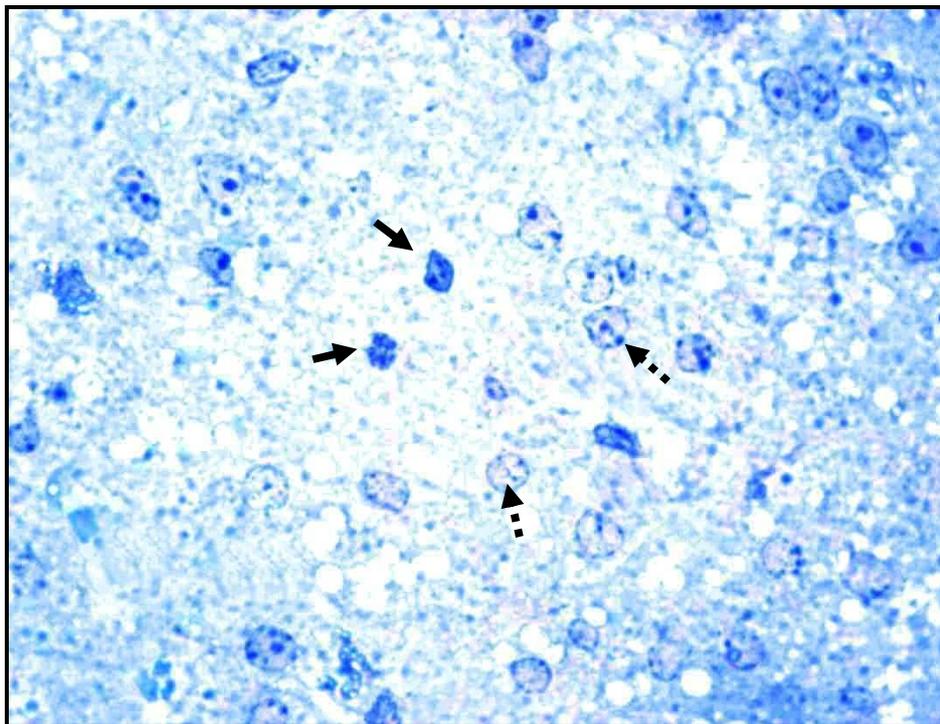


Figura 46. Microfotografía óptica de un corte grueso (1 μ m) de la corteza adrenal de rata control de 12 días de gestación con Azul de Toluidina (750x).

Flechas continuas: núcleos apoptóticos.

Flechas discontinuas: núcleos normales.

Esta microfotografía óptica corresponde a un campo de la corteza adrenal en una región de transición entre las zonas fasciculada y reticular, que muestra las características morfológicas de núcleos celulares normales con distribución homogénea de la eucromatina y heterocromatina, y presencia de nucléolos como así también, núcleos apoptóticos con condensación y fragmentación de la cromatina y picnosis.

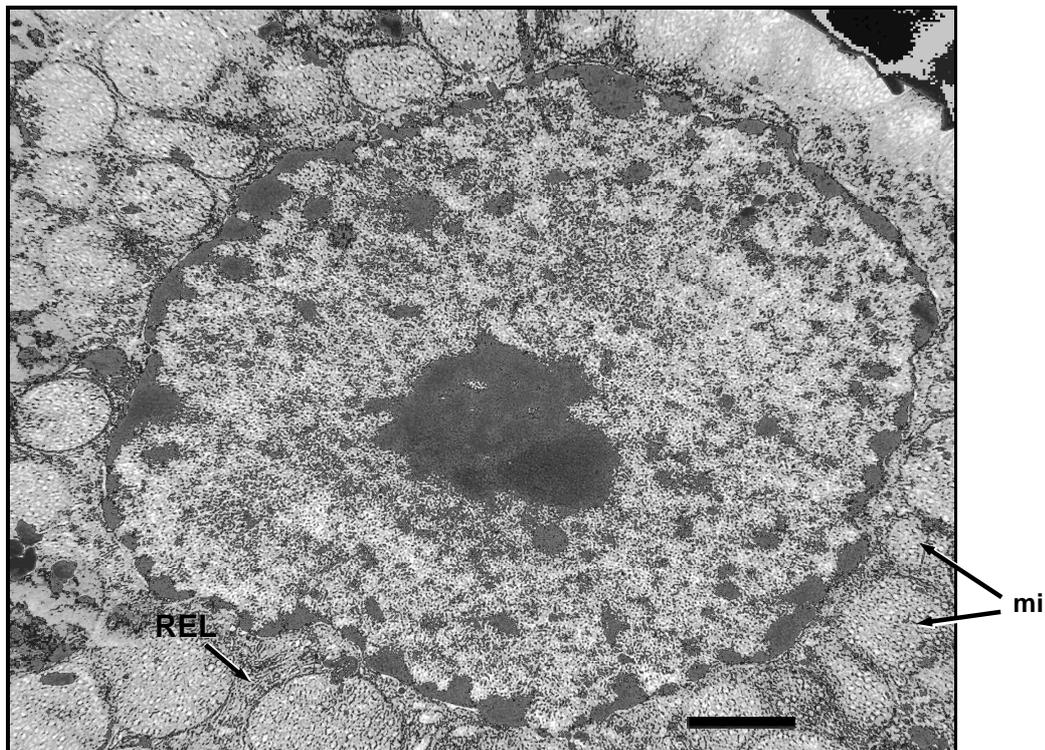


Figura 47. Microfotografía electrónica de un núcleo con características normales de la zona fasciculada de la corteza adrenal de rata control de 17 días. Barra: 1 μ m. (8.000x).

REL: retículo endoplasmático liso
mi: mitocondrias

Microfotografía electrónica de un núcleo normal de una célula de la zona fasciculada de la corteza adrenal, donde se observa distribución hétero y eucromática característica, con integridad de la membrana nuclear y presencia de un nucléolo. El citoplasma es típico de una célula con activa síntesis de esteroides, con abundante retículo endoplasmático liso y mitocondrias.

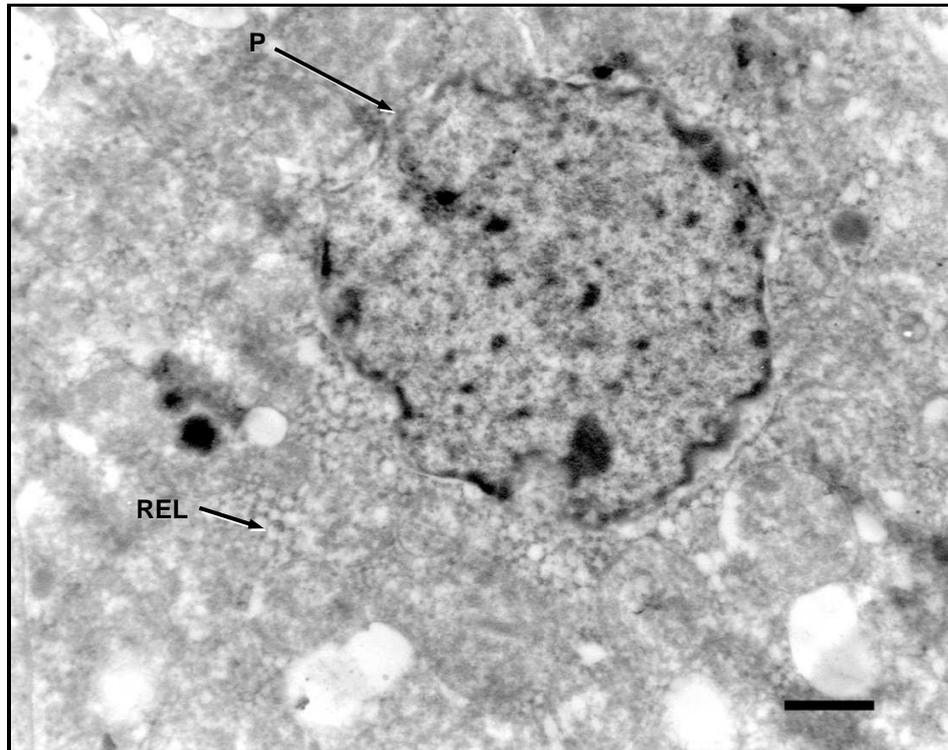


Figura 48. Microfotografía electrónica de un núcleo apoptótico de la zona fasciculada de la corteza adrenal de rata estresada. Barra: 1 μ m. (8.000x).

P: pérdida de integridad de la membrana nuclear

REL: retículo endoplasmático liso

Microfotografía electrónica de un núcleo apoptótico de una célula de la zona fasciculada de la corteza adrenal, donde se observa fragmentación de la cromatina, con pérdida de la integridad y de la morfología de la membrana nuclear. El citoplasma es típico de una célula en activa síntesis de esteroides, con abundante retículo endoplasmático liso y vacuolas de inclusión lipídicas, pero muestra signos de condensación y desorganización general.

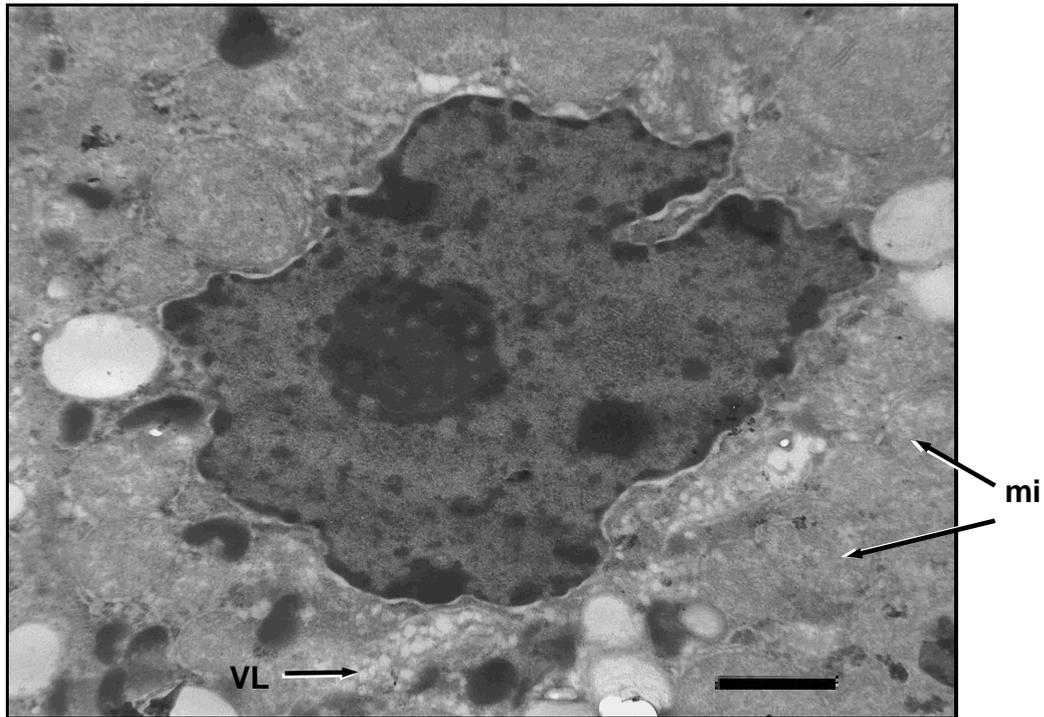


Figura 49. Microfotografía electrónica de un núcleo apoptótico de la zona reticular de la corteza adrenal de rata estresada. Barra: 1 μ m. (8.000x).

mi: mitocondrias

VL: vacuolas lipídicas

En esta microfotografía electrónica se observa un núcleo apoptótico de una célula de la zona reticular que presenta invaginaciones en la membrana nuclear, con áreas de fragmentación de la cromatina. El citoplasma presenta abundantes mitocondrias y vacuolas lipídicas.

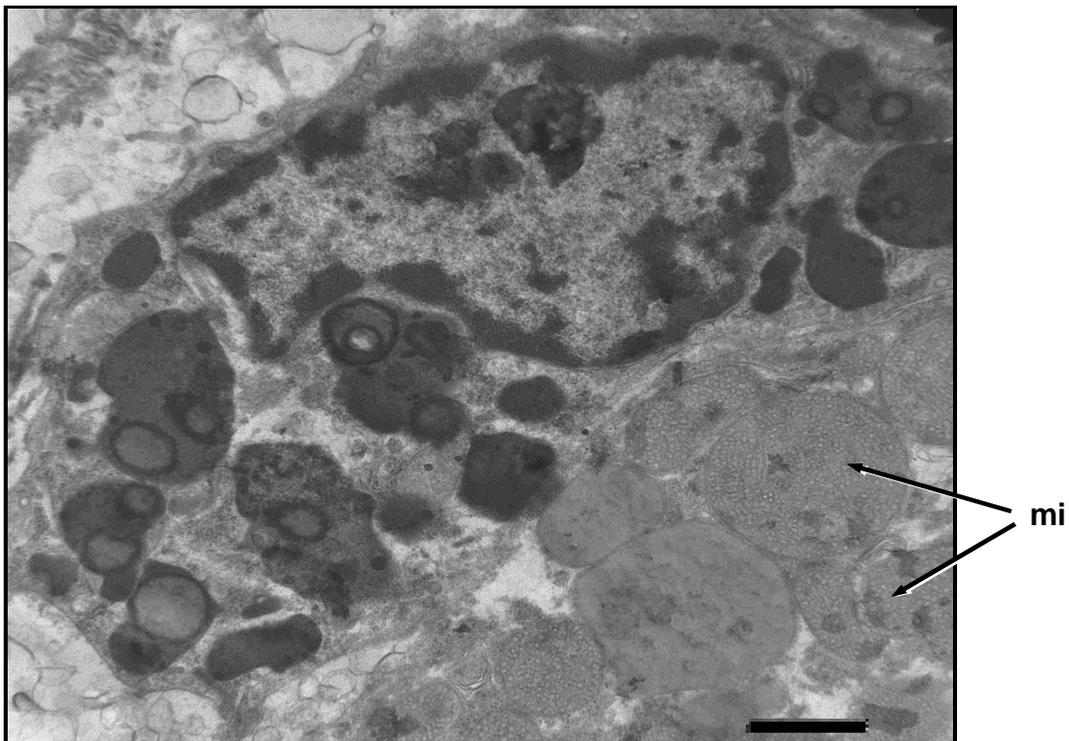


Figura 50. Microfotografía electrónica de macrófago fagocitando cuerpos apoptóticos en la zona reticular de la corteza adrenal de rata control. Barra: 1 μ m. (8.000x).

mi: mitocondrias

En esta microfotografía electrónica se evidencia un macrófago fagocitando cuerpos apoptóticos citoplasmáticos de una célula de la zona reticular de la corteza adrenal. Se observan diferentes organelas y restos nucleares en proceso de autofagocitosis, con integridad de la membrana plasmática. También se observan mitocondrias con vacuolizaciones en su interior.

D I S C U S I Ó N

Capítulo 4

DISCUSIÓN

Respuesta del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en situaciones de estrés.

A lo largo de la vida del individuo, la glándula adrenal responde continuamente a estímulos repetidos y transitorios como las situaciones de estrés. Está bien establecido que las consecuencias fisiológicas y patológicas de la exposición al estrés dependen de las características de la situación estresante, pero también de las diferencias individuales. Entre las primeras, la intensidad de la situación, su duración, los niveles de imprevisibilidad y el grado de control sobre la situación juegan un papel crítico. De este modo, la exposición a eventos de estrés crónico durante períodos como la gestación, pueden desencadenar trastornos de ansiedad, depresión, déficits de atención y desequilibrios hormonales y/o metabólicos; muchos de los cuales están asociados con alteraciones del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal ⁽¹¹¹⁾.

El repertorio de respuestas de la adrenal comprende cambios no sólo en la actividad secretoria de las células existentes, sino también en la actividad trófica. Tal situación se ve reflejada en una disminución de los procesos de apoptosis y de proliferación celular en la corteza adrenal, lo que indicaría que hay un menor grado de recambio celular basal de la glándula. Sin duda, la exposición crónica a elevados niveles plasmáticos de CORT altera la plasticidad celular de la adrenal y de varias áreas cerebrales incluyendo el hipotálamo, provocando alteraciones neuroendócrinas ⁽³¹⁾.

La respuesta al estrés comprende una amplia gama de modificaciones fisiológicas, adquiriendo mayor relevancia las metabólicas y neuroendócrinas. Entre ellas se destacan la activación del eje SMA que da lugar a cambios cardiovasculares y a la liberación de CA; y la activación del eje HHA, responsable de la liberación de GC al torrente sanguíneo. Dado que la activación de estos dos sistemas está en íntima relación con muchas alteraciones fisiológicas y psicológicas, son los sistemas fisiológicos mejores caracterizados ⁽¹¹¹⁾.

Respecto al eje HHA, el procesamiento de la información concerniente a un estímulo estresante particular converge en el PVN donde se localizan neuronas que envían sus axones al sistema portal-hipofisario situado en la eminencia media. Las señales nerviosas promueven la síntesis de CRH y de otros péptidos como la AVP y su liberación al sistema portal-hipofisario, desde donde son conducidos a la adenohipófisis. La CRH estimula la síntesis y la liberación de la ACTH y moléculas derivadas de la POMC, aunque también factores hipotalámicos liberados durante el estrés contribuyen a la liberación de la ACTH. Dentro de los secretagogos de la ACTH, la AVP adquiere especial relevancia, ya que es co-expresada en un subconjunto de neuronas CRH en el PVN y su rol en la inducción de la liberación de la ACTH adquiere importancia después de la estimulación sostenida del eje HHA ⁽¹¹¹⁾.

La activación del eje culmina con la liberación de CORT en la rata y de cortisol en mamíferos, los cuales ejercen una potente retroalimentación negativa sobre la hipófisis, en el PVN y en áreas del hipocampo para inhibir la liberación inicial de hormonas del eje HHA ⁽⁶⁷⁾.

La exposición a modelos de estrés crónico como la inmovilización provoca incrementos del c-fos en el LC (locus coeruleus) y en el PVN del hipotálamo. Es acompañado por una fuerte respuesta del eje HA con progresivos retornos a la normalidad de los niveles plasmáticos de la ACTH a pesar de la persistencia de la exposición del estresor, mientras que bajo las mismas condiciones, la CORT se mantiene elevada a pesar de los niveles plasmáticos basales de la ACTH. La causa de la disociación entre CORT y ACTH no es conocida, pero mecanismos similares operan después de la aplicación del mismo estresor en forma crónica intermitente ⁽¹⁰⁹⁾, como sucede en nuestro modelo experimental.

Los efectos de la exposición a estresores crónicos intermitentes como la IMO en plancha están relacionados con la intensidad y la duración de las exposiciones diarias al estresor. En función de los resultados obtenidos en animales de laboratorio, existen cambios fisiológicos en la regulación del eje HHA como:

1) reducción de la ingesta y de la ganancia de peso ⁽¹⁴⁷⁾.

2) Incremento de peso adrenal y mayor respuesta adrenocortical reforzada a la ACTH, como se demostró en trabajos previos con un aumento de peso en las adrenales de las RE a los 17 días de la gestación, sin mostrar diferencias en los períodos finales de la misma ⁽¹⁴⁷⁾. Esta situación permite postular que las funciones hormonales placentarias realizan un esfuerzo adaptativo en situaciones de estrés intenso para permitir concluir con éxito la gestación.

3) Incremento de la expresión de CRH y AVP en el PVN y enmascaramiento de los receptores de GC en el hipocampo, PVN y la glándula adrenal ⁽¹⁶⁰⁾.

4) Mayor respuesta “in vivo” de la ACTH a la administración exógena de CRH ⁽¹¹¹⁾.

5) Incrementos de los niveles plasmáticos de CORT, con niveles plasmáticos normales de ACTH. En los trabajos realizados en nuestro laboratorio no pudimos comprobar los niveles plasmáticos de ACTH para determinar si hubo disociación entre los niveles de CORT y de ACTH como demuestran otros autores ⁽¹⁶⁰⁾ pero comprobamos aumentos de CORT en las RE en la segunda mitad de la gestación ⁽¹³⁵⁾.

6) Resistencia a la supresión del eje HHA por la administración exógena de GC (dexametasona). De hecho la prueba de supresión con dexametasona o la combinación de dexametasona con CRH son pruebas clásicas en el estudio de la depresión, patología que se caracteriza por resistencia a la retroinhibición del eje HHA ⁽¹¹¹⁾.

7) Incrementos en los niveles plasmáticos de PRL en el día 17 de la gestación en las RE con respecto a las RC ⁽¹⁴⁶⁾.

8) Incrementos en los niveles plasmáticos de estrógenos en el día 17 de la gestación en las RE con respecto a sus controles ⁽¹⁴⁶⁾.

Hasta el momento no se conoce si el aumento de los niveles de CORT y el reforzamiento de la respuesta adrenocortical a la ACTH en animales estresados crónicamente es una consecuencia de la hipertrofia o la hiperplasia adrenal o, un reflejo de modificaciones en los mecanismos fisiológicos que controlan la secreción adrenocortical. Se postula que la influencia de la secreción adrenocortical sin modificación en los niveles plasmáticos de la ACTH podría estar en relación a la innervación adrenal ⁽¹³⁴⁾.

Remodelación y homeostasis del tejido adrenal.

La subdivisión histológica de la corteza adrenal en tres zonas diferentes (glomerular, fascicular y reticular) reflejan las características funcionales y de desarrollo de la glándula. La corteza adrenal adulta es un órgano dinámico en el cual las células senescentes son constantemente remplazadas por células que proliferan y se diferencian en adrenocitos ⁽¹⁴²⁾.

Si bien se conoce que la glándula adrenal adulta tiene capacidad regenerativa, el origen de las células proliferantes es controvertido, por lo que se han postulado distintas teorías que han proporcionado avances en los mecanismos involucrados en la zonación de la corteza adrenal. A la luz de estas teorías es posible dilucidar la relación existente entre la proliferación celular, la diferenciación funcional y la apoptosis en la corteza adrenal ⁽⁸⁰⁾.

La teoría de la migración propone que las células proliferantes se originan del tejido mesenquimático subcapsular, bajo el concepto de células madre que actúan como fuente de células indiferenciadas y colonizan la glándula. En base a estudios citológicos de marcación que conducen al seguimiento del linaje celular y de la ruta migratoria, numerosas investigaciones realizadas en ratas han demostrado la presencia de células subcapsulares en fase S marcadas con PCNA o con BrDU, sugiriendo que esta población celular provee una fuente de células madre progenitoras que se diferencian en las distintas zonas de la corteza adrenal y eventualmente migran hacia el centro de la glándula ⁽¹⁷⁴⁾.

Basado en la determinación de las zonas con altos IPC, tres direcciones de migración alternativas han sido propuestas. Un camino de migración unidireccional desde la zona glomerular a la reticular; un camino bidireccional comenzando en la zona intermedia con dirección hacia la glomerular y hacia la reticular y la posibilidad de cordones de células formando lazos originados en la zona intermedia y pasando por la zona glomerular hasta la médula ⁽⁹⁹⁾.

Todas estas alternativas de migración determinan un alto IPC en las zonas glomerular y fascicular y un IA elevado en la zona reticular ⁽⁸⁰⁾.

Asimismo, en la corteza adrenal se han establecido diferentes subpoblaciones de células con distintas propiedades funcionales. Las células adrenocorticales que proliferan se caracterizan por la incorporación de BrDU en la fase S y por la falta de expresión de enzimas esteroideogénicas tal como 3β -HSD (3β hidroxisteroide deshidrogenasa). Contrariamente, las células que no tienen capacidad proliferante y producen esteroides, expresan 3β -HSD como así también el receptor de melanocortina (MC2R). Sin embargo, en la actualidad la definición fenotípica de las células madre es afectada por la falta de moléculas marcadoras. De este modo, la ausencia de marcadores de diferenciación tal como 3β -HSD y posiblemente MCR-2, está en concordancia con el concepto que en la corteza adrenal también se encuentra una población de células madre pluripotencial pero menos diferenciadas ⁽¹⁴²⁾.

Por otro lado, la teoría de la transformación, la cual es compatible con la anterior, se basa en la existencia de dos regiones de remplazo celular por medio de los procesos de proliferación, crecimiento y apoptosis. De acuerdo a esta teoría, una región se localiza en el área de transición entre la zona glomerular y fascicular y la otra entre la zona fascicular y reticular. El proceso de zonación tiene lugar en estas regiones de transformación, posiblemente incluyendo la totalidad de la zona fascicular. Así este proceso podría estar gobernado por la zona fascicular y sus mecanismos reguladores ⁽¹⁶⁸⁾.

Se han postulado dos procesos de transformación: una transformación progresiva y una regresiva. La progresiva produce incrementos en el número celular por proliferación y replicación de células fasciculares, procesos que son activados por mecanismos fisiológicos; y la transformación regresiva involucra la disminución del número celular por apoptosis en estas regiones ⁽⁹⁹⁾.

Se ha sugerido que las células proliferantes derivan de un mismo linaje celular y el fenotipo celular específico de cada zona es determinado por el ambiente inmediato a través de mecanismos paracrinos ⁽¹²⁶⁾.

Por último, la teoría zonal está basada en la existencia de distintas zonas funcionales y postula que cada zona adrenal se comporta en forma independiente de las otras y mantiene su propia población celular a través de células

proliferantes, utilizando sus propios mecanismos reguladores. No se establece ningún patrón en la dirección de la proliferación y migración entre las zonas. De este modo, la proliferación, diferenciación, apoptosis y regulación funcional se producen “zonalmente” (99).

Sin embargo, experimentos realizados con la enucleación de la corteza adrenal y posterior regeneración cortical sugieren que no es posible que cada zona tenga autonomía para mantener su homeostasis (24, 81).

Los resultados obtenidos en este trabajo están en concordancia con la teoría de la migración celular, dado que la ocurrencia de la proliferación es predominante en la zona glomerular y fascicular, mientras que en la zona reticular hay un alto IA y se encuentran escasas células proliferantes.

Si bien la zona glomerular ha sido clásicamente definida como una zona productora de aldosterona, en la actualidad hay evidencias que sugieren que también desempeña un rol fundamental en mantenimiento de la homeostasis de la corteza adrenal.

Experimentos en ratas realizados con timidina radiactiva, pulsos de BrDU y marcación con PCNA; demostraron que en la zona glomerular se encuentran células progenitoras que proveen una reserva celular a partir de la cual se originan células hijas que posteriormente se diferencian y migran a las diferentes zonas de la corteza, y permiten de este modo mantener la capacidad funcional corticoadrenal (82).

Influencia de la regulación hormonal sobre la vasculatura y remodelación de la corteza adrenal.

La corteza adrenal es uno de los órganos más vascularizados del organismo. Como otros tejidos endócrinos, está formada por células esteroideogénicas, nerviosas, endoteliales y de músculo liso que interactúan para formar una organizada red de capilares sanguíneos que eficientemente vierten las secreciones corticoesteroidales (115).

Este tejido es estrictamente dependiente de la ACTH para su desarrollo, crecimiento y mantenimiento de la homeostasis del tejido adulto. Aunque el

mecanismo de esta hormona para ejercer esta dependencia no ha sido aún dilucidado, se ha postulado que la ACTH directamente interactúa con las células esteroideogénicas y controla su apoptosis y proliferación ⁽⁵⁰⁾. Sin embargo, también es conocido que la ACTH inhibe | la proliferación de células adrenocorticales esteroideogénicas de varias especies, a través de procesos mediados por cAMP. Por lo tanto, el efecto trófico de la ACTH podría ser indirecto y mediado por la secreción de factores de crecimiento que actúan en forma autócrina y parácrina, ya que se demostró que la ACTH estimula la expresión y secreción del VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular). El VEGF es un miembro de la familia de factores angiogénicos que participa en la inducción de procesos tales como la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de las células endoteliales ⁽¹⁵⁴⁾.

Un posible paradigma para explicar el control hormonal de la ACTH sobre el crecimiento adrenocortical es que el VEGF es sintetizado por las células endócrinas bajo el control de la ACTH y estimula la neovascularización, la cual por su parte, controla el tamaño del tejido endócrino ⁽²⁸⁾.

En un estudio con ratas tratadas con Dexametasona para comprobar el efecto de la ACTH y de esta manera mimetizar las concentraciones plasmáticas de estas hormonas en condiciones de estrés crónico, se comprobó que la infusión de Dexametasona produjo un marcado descenso de la ACTH plasmática en las primeras 24 horas, que fue acompañado progresivamente por la disminución de la proliferación en las zonas fascicular y reticular de la corteza adrenal (en un lapso de 14 días), disminución de la expresión del VEGF y presencia de células apoptóticas durante los primeros 4 días. Después del 4^{to} día no se detectaron células apoptóticas, pero la disminución de la red vascular y de la expresión del VEGF fue más acentuada. Se puede concluir que la ACTH es requerida para el mantenimiento de la vasculatura de la corteza adrenal adulta y que la remodelación observada después de la deprivación de la ACTH es causada por cambios coordinados de los compartimentos endoteliales y esteroideogénicos. Asimismo, la regresión de la vasculatura causada por la disminución de la

expresión del VEGF es un efecto secundario producido por la privación de la ACTH ⁽¹⁵⁴⁾.

Caracterización morfológica del proceso apoptótico.

Según Elmore, S. ⁽⁴⁸⁾ la apoptosis puede ser definida como: “un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de proteasas denominadas caspasas y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula”.

Dentro de este proceso hay una gran cantidad de interacciones proteicas como entrecruzamientos, rupturas y síntesis de estructuras celulares que incrementan significativamente el consumo de energía por parte de la célula, para lograr su efectiva degradación y finalmente ser “reciclada” por parte de otras células ⁽⁴⁸⁾.

De esta forma, la muerte celular apoptótica es ejecutada en etapas organizadas lo que refleja la presencia de vías moleculares altamente preservadas. Este proceso se caracteriza por una serie de eventos morfológicos típicos como el encogimiento celular, la fragmentación en cuerpos apoptóticos rodeados por membrana y una rápida fagocitosis por las células vecinas ⁽¹³⁹⁾.

Durante muchos años se consideró la fragmentación internucleosomal del DNA como el marcador principal de la apoptosis, pero con el tiempo se ha demostrado que no todas las células que mueren por apoptosis presentan este tipo de degradación en el DNA ⁽¹⁷⁵⁾. Actualmente la proteólisis selectiva de sustratos celulares vitales es señalada como el mecanismo molecular responsable de los cambios apoptóticos ⁽¹³⁷⁾. Así, la determinación de la activación de las moléculas que disparan el proceso de apoptosis ha adquirido gran importancia en la detección de la apoptosis. Tal es el caso de la activación de la caspasa 3 que es utilizada como marcador temprano de este proceso ⁽¹⁹⁾. Este método presenta la gran ventaja que es un evento que tiene una alta correlación con la inducción de la apoptosis, por lo que no existe la incertidumbre presente con otros marcadores en los que su presencia o ausencia no son determinantes en el proceso de muerte celular programada ⁽¹⁵⁵⁾.

Bajo condiciones fisiológicas la ocurrencia de la apoptosis es un evento típicamente aislado. Así, sólo un pequeño número de células apoptóticas pueden visualizarse al mismo tiempo. La naturaleza asincrónica de la muerte apoptótica en la población celular de un tejido determinado se debe principalmente a la variabilidad en la duración de la fase de iniciación. La duración de la muerte por apoptosis en la célula ha sido estimada entre 6 y 24 horas, aunque esto puede variar dependiendo del tipo celular ⁽⁵⁶⁾. Como resultado del corto tiempo en el que se lleva a cabo este proceso, pocas células apoptóticas están presentes en el mismo momento y por esta razón la importancia cuantitativa de la apoptosis puede ser subestimada ⁽¹³⁹⁾.

Las primeras evidencias morfológicas del inicio de la apoptosis se observan a nivel del núcleo. Éste sufre cambios dramáticos y el primero de ellos es la condensación de la cromatina nuclear y la formación de masas con textura granular y uniforme que se marginan en la superficie interna de la membrana nuclear. La proporción del núcleo que es ocupado por la cromatina condensada varía según el tipo celular, pero generalmente es menor en las células que poseen escasa heterocromatina. Posteriormente, el núcleo se fragmenta (cariorrhexis) y el nucléolo se desintegra en partículas osmiófilas ⁽⁷⁸⁾.

La fragmentación nuclear es llevada a cabo por nucleasas endógenas que rompen el DNA en fragmentos oligonucleosomales de entre 180-200 pb. Esto produce el característico patrón del DNA en escalera cuando se analiza por electroforesis. Sin embargo, este patrón no es visible en todos los tipos celulares ya que depende de que la ruptura se produzca en las dos cadenas y del grado de fragmentación ⁽¹³⁹⁾.

A nivel del citoplasma, una serie de eventos se producen en forma concomitante con los cambios nucleares descritos. En células que poseen abundante citoplasma se produce una condensación total del mismo. Este evento está usualmente asociado con la extensiva protrusión o formación de burbujas en la superficie celular, fenómeno que es frecuente visualizar en algunos tipos celulares como linfocitos y timocitos. También, se pueden encontrar numerosas vacuolas claras en el citoplasma condensado y a veces se puede observar la descarga de su contenido por exocitosis ⁽⁷⁸⁾.

Las cisternas del retículo endoplasmático se dilatan y pueden fusionarse con la membrana plasmática, pero el resto de las organelas celulares permanecen intactas en el citoplasma ⁽¹⁴³⁾. Se produce una gran activación de transglutaminasas, las cuales provocan el entrecruzamiento de proteínas citoplasmáticas que van formando polímeros ⁽⁴⁸⁾.

La expresión de marcadores en la superficie externa de la membrana plasmática es un hecho característico en células apoptóticas. Es conocido que la apoptosis es un proceso de muerte en el que la integridad de la membrana se mantiene pero se presentan cambios en su simetría. La fosfatidilserina se transloca desde la cara interna de la membrana hacia la externa por la acción de proteínas de membrana denominadas translocasas, facilitando el reconocimiento por las células fagocíticas ⁽¹⁶²⁾.

Asimismo, se evidencia disminución del tamaño celular, pérdida de elementos de superficie como microvellosidades y de uniones celulares. Se han descrito reducciones del volumen celular de incluso un 30%. Esto es provocado por el movimiento de fluidos fuera de la célula debido a la inhibición del sistema de cotransporte de sodio, potasio y cloro ⁽⁴⁸⁾.

La membrana plasmática presenta circunvoluciones y adquiere una apariencia vesicular característica. Como resultado de estas grandes invaginaciones se forman los cuerpos apoptóticos de tamaño y composición variable. En algunos casos, la célula es convertida en numerosos y pequeños cuerpos apoptóticos, mientras que en otras, se observa uno de mayor tamaño que el resto. Estos presentan integridad de sus membranas (son impermeables a los colorantes vitales), mantienen sus mitocondrias intactas y contienen cuerpos densos granulares que corresponden a restos nucleares, los cuales, también se producen por las grandes invaginaciones de la membrana nuclear. El número de fragmentos nucleares en cada cuerpo apoptótico varía ampliamente, y la presencia del componente nuclear no es consistente con el tamaño del cuerpo apoptótico. Estos cuerpos apoptóticos pueden ser reconocidos y rápidamente fagocitados por células vecinas incluyendo macrófagos y células del parénquima. En cambio, los cuerpos apoptóticos formados en cultivo frecuentemente escapan de la fagocitosis

y en pocas horas degeneran espontáneamente. Usualmente se hinchan y sus membranas y organelas se destruyen, conociéndose como apoptosis secundaria o falsa necrosis ⁽⁷⁸⁾.

La frecuencia con la que cada una de las fases de la apoptosis descrita puede ser observada al microscopio electrónico bajo una serie de circunstancias particulares, dependerá de la cinética del proceso y en el caso de que haya un escaso nivel de apoptosis en el tejido, de la forma de tomar la muestra ⁽¹³⁷⁾.

Para confirmar la apoptosis se puede observar pequeñas secciones de tejidos con la coloración de hematoxilina/eosina (H/E) en un microscopio de luz y determinar la presencia de células apoptóticas según criterios morfológicos generales y diferenciarlas de las células necróticas. Este es un método rápido y económico pero tiene la desventaja que sólo puede detectar estados tardíos de apoptosis, además de ser un método altamente cualitativo y subjetivo a las capacidades del investigador en cuanto a observación y detección. A pesar de esto, la observación de características morfológicas se mantiene como un parámetro clave, pues su reconocimiento en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) es considerado el método “estándar de oro” para confirmar el estado apoptótico en una célula ⁽⁵⁾.

Algunas de las características que deben estar presentes en la observación, según Elmore, S. ⁽⁴⁸⁾ son: núcleo electrodenso, fragmentación nuclear, membrana celular intacta, desorganización de organelas citoplasmáticas, vacuolas claramente alargadas y protuberancias irregulares en la superficie celular. Igualmente, se ha reportado que por medio de la técnica TEM es posible visualizar la fagocitosis de cuerpos apoptóticos ⁽⁴⁸⁾.

En este estudio se utilizó la detección morfológica de la apoptosis en la corteza adrenal, no con fines cuantitativos sino únicamente cualitativos. Así en las fotografías electrónicas de las figuras 48, 49 y 50, se observaron los siguientes cambios morfológicos típicos de una muerte por apoptosis:

A nivel nuclear: núcleos apoptóticos con condensación y fragmentación de la cromatina, pérdida de la integridad y morfología de la membrana nuclear.

A nivel citoplasmático: condensación, vacuolas de inclusión y desorganización general de las organelas. También se visualizaron mitocondrias con vacuolizaciones en su interior y cuerpos apoptóticos citoplasmáticos con diferentes organelas y restos nucleares en proceso de autofagocitosis.

Efectos del estrés crónico sobre la apoptosis celular.

Efecto del día de gestación sobre el IA.

Los resultados obtenidos permiten establecer como perfil de normalidad durante la segunda mitad de la gestación que el IA presentó una disminución progresiva en la corteza adrenal desde el día 12 al 21 de la gestación, lo que evidenciaría que está marcadamente influenciado por el día de la gestación. Este perfil se mantuvo en condiciones de estrés.

Efecto de la zona sobre la apoptosis celular.

Al hacer un análisis del proceso apoptótico en cada una de las zonas de la corteza adrenal, se presentan resultados controvertidos. Blanco y col. ⁽²³⁾, en glándulas adrenales bajo condiciones normales de experimentación, hallaron núcleos apoptóticos en las tres zonas adrenocorticales pero el mayor número se obtuvo en la zona reticular. Por otro lado, Carsia y col. ⁽³⁶⁾ encontraron núcleos apoptóticos solamente en las zonas fasciculada y reticular. Wolkersdorfer y col. ⁽¹⁷³⁾ detectaron núcleos apoptóticos en las tres zonas de la corteza adrenal, pero el mayor IA fue hallado en la zona glomerular, seguido en orden decreciente por la zona fasciculada y el menor IA fue detectado en la zona reticular.

En nuestro experimento se encontraron tanto en RC como en RE núcleos apoptóticos en las tres zonas adrenocorticales, pero el IA fue mayor en la zona reticular, disminuyó parcialmente en la zona fascicular y en la zona glomerular se encontraron los valores más bajos. Estos hallazgos están en concordancia con la Teoría de la migración celular que describe la proliferación de células corticales en la parte externa de la corteza, migración y diferenciación de células de la zona glomerular a células de la zona fascicular y éstas a células reticulares, donde estas últimas degeneran y mueren ⁽¹⁶⁸⁾.

De esta forma la muerte celular controlada por la glándula adrenal es esencial para el mantenimiento de la arquitectura zonal funcional. Las células bajo el proceso de apoptosis se encuentran principalmente en la zona reticular, por lo que esta zona fue definida como una zona de envejecimiento y muerte celular ⁽¹⁷²⁾.

Relación entre MEC y apoptosis

Se han descrito algunas funciones biológicas en la corteza adrenal que son potencialmente reguladas por componentes de la matriz extracelular; actuar sobre las células progenitoras en la vía de diferenciación celular adrenocítica, colaborar en la migración centrípeta, participar en la formación de la red capilar y el bloqueo de la apoptosis tanto en el desarrollo embrionario como en la homeostasis del tejido adulto ⁽¹¹⁹⁾.

La fibronectina y la laminina son dos proteínas que tienen propiedades de adhesividad y quimiotaxis sobre las células adrenales, sugiriendo un rol fisiológico en la migración de los adrenocitos ⁽⁵⁰⁾. Su distribución en la corteza adrenal es dependiente de la zona. La laminina se presenta en forma uniforme en las células esteroideogénicas de las tres zonas; en cambio, la fibronectina es abundante en las estructuras fibrovasculares de la cápsula y la corteza ⁽¹⁷⁰⁾.

La síntesis de fibronectina producida en las células adrenocorticales es estimulada por la ACTH, pero esta última no tiene efecto en la síntesis de laminina, la cual es estimulada por el factor de crecimiento transformante Beta (TGF β), TGF β -1, TGF β -2 y factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2), pero no es modificada por el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), ni por la Ang II ⁽¹⁶⁹⁾.

La ACTH induce la expresión y secreción de la trombospondina 2 que se dispone en las zonas glomerular y fascicular y está ausente en la zona reticular, la cual tiene a su cargo la función de promover la adhesión celular e inhibir el proceso apoptótico en las zonas de la corteza adrenal donde se encuentra localizada. Por esta razón se ha sugerido que la trombospondina 2 podría desempeñar una acción antiapoptótica inducida por la ACTH ⁽⁵⁰⁾.

Efectos de la PRL y los estrógenos sobre la apoptosis celular.

La PRL es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada principalmente por células de la adenohipófisis denominadas lactotropas. Las investigaciones clínicas sobre la acción de esta hormona, han puesto de manifiesto otras funciones además de participar en el desarrollo de la glándula mamaria y la producción de las proteínas de la leche en la preñez y en el posparto. Actualmente, se conocen más de 300 acciones biológicas vinculadas con la homeostasis del organismo. La PRL desempeña un papel preponderante en la regulación de otros ejes hormonales (tiroideo, gonadotrófico), en la respuesta inmunológica y en las conductas de afrontamiento del estrés ⁽²⁵⁾.

La PRL es regulada por el hipotálamo mediante la acción de neurohormonas, neurotransmisores y neuromoduladores. El eje prolactínico es el único que posee en su modulación un predominio del tono inhibitorio ⁽⁹⁾. Durante mucho tiempo se afirmó que la inhibición se producía por la acción del factor inhibidor de PRL (PIF) pero actualmente se conoce que la dopamina realiza el papel inhibitorio a nivel del hipotálamo, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa sobre los receptores de neuronas dopaminérgicas del núcleo arcuato en la vía túberoinfundibular, el cual aumenta la liberación y el recambio de dopamina ⁽²⁰⁾.

La PRL puede ser sintetizada en cualquiera de los órganos que poseen receptores específicos. Sin embargo, una parte importante de la síntesis se lleva a cabo en las células lactotropas. Ante el estímulo central, las células de la adenohipófisis sintetizan la PRL que viaja por el plasma hacia sus receptores específicos localizados en casi todos los órganos, como hipotálamo, hipófisis, plexos coroideos, glándula mamaria, placenta, útero, ovario, testículo, vesícula seminal, tejido adiposo, músculo, riñón, hígado, bazo, ganglios linfáticos, timo, médula ósea, células inmunes, glándulas sudoríparas y glándula adrenal. Se ha descrito que la glándula adrenal presenta receptores específicos para PRL en las tres zonas de la corteza ⁽⁶⁰⁾.

Este hecho permite pensar que la PRL es una hormona que no posee un órgano blanco específico, pero sí una heterogeneidad funcional cuyos mecanismos de acción endócrinos, parácrinos y autócrinos, le permiten actuar no sólo como una

hormona sino también como un factor de crecimiento, un inmunomodulador y/o un neurotransmisor ⁽²⁵⁾.

Esta hormona es muy lábil al estrés, sus concentraciones plasmáticas se elevan en el estrés agudo (procesos quirúrgicos, presencia de un depredador) mediante la acción de los factores estimulantes, acción que no puede ser compensada por los factores inhibitorios. Asimismo, se observó un aumento en las concentraciones plasmáticas de PRL durante las conductas de afrontamiento o “coping” pasivo, pero no en los comportamientos de “coping” activo lo cual permite sospechar una relación de la PRL con los comportamientos pasivos ante situaciones de crisis, del tipo de retirada, sumisión y pasividad ⁽⁹⁾.

En trabajos previos se demostró que los valores en los niveles plasmáticos de PRL obtenidos por radioinmunoensayo (RIA) se incrementaron significativamente en las RE a los 17 días de la gestación con respecto a las RC ⁽¹⁴⁶⁾.

De esta forma, el incremento de la PRL en el día 17 de la gestación en las RE podría ser un factor que disminuye la apoptosis, reflejado por el menor IA hallado en las zonas fascicular y reticular, con respecto a las RC.

Estos hallazgos se sustentan al haberse comprobado que la PRL promueve la diferenciación celular y disminuye la apoptosis al estimular la expresión de la proteína bcl-2 antiapoptótica ⁽¹⁷¹⁾. Asimismo, se demostró que la activación de la caspasa 3 es una característica fundamental de la apoptosis inducida por GC y que la apoptosis era inhibida en presencia de niveles plasmáticos elevados de PRL ⁽⁸⁶⁾.

Con respecto a los estrógenos, clásicamente han sido caracterizados como un factor endócrino, pero actualmente se conoce que son producidos en varios tejidos extragonadales y que actúan localmente en forma parácrina y autócrina. Ellos tienen un rol clave en el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis ejerciendo su acción en diversos tejidos como hueso, hígado, glándula adrenal, SNC y sistema reproductivo ⁽⁴⁰⁾.

La acción de los estrógenos incluye diferentes mecanismos como efectos genómicos clásicos asociados a receptores de estrógenos (ER) y efectos no genómicos que involucran sistemas de segundos mensajeros.

Se ha establecido que las diferentes respuestas a los estrógenos son debidas a la diversidad de receptores (de membrana y nucleares), a la variedad de señales que éstos pueden activar, así como a la naturaleza de sus células blanco ⁽⁸⁾.

Los receptores de estrógenos pertenecen a una familia de proteínas que actúan como reguladores de la transcripción de genes por unión a secuencias específicas del DNA. Así, la acción de los esteroides en el genoma puede representar un mecanismo de control específico de la transcripción que es utilizado por la célula para diferentes propósitos además de mediar la respuesta hormonal ⁽¹⁵⁶⁾.

Los ER residen en el núcleo de las células blanco y la unión del esteroide al receptor induce un cambio conformacional del receptor que mejora su afinidad para secuencias específicas en el DNA denominadas elementos de respuesta a los esteroides. A su vez, esta reacción induce cambios en la expresión de genes que finalmente generan la síntesis de proteínas y la respuesta celular.

La expresión de ER ha sido demostrada en la glándula adrenal de monos ⁽⁷⁰⁾ y roedores ⁽⁸⁸⁾. Se describieron dos tipos de receptores (α y β), los cuales son codificados por dos genes diferentes. ER α se expresa mayormente en el tejido reproductivo de la hembra y en la placenta, mientras que ER β se localiza en testículo, ovario, hipófisis, glándula adrenal y bazo. Estos subtipos de ER difieren no solamente en las señales basadas en el ligando y el elemento de respuesta, sino que también tienen un rol diferente en la regulación génica ⁽⁴⁰⁾.

Los efectos genómicos involucran la síntesis de nuevas proteínas y los ER nucleares pueden regular la transcripción de genes mediante la modulación de factores de transcripción por participar en la interacción proteína-proteína y activar o inhibir proteínas específicas ⁽¹¹⁵⁾.

Con respecto a los efectos no genómicos, los estrógenos ejercen acciones rápidas sobre la excitabilidad de la membrana, la apertura de canales iónicos y la señalización de neurotransmisores con receptores acoplados a proteína G. Los estrógenos y otros esteroides son capaces de unirse a receptores específicos en la membrana plasmática y estimular diferentes mecanismos de señalización intracelular ⁽⁸⁾.

En trabajos previos los niveles plasmáticos de estrógenos se presentaron en mayor concentración en el día 17 de la gestación en las RE con respecto a las RC ⁽¹⁴⁶⁾. Estos datos sugieren que los estrógenos podrían causar un importante efecto antiapoptótico en la corteza adrenal dado que en el día 17 de la gestación en las zonas fascicular y reticular se presentó un menor IA en las RE con respecto a las RC, lo que podría contribuir al aumento de peso de la glándula.

Asimismo, se comprobó que los estrógenos disminuyen los niveles de la proteína proapoptótica Bax en la corteza adrenal y la fragmentación del DNA al 50% con respecto a su control ⁽¹⁵⁸⁾.

Es conocido que Bcl-2 es una proteína que inhibe la apoptosis y ha sido fuertemente vinculada con la inhibición de la muerte celular apoptótica por prevenir la pérdida de citocromo c de las mitocondrias. El estradiol regula la producción de Bcl-2 en varios tejidos, entre los cuales se encuentra la corteza adrenal. Existen múltiples vías mediante las cuales los estrógenos pueden incrementar la expresión de Bcl-2 y la regulación del producto de este gen prueba la existencia de una convergencia entre los efectos de señalización rápida y los clásicos. Se demostró que el tratamiento con estradiol aumentó la expresión de ER, activó los receptores de membrana y disminuyó las actividades de las proteasas proapoptóticas como calpaína y caspasas 3 y 9 ⁽¹⁵⁸⁾.

Efectos del estrés crónico sobre la proliferación celular.

La modulación de la proliferación y la diferenciación celular está en íntima relación con la regulación de la progresión del ciclo celular. Las señales que conducen a las células a entrar en mitosis convergen en la regulación de CDKs. La actividad de las CDK está regulada por múltiples mecanismos, los cuales incluyen incrementos de ciclinas y ensamble del complejo CDK- ciclina, fosforilación de quinasas y la presencia de inhibidores de CDK entre los que se encuentran p27kip1 y p57kip2 ⁽⁸⁵⁾.

Para caracterizar la proliferación celular en su magnitud y distribución en las diferentes zonas de la corteza adrenal, se utilizó PCNA y BrDU como marcadores de proliferación celular. Al realizar la comparación entre ambas técnicas

inmunocitoquímicas, los resultados estadísticos fueron concordantes, aunque el IPC obtenido con PCNA fue mayor que el hallado con BrDU. Esta diferencia se debe a que la fracción de núcleos de células marcadas con PCNA corresponde a la población de células en período de interfase G1 tardío, fase S temprana y en período de síntesis de DNA. En cambio, la BrDU es incorporada en las células solamente durante la síntesis y eventualmente en la reparación del DNA, ofreciendo aproximaciones más certeras ^(38, 85).

Si bien ambas técnicas son efectivas para evaluar el IPC hay que tener en cuenta que los índices obtenidos con cada una de ellas no pueden emplearse como sinónimos ⁽³⁸⁾.

Efecto del día de gestación sobre el IPC.

El estrés crónico por IMO intermitente y repetido aplicado en la segunda mitad de la gestación provocó una disminución del IPC en los días 12 y 17, mientras que en el día 21 no presentó diferencias significativas.

La disminución del IPC en las RE podría estar en relación con los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación al realizar las determinaciones de los niveles plasmáticos de CORT luego de 24 horas de exposición al estrés por IMO, en los días 12, 15, 17, 19 y 21 de la gestación. Las RE tuvieron mayores niveles de CORT plasmática que los controles del mismo día de la preñez en todos los tiempos estudiados ⁽¹³⁵⁾.

Estos resultados son explicados por el efecto que ejercen los GC sobre los IGF; ya que se ha establecido que los tipo I se expresan en la glándula adrenal adulta, mientras que los tipo II se localizan en la adrenal durante la etapa fetal. Los IGF son polipéptidos de cadena simple estructuralmente homólogos a la proinsulina que promueven el crecimiento y función de gran cantidad de tipos celulares de manera autócrina, parácrina o endócrina. El receptor de IGFI se relaciona estructuralmente al receptor de insulina y se ha descrito que la insulina actúa como un importante regulador de su síntesis ⁽⁵⁰⁾.

Estos factores de crecimiento son capaces de activar o reprimir genes determinantes específicos que promueven la supervivencia de las células, la

proliferación y la muerte celular cuando interaccionan con moléculas hidrofóbicas pequeñas como los GC y la hormona tiroidea (41).

Se demostró que los niveles de IGF-I están disminuídos en respuesta a la restricción de nutrientes y/o hipoinsulinemia. En relación a la hipoinsulinemia y el estrés, es conocido que la activación metabólica provocada por los sistemas SMA e HA es opuesta a los efectos de la insulina, por lo que en situaciones de estrés se inhibiría la secreción de esta hormona, al parecer mediante un efecto α -adrenérgico directo a nivel de las células β del páncreas (129).

Asimismo, se ha descrito que los GC producen enmascaramiento de los IGF, provocando una disminución en el crecimiento celular (37) que podría verse reflejado en la disminución del IPC a nivel de la corteza adrenal.

Este hecho pone en evidencia el efecto perjudicial que ejerce el estrés a través de cambios metabólicos y hormonales maternos que incidirían en la síntesis o expresión de los IGF, que podría deberse directamente a través de los GC maternos y/o fetales liberados en respuesta al estrés. Al respecto, se demostró que la CORT atraviesa la barrera placentaria en ratas (177). Los valores de los niveles plasmáticos de CORT (135) reflejan una clara evidencia de que el estrés es crónico, que la rata se acerca al momento de la parición y que la IMO representa para la rata preñada un estímulo estresógeno intenso aún hasta el final de la gestación que no posibilita el fenómeno de adaptación o habituación.

En situaciones de estrés se produce la activación del eje HHA que es caracterizada por una rápida liberación de la ACTH, la cual estimula a su vez la síntesis de GC en la zona fascicular de la corteza adrenal (66). Cuando el estímulo persiste, incluso si es de alta intensidad, los niveles de hormonas HA regresan paulatinamente a la normalidad. Sin embargo, este patrón es respetado por la ACTH pero no por los GC, los cuales permanecen elevados (74).

La reducción progresiva de la ACTH es debida en parte a la retroalimentación negativa ejercida por los GC, y por otro lado, por una disminución del contenido de la ACTH de la hipófisis. Aunque Soñez y col. (2001) sugieren que las RE presentarían un aumento paulatino de las poblaciones corticotropas ante la reiteración del estresor homotípico con un aumento comprobado del contenido

pero no necesariamente de la secreción, justificando de esta manera la progresiva disminución de la respuesta de la ACTH.

De este modo, la disminución en los niveles de la ACTH y el aumento sostenido en las concentraciones de los GC podrían actuar inhibiendo el IPC en las zonas fascicular y reticular en los días 12 y 17 de la gestación.

Se comprobó que las concentraciones plasmáticas elevadas de CORT de manera prolongada como sucede en nuestro modelo experimental en el día 21 de la gestación producen un enmascaramiento de los receptores de GC ⁽¹⁰⁹⁾ y de esta manera no se evidencia disminución del IPC en las RE.

Efecto de la zona sobre la proliferación celular.

En ratas adultas se ha descrito una región de células madres ubicada entre las zonas glomerular y fascicular, especialmente en ratas Sprague-Dawley, denominada zona intermedia, cuya proliferación está en relación con los niveles plasmáticos de la ACTH ^(168, 108). Los resultados obtenidos en este trabajo son parcialmente compartidos con estos antecedentes, ya que la proliferación celular se presentó principalmente en la zona glomerular, en menor grado en la zona fascicular y en forma escasa y/o nula (dependiendo de la técnica inmunocitoquímica empleada) en la zona reticular, pero no se encontró circunscripta a una zona específica.

Al analizar el IPC en las diferentes zonas de la corteza adrenal, se obtuvo una disminución significativa en la zona reticular de las RC y las RE con respecto a las zonas glomerular y fascicular en los tres días de la gestación estudiados.

Estos resultados están íntimamente relacionados con los obtenidos en el IA, ya que se demostró que en las RC y RE es mayor en la zona reticular, disminuye parcialmente en la zona fascicular y en la zona glomerular se encuentran los valores más bajos, concordando de este modo con la Teoría de la migración celular ⁽¹⁷⁴⁾. La misma sostiene que la proliferación de las células progenitoras está limitada a la parte externa de la corteza y luego de esta fase inicial de proliferación, los adrenocitos se desplazan en dirección centrípeta hacia la parte interna de la corteza en su límite con la médula. Este proceso tiene una duración

aproximada de 100 días en la rata, donde la mitad de las células mueren en el camino y un gran número son eliminadas en la zona reticular por apoptosis ⁽⁷⁵⁾.

Durante este desplazamiento los adrenocitos adquieren distintos fenotipos morfológicos y funcionales caracterizados por diferentes patrones de expresión de enzimas esteroideogénicas. Las células proliferantes se diferencian al fenotipo glomerular y adquieren la capacidad para sintetizar aldosterona bajo el control del sistema renina-angiotensina. En el camino, otra población de adrenocitos adquiere el fenotipo fascicular y producen cortisol en humanos o CORT en roedores bajo el control de la ACTH; y por último en la parte más interna de la corteza, la zona reticular, los adrenocitos adquieren el fenotipo reticular, caracterizado por sintetizar esteroides ⁽⁵⁰⁾.

Sin embargo, se han determinado variaciones de especie en estas zonas a nivel morfológico y funcional. Por ejemplo, se ha demostrado que los niveles de expresión de enzimas esteroideogénicas en las zonas corticales presentan variaciones considerables en humanos y ratas ⁽¹⁶⁸⁾. Asimismo, niveles similares son expresados en las tres zonas de la corteza adrenal en humanos, mientras que en ratas la expresión es principalmente en las zonas glomerular y fascicular.

Los mecanismos y las moléculas implicadas en la migración celular adrenocortical son poco conocidos. Se estableció que los adrenocitos se mueven en masa hacia la médula adrenal y durante este proceso, las células van avanzando y mantienen su microambiente. Por esta razón, la utilización del término “migración” resulta inapropiado para definir el desplazamiento de las células adrenocorticales en la glándula, porque este proceso es claramente distinto de la migración observada durante la organogénesis embrionaria, donde las células van migrando y modificando sus posiciones relativas. De este modo, es más adecuado mencionar este proceso como desplazamiento celular orientado ⁽¹²⁴⁾.

El mecanismo por el cual las células se diferencian y mantienen la arquitectura de la glándula no está dilucidado. Algunos investigadores proponen que localmente se liberan organizadores o morfógenos que alcanzan diferentes concentraciones según la zona cortical y producen la activación de genes involucrados en la diferenciación celular. Por lo tanto, la arquitectura del tejido queda determinada

por la posición celular en relación al gradiente morfógeno. Sin embargo, esta hipótesis es compleja y ofrece dificultades para definir con precisión cuáles son las sustancias que actúan como morfógenos; y por otro lado, los cambios en las concentraciones pueden ser críticas y el contacto célula-célula adquirir una importancia fundamental ⁽¹⁶⁷⁾.

En relación con la fuerza motora que conduce a las células de la corteza adrenal a desplazarse se han formulado dos hipótesis. Por un lado, que la presión mitótica ocurre en la región subcapsular e impulsa a las células a desplazarse hacia la zona reticular. La segunda posibilidad es que las células migren por un gradiente químico de atracción secretado por las distintas zonas de la corteza adrenal ⁽¹²⁴⁾.

Asimismo, se ha propuesto que los componentes del tejido conectivo de la cápsula o las células de la zona glomerular producen organizadores químicos en gradientes que determinan la polaridad de la glándula. Las células glomerulares podrían adquirir su fenotipo cerca de la cápsula donde la concentración de los morfógenos es alta, en cambio para el fenotipo fascicular sería necesaria una concentración menos elevada. Por otro lado, un gradiente químico sería configurado por la médula, y su secreción determinaría la transformación de células fasciculares a reticulares y posiblemente, la apoptosis característica de esta región ⁽¹⁶⁷⁾.

Como organizadores químicos o morfógenos se han propuesto al neuropeptido Y (NPY), FGF, IGF-I, neurotensina, sustancia P, y péptido intestinal vasoactivo (VIP), los cuales son conocidos por estimular la proliferación de las células adrenocorticales ⁽¹⁶⁶⁾.

Es conocido que diferentes procesos (proliferación, diferenciación fenotípica, apoptosis y migración) son controlados por la ACTH y que los componentes de la matriz extracelular pueden inducir señales intracelulares o interactuar con la transducción de señales de hormonas o de factores de crecimiento ⁽¹²⁴⁾.

Así, la laminina y en menor grado la fibronectina, son considerados agentes quimiotácticos para las células adrenocorticales. Aunque no se puede excluir la posibilidad que este efecto no sea inducido por la laminina, sino que sea debido a la asociación de ésta con péptidos quimiotácticos como por ejemplo, FGF-2 ⁽¹³⁰⁾.

La ACTH es esencial en este proceso, como se demostró en experimentos con animales hipofisectomizados que presentaron atrofia adrenal reversible.

Esto lleva a especular que la laminina es una proteína quimiotáctica inducida por la ACTH que participa en el proceso de migración centrípeta. Aunque teniendo en cuenta que la distribución de la laminina es uniforme en las tres zonas de la corteza adrenal, esta proteína podría considerarse como parte de un microambiente favorable que posibilita el desplazamiento celular adrenocortical y que la presión mitótica resultante de la división celular en la zona glomerular actuaría como la fuerza que impulsa a las células a desplazarse (124).

Efectos de la ACTH sobre la proliferación celular.

La ACTH actúa como regulador primario tanto del desarrollo fetal adrenal como de la homeostasis de la corteza adrenal adulta y la función esteroidogénica. Esta hormona ejerce su efecto a través de su receptor (ACTHR) localizado en la membrana plasmática de las células adrenocorticales (176, 35).

Teniendo en cuenta la variedad de eventos biológicos estimulados por la ACTH en la glándula adrenal, parecería que estos efectos son inducidos por una variedad de proteínas relacionadas, sintetizadas y segregadas por las diferentes zonas de la corteza, y/o que los factores producidos localmente pueden sinergizar o antagonizar los efectos biológicos directos de la ACTH y generar respuestas combinadas en las diferentes poblaciones celulares (105, 71).

Las vías y señales que regulan el tamaño y el número de células en respuesta a la estimulación de la ACTH son complejas y son el motivo de múltiples investigaciones. Diferentes autores han establecido que la ACTH es una hormona proliferativa que regula la homeostasis de la glándula adrenal adulta por la correlación existente entre los niveles de la ACTH circulante y el tamaño de la corteza adrenal (114, 55). En contraste, trabajos "in vitro" indican que la ACTH es una hormona débilmente mitogénica en la línea celular de tumor adrenocortical Y-1 y una hormona antimitógena en líneas celulares y cultivos primarios adrenocorticales de rata, ratón y humanos (102). Estas observaciones sugieren que "in vivo" la ACTH es una hormona mitógena indirecta, posiblemente mediada por

otros factores parácrinos como IGF, FGF, VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) los cuales ejercen una acción proliferativa en las células adrenocorticales ⁽¹⁶⁷⁾.

Bajo estimulación con ACTH se encontraron células inmunomarcadas con PCNA en las tres zonas de la corteza adrenal, lo que implica que el sitio de acción de la ACTH no está limitado a la zona glomerular. Por otro lado, la presencia de estas células no es el resultado de la migración de las células glomerulares, ya que las células proliferantes tardan al menos diez días para comenzar a migrar centripetamente a las otras zonas corticales ⁽¹⁰⁷⁾. Estos resultados ponen en evidencia que la ACTH promueve la progresión de varios tipos de células en la adrenal, y se comprobó el efecto de esta hormona con la marcada disminución de células que expresaban PCNA en la corteza adrenal al ser tratadas con Dexametasona ⁽⁸⁵⁾.

También se demostró que altos niveles plasmáticos de ACTH producen hipertrofia en las células adrenocorticales. Este efecto fue observado en ratas y ratones tratados con ACTH y en modelos genéticos que presentaban elevadas concentraciones de ACTH, tal como ratones knockout para receptores de GC ⁽¹²⁴⁾. Tratamientos prolongados con ACTH estimularon la proliferación de células de la corteza adrenal, aunque no es claro si fue un efecto directo de la ACTH o secundario a la hipertrofia y/o a la activación de algún otro factor de crecimiento ⁽⁹³⁾. Contrariamente, bajos niveles de ACTH en ratones knockout para CRH y POMC, o en ratas hipofisectomizadas, provocó la regresión del tejido adrenocortical con desaparición de las células de las zonas fascicular y reticular por apoptosis, mientras que la zona glomerular persistió y siguió secretando aldosterona ⁽³⁵⁾. En animales adrenalectomizados, la infusión de ACTH provocó regeneración y diferenciación de las zonas corticales, indicando que los fenotipos fascicular y reticular podrían ser derivados de las células glomerulares ⁽⁵⁰⁾.

Se comprobó que la ACTH bloquea la progresión de las células adrenocorticales en la fase G1 del ciclo celular e inhibe la síntesis de DNA en fase S, aún en presencia de factores de crecimiento ⁽⁵⁸⁾. Después de este efecto inhibitorio sobre el crecimiento, la ACTH induce la expresión de genes asociados con la progresión

del ciclo celular como c-fos y c-jun ^(83, 163). Este efecto dual de la ACTH es debido a que cortos pulsos de ACTH, antes del punto de arranque en G₁ inducen la progresión del ciclo celular por promover la transición de la fase G₁ a la S, incrementando la proliferación celular ^(15, 93). Por el contrario, la exposición prolongada a la ACTH durante G₁ arresta el crecimiento celular por bloquear la transición de G₁ a la fase S ⁽²⁴⁾.

Al respecto, se ha investigado el efecto de la ACTH sobre la expresión de genes de respuesta temprana para las proteínas Jun y Fos, las cuales desempeñan un rol importante en la proliferación adrenocortical. Se demostró que la administración de dosis farmacológicas de ACTH “in vivo”, estimuló en las zonas fascicular y reticular un incremento en la síntesis de DNA y la expresión de c-Jun y c-Fos, que están asociados con la progresión del ciclo ⁽¹⁶⁸⁾. Este efecto fue inhibido en los animales que previamente habían sido tratados con Dexametasona ⁽¹⁷⁾.

En condiciones de estrés crónico los altos niveles de CORT podrían actuar a nivel de la adrenal provocando una disminución de la proliferación celular al bloquear la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular.

También se estudió la regulación de la ACTH sobre la expresión del inhibidor de CDK, p27kip1, ya que está involucrado en la regulación de la diferenciación y el crecimiento celular adrenal ⁽⁸⁵⁾. Las células que expresaban PCNA en la corteza adrenal, disminuyeron al ser tratadas con Dexametasona, concomitantemente con la expresión de p27kip1. La administración posterior de ACTH, suprimió rápidamente la expresión de p27kip1. Estos resultados demuestran que en ausencia de ACTH las células pueden retirarse del ciclo celular por expresar p27Kip1. En cambio en presencia de ACTH, la supresión de p27Kip1 puede desencadenar la progresión del ciclo celular ⁽⁸⁵⁾.

Otro factor importante en el crecimiento adrenocortical es el FGF, que bajo la estimulación de ACTH, favorece la progresión de las células de la fase G₁ a la S, ya que induce la expresión de c-fos y c-jun. De esta forma la ACTH y el FGF, emplean una vía de señales intracelulares comunes para promover la progresión del ciclo celular ⁽²⁴⁾.

En nuestro modelo experimental, la disminución en los niveles de la ACTH y el aumento sostenido en las concentraciones de los GC podrían ser los factores responsables de la disminución del IPC en la corteza adrenal en los días 12 y 17 de la gestación.

Principales factores involucrados en la proliferación celular.

En la zona glomerular se producen una multitud de factores que pueden actuar de forma parácrina o autócrina. Entre estos factores se ha identificado a la serinproteasa secretora adrenal (ASP) que actúa sobre la pro- γ - MSH y forma un componente mitógeno que favorece la proliferación en la zona glomerular ⁽²²⁾.

Hay muchas moléculas que intervienen en la proliferación glomerular entre las cuales se encuentran factores de crecimiento, neurotransmisores, citoquinas, pero principalmente la Ang II y la ACTH ⁽¹¹⁹⁾.

Durante la última década, numerosos investigadores han contribuido a dilucidar el rol de los factores de crecimiento en la regulación de las funciones adrenales. Estos péptidos biológicos son multifuncionales y actúan como reguladores autócrinos o parácrinos de funciones diferenciadas ⁽⁵⁰⁾. Recientemente, se estableció el rol endócrino, parácrino y autócrino del IGF en la proliferación de las células adrenocorticales. La hormona de crecimiento regula los niveles de IGF-1; con PCR se demostró que IGF-1 y 2 y sus receptores son expresados en la glándula adrenal. IGF-1 tiene efecto en la glándula adrenal adulta, mientras que IGF-2 es el responsable del crecimiento y desarrollo de la glándula adrenal fetal ⁽¹⁰⁵⁾. En células adrenocorticales de bovino se demostró que IGF-1 incrementa el efecto de la ACTH sobre estas células, al producir un incremento en el número de receptores de ACTH; y por otro lado, que la ACTH incrementa la expresión del IGF-1. Otros estudios han demostrado que el IGF-1 conjuntamente con la ACTH y los estrógenos favorecen la proliferación de las células de la corteza adrenal ⁽¹⁰⁴⁾.

El FGF2 tiene efectos proliferativos sobre las células glomerulares pero no presenta este efecto sobre las células fasciculares o reticulares ⁽¹⁰²⁾. Este hallazgo estaría en concordancia en el contexto de proponer a la zona glomerular como sitio primario de proliferación celular y con la teoría de la migración en la cual las

células adrenales pluripotenciales migran centrípetamente y se diferencian en los diferentes tipos de células adrenocorticales ⁽¹⁸⁾. Sin embargo, las señales que estimulan el crecimiento de la zona glomerular podrían derivar de la médula. Se demostró que la Adrenomedulina es sintetizada en una variedad de tejidos incluyendo la médula adrenal, y actúa activando a MAPK 1 y 2 y esto produce la estimulación de la proliferación en las células glomerulares ⁽⁶⁾. Asimismo, se comprobó que la Grelina y su receptor se expresan abundantemente en las zonas corticales, sugiriendo una regulación parácrina y autócrina de la proliferación adrenal ⁽⁷⁾.

NPY y proliferación celular.

El NPY se caracteriza por actuar en la regulación de las funciones cerebrales y en distintos procesos fisiológicos tales como la regulación neuroendócrina de la emocionalidad incluyendo el estrés, la ansiedad y la depresión, la modulación de la liberación de GnRH desde el hipotálamo y de LH, ACTH, vasopresina y GH desde la hipófisis ^(153, 157, 161).

Es conocido que el estrés por IMO causa incrementos en las concentraciones de NPY a nivel de la corteza y de la médula adrenal ^(97, 112, 69). Sin embargo, la mayoría de los trabajos que investigan la regulación de NPY en esta glándula, no discriminan entre péptido de origen cortical y medular y en otros se asume que el origen es únicamente medular. Hay estudios que demostraron fibras inmunorreactivas para NPY en la corteza adrenal de ratas, siendo mayor la proporción en las zonas fascicular y reticular ⁽¹³⁴⁾.

Experimentos "in vivo" con dosis intraperitoneal de NPY administradas por un tiempo prolongado o por perfusión continua han obtenido una disminución de la proliferación a nivel de las zonas glomerular y fascicular, acompañado de hipertrofia glomerular ⁽¹³²⁾.

Se comprobó que la perfusión de NPY en la adrenal, produce una disminución del flujo sanguíneo local en forma dosis dependiente, posiblemente por vasoconstricción arteriolar ⁽⁶⁸⁾. Esta disminución del flujo sanguíneo podría ocasionar menor disponibilidad de factores de crecimiento que actúan en la

corteza adrenal, provocando un descenso en la proliferación en las células corticoadrenales bajo situaciones de estrés.

Aunque varios estresores incrementan el NPY adrenal, no se comprobó que esto tenga influencia en las concentraciones plasmáticas de NPY, por lo que este péptido podría considerarse como un agente parácrino de la glándula adrenal más que un producto hormonal (21).

Efectos del estrés crónico sobre el crecimiento y peso adrenal.

En la glándula adrenal adulta el crecimiento es controlado por el principio de acción y reacción. Se demostró que una serie de factores exógenos o endógenos como el medio ambiente psicosocial, el sistema inmunológico y citoquinas solubles afectan tanto su crecimiento como su función (29, 65).

De esta forma, el crecimiento y la función pueden ser interpretados como un concepto integrador (120), ya que el número y el tamaño de las células adrenales tienen un impacto directo en su función. Este concepto tiene en cuenta que la glándula adrenal es un tejido muy dinámico y que los mecanismos de crecimiento dependen de la integración de múltiples factores, incluyendo sexo, edad, ubicación dentro de la corteza adrenal y también de un gran número de condiciones fisiológicas o psicosociales a las que puede estar sometido el individuo (81).

Así, de acuerdo a los diferentes estímulos que recibe, la adrenal es capaz de actuar como un potente efector de respuestas celulares para regular su homeostasis mediante la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (72).

La adrenal tiene una asombrosa capacidad para adaptarse a diferentes tipos de estrés agudo y crónico (116). Después de la activación central del eje HHA, la ACTH desencadena una respuesta fisiológica y morfológica en la corteza adrenal. Esto produce la liberación de GC y modificaciones estructurales en la glándula, que se caracterizan por cambios en la vascularización y por la hipertrofia e hiperplasia celular (27). Estos cambios morfológicos se reflejan a nivel ultraestructural: las células adrenocorticales incrementan el número de sus mitocondrias, mientras que las membranas internas forman un patrón vesicular denso (26, 115). Además, hay

incremento del retículo endoplasmático liso y disminución en los liposomas que almacenan el colesterol ⁽²⁶⁾.

Hay evidencias que en las ratas sometidas a estrés crónico se produce una disociación entre la activación central del eje HHA y la corteza adrenal ^(47, 125). De esta forma, es frecuente que los niveles de la ACTH no estén en relación con las concentraciones elevadas crónicamente de los GC ni con la hiperplasia o hipertrofia de la glándula adrenal ⁽²⁸⁾. Esta disociación no puede ser explicada por la cinética de las hormonas hipofisarias y adrenales y sugiere un restablecimiento del eje HHA y/o de la presencia de mecanismos extrahipofisarios de regulación adrenal ⁽¹⁷⁸⁾.

Además de la ACTH, los péptidos derivados de la POMC y la innervación adrenal han sido implicados en mediar el crecimiento adrenal ^(95, 159) y también podrían estar implicados en la regulación de los efectos del estrés crónico.

Se ha observado que el incremento de la respuesta máxima de la CORT a la ACTH se asocia con un aumento proporcional de la masa adrenal. El ensanchamiento de la corteza adrenal ha sido descrito después de varios tipos de estrés crónico ^(4, 62, 140, 141, 152). Más específicamente, en la zona fascicular; la hipertrofia celular ocurre después de la exposición crónica con tolueno ⁽⁶³⁾ y la hipertrofia e hiperplasia se producen como resultado de la diabetes inducida con Streptozotocina ⁽¹³²⁾.

Estos datos apoyan la idea que el estrés crónico induce el crecimiento adrenal de una forma específica dependiendo de la zona de la corteza; por lo tanto el crecimiento y la función de la adrenal pueden variar de acuerdo a cada zona en particular ⁽¹⁶⁰⁾.

Soñez, C.A ⁽¹⁴⁷⁾ evidenció que en condiciones de estrés crónico por IMO, el peso total de las glándulas adrenales de las RE mostró una curva similar a las RC, pero se manifestó un aumento significativo de peso a favor de las RE en el día 17 de la gestación. Sin embargo, se desconocía si el mecanismo involucrado era la hipertrofia, la hiperplasia, o la disminución de la apoptosis celular.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede inferir que el IA se relaciona con el peso de las glándulas adrenales dado que en el día 17 de la gestación se

presentó en las zonas fascicular y reticular un menor IA en las RE con respecto a las RC, lo que podría contribuir al aumento de peso de la glándula.

La disminución del IA en las RE en este día de la gestación, puede ser ocasionada por el incremento en los niveles plasmáticos de estrógenos y de la PRL, ya que se comprobó que ambas hormonas ejercen una acción antiapoptótica (158, 171).

Asimismo, se demostró que la hiperprolactinemia produce incrementos del peso adrenal como consecuencia de la hipertrofia celular (145).

Además, en un estudio realizado en glándulas adrenales de individuos que tuvieron como causa de muerte el suicidio, se observó un incremento significativo del peso adrenal y un ensanchamiento a nivel de la corteza que estaba restringido a las zonas fascicular y reticular. Con técnicas inmunocitoquímicas se comprobó que el incremento en el tamaño adrenocortical se correlacionaba con una disminución en el número de las células apoptóticas en estas zonas (172).

Estos resultados evidencian cambios estructurales en las glándulas adrenales de víctimas de suicidio, dado que la adrenal actúa como un espejo reflejando los cambios funcionales del proceso de estrés, los cuales dejan una marca sobre la morfología de la glándula (172).

Con respecto a la proliferación, el IPC presentó una disminución significativa en los días 12 y 17 de la gestación en las zonas fascicular y reticular de las RE, mientras que a los 21 días no hubo diferencias entre ambos grupos.

Recientemente se ha identificado a Spexina, un polipéptido que está involucrado en la respuesta al estrés en la corteza adrenocortical de la rata. Si bien se expresa en las tres zonas de la corteza, se ha evidenciado las mayores concentraciones en las zonas fascicular y reticular. Asimismo se demostró que Spexina tiene un potente efecto inhibitor sobre la actividad proliferativa en la corteza adrenal bajo situaciones de estrés (136).

En nuestro trabajo, el estrés crónico provocó una disminución de los procesos de proliferación y apoptosis de la corteza adrenal por lo que se podría inferir que el aumento de peso de la glándula es debido a la hipertrofia celular.

En concordancia con todos estos eventos, es posible imaginar la homeostasis como un proceso regulador de la integridad del tejido que le posibilita al organismo

afrontar situaciones estresantes, como así también las demandas funcionales que dan lugar a la replicación, diferenciación, migración celular y apoptosis. Así, la ocurrencia de la apoptosis y la proliferación celular en la corteza adrenal con sus productos específicos, permiten garantizar la regulación de todos los estadios del desarrollo celular en las diferentes situaciones citofisiopatológicas a las que puede estar sometida esta glándula.

CONCLUSIONES

A) Con relación al proceso de apoptosis:

Se establece como **perfil de cambios inducidos por el estrés crónico** durante la segunda mitad de la gestación que:

-El índice apoptótico total disminuye a medida que progresa la gestación, por lo que está marcadamente influenciado por el día de la gestación.

-El índice apoptótico total presenta una disminución significativa en la corteza adrenal en el día 17 con respecto a las RC, mientras que en el día 12 y 21 no se presentan diferencias entre ambos grupos.

-El índice apoptótico se incrementa desde la zona glomerular a la reticular, donde presenta los valores más elevados. Hecho que estaría en concordancia con la teoría de la migración celular.

-En el día 12 de la gestación el índice apoptótico no presenta diferencias significativas entre las tres zonas.

-En el día 17 y 21 de la gestación el índice apoptótico de la zona glomerular es significativamente menor con respecto a las dos zonas restantes.

-En el día 17 de la gestación se presenta interacción entre las zonas fascicular y reticular, el tratamiento y el índice apoptótico. El índice apoptótico de las ratas estresadas es significativamente menor con respecto a las ratas controles, por lo que se puede inferir que el índice apoptótico se relaciona con el peso adrenal, dado que en este día se presenta un incremento del peso de la glándula conjuntamente con un menor índice apoptótico en las zonas fascicular y reticular.

-En los días 12 y 21 no se presenta interacción entre el índice apoptótico, las zonas y el tratamiento.

B) Con relación al proceso de proliferación celular:

Se establece como **perfil de cambios inducidos por el estrés crónico** durante la segunda mitad de la gestación que:

-El índice de proliferación celular total presenta diferencias significativas entre los tres días de la gestación estudiados. Presentando los menores valores en el día 17; mientras que en el 21 se encuentran los valores más elevados.

- Se evidencia interacción entre el tratamiento y el día de la gestación. El índice de proliferación celular total presenta una disminución significativa en la corteza adrenal en los días 12 y 17 de la gestación, mientras que a los 21 días no se encuentran diferencias.

-A los 12 días se presenta una disminución del índice de proliferación celular en las zonas fascicular y reticular con PCNA; y en la zona fascicular con BrDU.

-A los 17 días se presenta una disminución del índice de proliferación celular en las tres zonas con PCNA y en las zonas glomerular y fascicular con BrDU.

-La disminución del índice de proliferación celular podría deberse al incremento en los niveles plasmáticos de corticosterona los cuales actuarían inhibiendo la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular.

C) Con respecto a los procesos de apoptosis y proliferación celular se concluye que:

-Los resultados obtenidos son concordantes con la teoría de la migración celular, dado que la ocurrencia de la proliferación es predominante en las zonas

glomerular y fascicular, mientras que en la zona reticular hay un alto índice apoptótico y se encuentran escasas células proliferantes.

-El aumento de peso adrenal acompañado de incrementos en los niveles plasmáticos de la prolactina y disminución en los procesos de apoptosis y de proliferación celular permiten inferir que el mecanismo involucrado en el aumento de peso adrenal es la hipertrofia. Por otro lado, el aumento en las concentraciones plasmáticas de estrógenos podría actuar disminuyendo el índice apoptótico y de este modo, contribuir al incremento de peso de la glándula.

PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta que existen complejos mecanismos de regulación fisiológica que son alterados por el estrés crónico provocando modificaciones metabólicas y hormonales, los cuales se ven reflejados a nivel celular disminuyendo la apoptosis y la proliferación celular; y en relación a los diferentes mecanismos propuestos en este trabajo como responsables de tales cambios, algunas de las posibilidades de continuación de nuestro trabajo serían determinar en la glándula adrenal:

- 1) factores tróficos tal como IGF-1, VEGF y FGF, con el propósito de comprobar si el estrés provoca una disminución de los mismos.
- 2) NPY en la corteza adrenal para verificar si el estrés provoca un incremento del mismo.
- 3) Expresión de c-fos y c-jun para comprobar si están disminuidos en ratas estresadas.
- 4) Receptores de estrógenos y expresión de bcl-2 para verificar si están implicados en la disminución de la apoptosis.
- 5) Niveles plasmáticos de ACTH para comprobar si se presenta disociación de la ACTH y los GC en ratas estresadas crónicamente.
- 6) Relación núcleo/citoplasma en las células de las diferentes zonas de la corteza adrenal para comprobar la hipertrofia celular como responsable del aumento de peso adrenal.

ARTÍCULO PUBLICADO

Los resultados parciales obtenidos en esta tesis fueron publicados en el siguiente artículo:

"Chronic stress effects on adrenal cortex cellular proliferation in pregnant rats". Bozzo, A. A.; Soñez, C. A.; Monedero Cobeta, I.; Avila, R. E.; Rolando, A. N.; Romanini, M.C.; Lazarte, M.; Gauna, H. F.; Mugnaini, M. T. *Int. J. Morphol.* 4 (29): 1148-1157; 2011. ISSN 0717-9502.

Chronic Stress Effects on Adrenal Cortex Cellular Proliferation in Pregnant Rats

Efectos del Estrés Crónico sobre la Proliferación Celular en la Corteza Suprarrenal en Ratas Preñadas

*Aída Andrea Bozzo; *Carlos Alberto Soñez; **Ignacio Monedero Cobeta; ***Rodolfo Avila; *Alicia Nélica Rolando; *María Cristina Romanini; *Mario Lazarte; ****Héctor Fernando Gauna & *María Teresa Mugnaini

BOZZO, A. A.; SOÑEZ, C. A.; COBETA, I. A.; AVILA, R.; ROLANDO, A. N.; ROMANINI, M. C.; LAZARTE, M.; GAUNA, H. F. & MUGNAINI, M. T. Chronic stress effects on adrenal cortex cellular proliferation in pregnant rats. *Int. J. Morphol.*, 29(4):1148-1157, 2011.

SUMMARY: Chronic stress by immobilization during pregnancy may cause alterations in mechanisms maintaining homeostasis in the adrenal gland. The objective of this study was to quantify cellular proliferation index in the adrenal cortex during pregnancy second half and assess the effects of chronic stress on it. Adrenal cortex proliferation index in stressed rats showed a significant decrease at 12 and 17 days of gestation, while at day 21 it did not show differences with the control treatments. Moreover, proliferation index of reticular zones in control and experimental rats, exhibited a significant reduction in comparison to glomerular and fascicular zones of adrenal cortex during the three gestation days studied. In conclusion, chronic stress by immobilization produces a decrease in cellular proliferation index at 12 and 17 gestation days, which may be related to changes in plasmatic concentrations of corticosterone and prolactin and, to the reduction of specific growth factors. Furthermore, the observed proliferation diminishment in reticular zone regarding the other cortical zones would be consistent with the migration theory of adrenal cells.

KEY WORDS: Chronic stress; Cellular proliferation; Adrenal cortex; Pregnancy.

INTRODUCTION

Appropriate physiological responses are necessary for the survival of every organism. Hypothalamus-pituitary-adrenal and sympathetic adreno-medullary axes are the systems mainly involved in maintaining homeostasis during the stress response, and the adrenal gland is an essential organ common to both systems (Ulrich-Lai *et al.*, 2006). This latter gland is subject to dynamic structural changes including cellular proliferation and death. These two processes must be balanced to ensure integrity and functionality of the adrenal gland (Nussdorfer, 1986).

Several theories have been proposed to explain cellular replacement in the different zones of the adrenal cortex. On the one hand, migration theory describes cell proliferation in the external part of the cortex, their migration and differentiation from glomerular zone to fascicular zone and

from there to reticular zone where they end up degenerating and dying (Idelman, 1978; Wolkersdörfer & Bornstein, 1998). On the other hand, transformation theory suggests two transformation directions considering the replacement of zonal tissue by proliferative cells from the intermediate zone. This latter zone is placed between glomerular and fascicular zones and the cell migration occurs in two opposite directions: towards the medulla and towards the capsule. The transformation may occur locally either between glomerular and fascicular zones or between fascicular and reticular zones (Wolkersdörfer & Bornstein). Last but not least, zonal theory sustains that both cellular proliferation and apoptosis occur independently in each cortical zone. Therefore, each zone might be locally regulated with no effects on the others functional behavior (Swann, 1940). All these hypothesis are based upon mammals histological observations under experi-

* Biología Celular y Embriología, Dpto. de Anatomía Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. Ruta 8 Km 601 Campus Universitario.

** Fisiología Animal, Dpto. de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. España.

*** II Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

**** Fisiología Animal, Dpto. de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

mental conditions such as pharmacologic manipulation, castration or unilateral adrenalectomy. Such experimental conditions are needed to induce an increase of cellular proliferation in adrenal cortex, since in normal conditions cellular replacement in adult mammals adrenal cortex is quite slow. However, despite the numerous studies on this topic, there is still limited knowledge of adrenocortical cellular kinetics (Kataoka *et al.*, 1996).

When chronic intermittent stress of enough intensity such as immobilization is applied, an increase in adrenal gland size is observed. This size increase is much more evident in relative weight due to animal loss of body mass (Pastorino *et al.*, 1998). This may be related to a maximum increase in corticosterone (CORT) levels as a consequence of the trophic effect of adrenocorticotrophine (ACTH) hormone liberation. It is likely, although, that some other factors may be contributing to the observed response. The adrenal gland size increase is accompanied by an increase of *in vivo* and *in vitro* adrenal cortex response to ACTH (Armario & Jolin, 1989).

In clinical studies in humans and animals it was proven that circulating levels of ACTH are positively correlated to adrenal size and that the ACTH chronic hypersecretion induces diffuse bilateral hyperplasia of the adrenal gland (Kobayashi *et al.*, 2006).

ACTH is known to have a proliferative effect on adrenal gland. It was demonstrated that its chronic liberation induces extracellular signal regulated kinases (ERKs) activation and that these latter play an crucial role in cellular proliferation induction (Ferreira *et al.*, 2007).

Under chronic stress conditions, it has not been possible to determine neither if the increased weight in adrenal gland is produced by hypertrophy or hyperplasia, if cellular growth occurs everywhere in the cortex or if it is localized in only some zones (Ulrich-Lai *et al.*).

The aim of this work was to determine cellular proliferation index at the adrenal cortex of pregnant rats using two immunocytochemical techniques: proliferating cell nuclear antigen and bromodeoxyuridine at 12, 17 and 21 days of gestation, and to assess whether chronic stress is able to change or not, the adrenal cellular proliferation.

MATERIAL Y METHOD

Animals used and laboratory conditions. Wistar female rats of three to four months of age were used for the

experiment. They weighted 200 to 300 g at the beginning of the experiment. They were maintained under controlled laboratory conditions with food and water *ad libitum*, controlled photoperiod (12/12 h. light/darkness from 7.30 AM to 7.30 PM) and temperature 20 ± 2 °C (Laboratory installations met the requirements of 6344/96 disposition of the Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Argentina). The Conclusions and Recommendation on the Reduction, Refinement and Replacement of Laboratory Animals Procedure of Declaration of Bologna were followed for animal experimentation. All experiments were conducted according to the principles and procedures of the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication n° 85-23, reviewed 1985; <http://www.nih.gov/sigs/bioethics>).

Rats were cycled with colpocytograms and they were mated during the proestrous with a same strain male. For the purpose of programmed sacrifice, the pregnant day zero was stated when spermatozoid presence in vaginal fluid was verified. Pregnant rats were split into two groups that remained physically separated: control (CR) and experimental (ER) rats.

Experimental Treatment. From the fourth gestation day ER group was subject to 45 minute sessions of immobilization (IMO) stress on boards, every other day, until the day before sacrifice (Michajlovskij *et al.*, 1988). CR and ER were sacrificed by decapitation at 12, 17 and 21 days of gestation. For Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) determination, five (5) rats per gestation age group were used as CR and ER. For Bromodeoxyuridine (BrDU) determination, on the other hand, four groups were formed: control rats injected with physiological solution (C-F), control rats injected with BrDU (C-BrDU), stressed rats injected with physiological solution (E-F) and stressed rats injected with BrDU (E-BrDU). There was a minimum of 5 individuals per group. In pertinent groups, an intraperitoneal injection of 5-bromine-2'-deoxyuridine (100 mg/kg; Sigma) was applied 24 hours before sacrifice.

The adrenal glands of each pregnant rat from CR and ER groups were extracted. They were fixed in buffered formaldehyde and processed according to the conventional histological technique. Alternate sections of 5mm were obtained from adrenal cortex by means of a Reichert-Young 2065 microtome and they were mounted in each slide previously treated with Vectabond adhesive (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, USA). Glomerular, fascicular and reticular zones of the adrenal cortex were identified according to their classical histological characteristics.

Immunocytochemical Techniques. PCNA detection.

An indirect immunocytochemical method (Vectastain ABC elite kit- 6200, Vector) was used in 360 sections; 180 from CR and 180 from ER. Sections were deparaffinized and hydrated in saline phosphate buffer (PBS) pH 7.4. Then, endogen peroxidases were blocked with a 20% hydrogen peroxide solution for 30 minutes. Unspecific antibodies were neutralized with blotto (5 gr of skim milk powder solved in 100ml of PBS + 1ml of triton). Mice monoclonal antibody (Enzo Diagnostic) diluted 1:50 in PBS (pH 7.4) for 24 hours at 4 °C was used as primary anti-PCNA antibody. Sections were then incubated with second and third antibodies (Vectastain ABC elite kit- 6200, Vector) for 60 minutes at room temperature. They were revealed with a diaminobenzidine 3-3' tetrahydrochloride (DAB) (Vector) solution for 3 minutes and nuclear contrast staining was performed with 1% methyl green in sodium acetate. Finally, sections were dehydrated, cleared and mounted with Entellan (Merck).

BrDU detection. A direct immunocytochemical method (Dako, LSAB + System- HRP) was used in 360 sections; 180 from CR and 180 from ER. Sections were deparaffinized and hydrated in PBS, pH 7.4. For endogen peroxidases blocking they were put in a 30% hydrogen peroxide solution for 30 minutes. DNA was denaturalized with 2N hydrochloric acid at 37 °C for 30 minutes. Unspecific antibodies were blocked with horse serum (Vector) for 30 minutes. Mice monoclonal antibody (NCL-BrDU. Novocastra) diluted 1:200 in PBS pH 7.4 for 24 hours at 4 °C was used as primary anti-BrDU antibody. Second and third antibodies (Dako, LSAB + System- HRP) were incubated for 30 minutes at room temperature. Antigen-antibody complex was then revealed with DAB (from the kit used) for 5 minutes. Finally, after nuclear contrast staining with 1% green methyl in sodium acetate, sections were dehydrated, cleared and mounted with Entellan (Merck).

For both immunocytochemical techniques, adrenal cortex tissue without the pertinent primary antibody was used as negative control and small intestine sections as positive control.

Images Stereological Analysis. From each adrenal cortex histological section 10 to 12 images from glomerular, fascicular and reticular zones were scanned to build a raw image data base for CR and ER. A Zeiss Axiophot microscope with a built in AxioVision Zeiss digital camera and associated softwares (video-Printer Sony 3000 and Scion stereological image analysis software) was used. For each image, the number of positively marked cells either with anti-PCNA antibody or with anti-BrDU antibody (in

proliferation process) was quantified. Number of unmarked cells (contrasted with green methyl) was also quantified for each image. Cellular proliferation index (PI) was estimated as the ratio between proliferating and normal cells multiplied by 100. Data obtained were transferred to a data base in Excell software for further statistical analysis.

Statistical analysis. An exploratory and descriptive analysis was performed to study PI behavior. One and three ways ANOVAs were applied. A logarithmic linear model with Poisson distribution and including, group and time effects as well as their interactions was also applied. Differences were considered significant at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using InfoStat y SAS 9.1 softwares.

RESULTS

Considering that in materials and methods section the conformation of two groups was proposed (stress and control without BrDU injection), a test was performed with several histological slides from each group with the application of anti-BrDU antibody in order to determine if the injection caused any alteration by stress. Results for this test were negative for both groups.

Qualitative analysis of adrenal cortex cellular proliferation. PCNA marked nuclei were distributed in the three zones of adrenal cortex, but they were more abundant in CR than in ER at 12 and 17 days of gestation. BrDU marked nuclei, on the other hand, were more frequently observed in glomerular and fascicular zones and scarcer in the reticular zone for the three gestation days studied. Similar to PCNA treatment, BrDU marked nuclei were less frequent in ER (Figs. 1, 2, 3 and 4).

Quantitative analysis of adrenal cortex cellular proliferation.

A. Total PI in adrenal cortex of pregnant rats.

PCNA and BrDU. A significant ($p < 0.001$) interaction between treatment and gestation day was observed for days 12 and 17, while no interaction was recorded for day 21 (Figs. 5 and 6).

B. PI in the different adrenal cortex zones of pregnant rats.

PCNA: Both in CR and ER, PI showed a significant ($p < 0.001$) decrease in reticular zone for the three gestation days studied compared to glomerular and fascicular adrenal cortex zones (Figs. 7 and 8).

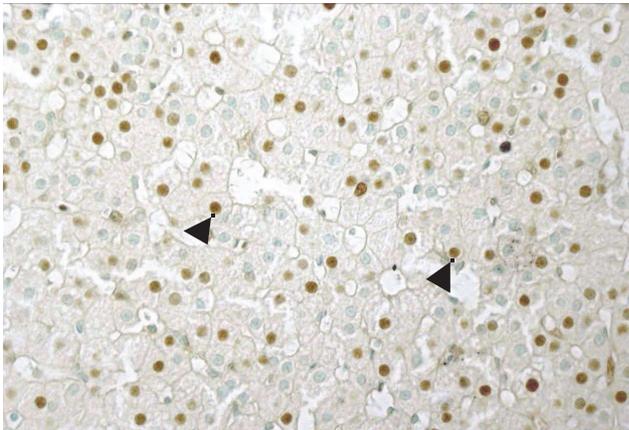


Fig. 1. Optic micrograph of the adrenal cortex of a control rat at 17 days of pregnancy treated with PCNA and stained using green methyl (400x).

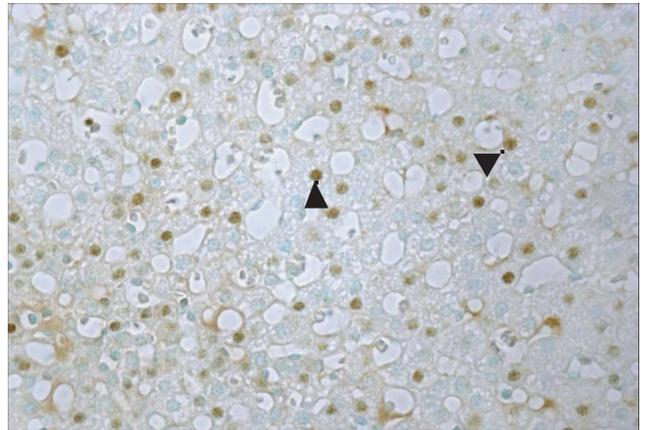


Fig. 2. Optic micrograph of the adrenal cortex of a stressed rat at 17 days of pregnancy treated with PCNA and stained using green methyl (400x).



Fig. 3. Optic micrograph of the adrenal cortex of a control rat at 12 days of pregnancy treated with BrDU and stained using green methyl (400x).



Fig. 4. Optic micrograph of the adrenal cortex of a stressed rat at 12 days of pregnancy treated with BrDU and stained using green methyl (400x).

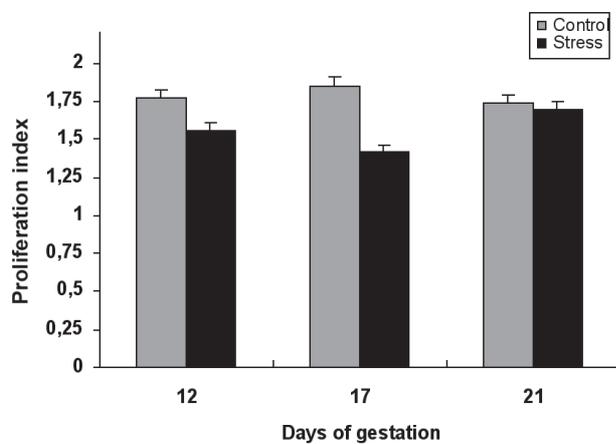


Fig. 5. Proliferation index of adrenal cortex with PCNA in pregnant rats.

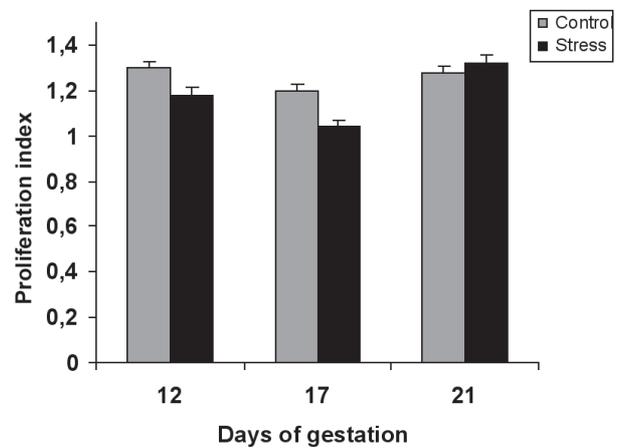


Fig. 6. Proliferation index of adrenal cortex with BrDU in pregnant rats.

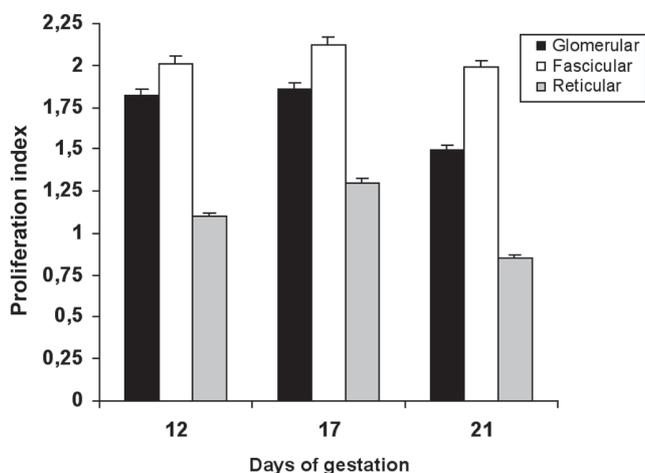


Fig. 7. Proliferation index with PCNA of adrenal cortex different zones in pregnant control rats.

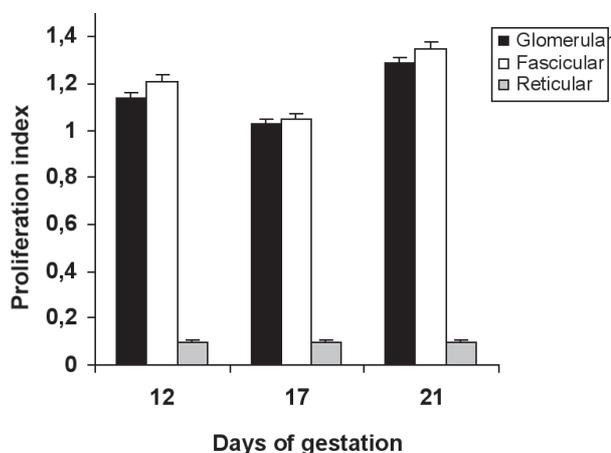


Fig. 10. Proliferation index with BrDU of adrenal cortex different zones in pregnant stressed rats.

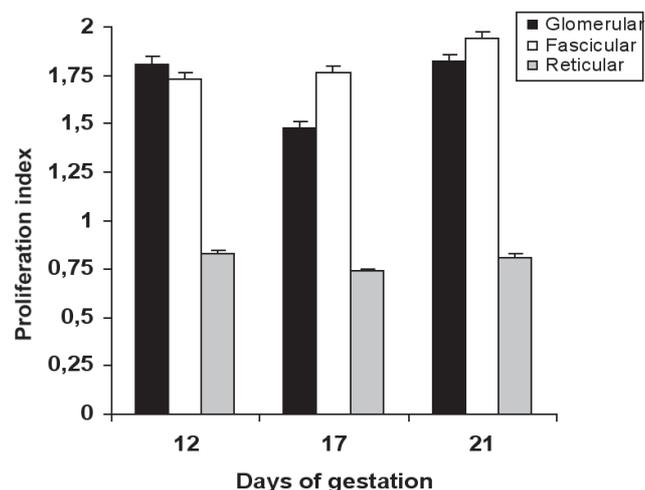


Fig. 8. Proliferation index with PCNA of adrenal cortex different zones in pregnant stressed rats.

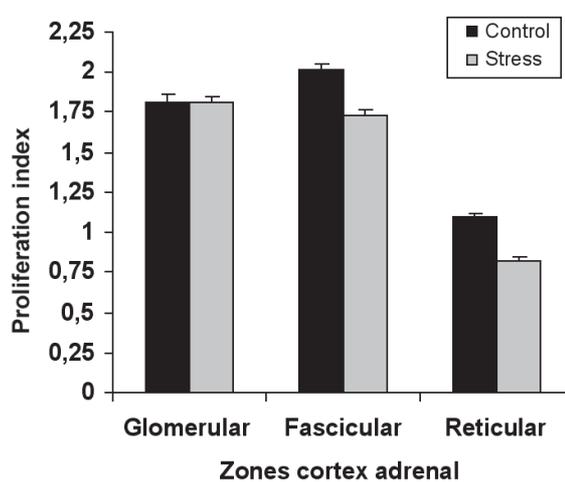


Fig. 11. Proliferation index with PCNA for adrenal cortex of pregnant rats at 12 days of gestation.

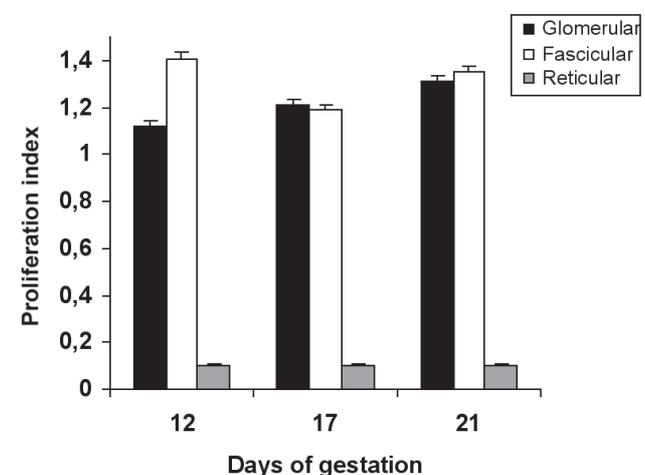


Fig. 9. Proliferation index with BrDU of adrenal cortex different zones in pregnant control rats.

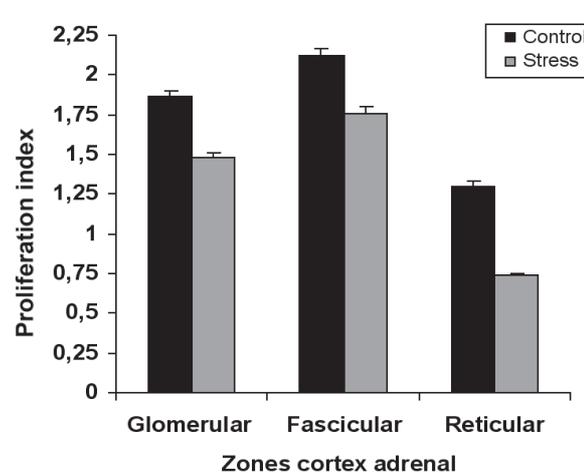


Fig. 12. Proliferation index with PCNA for adrenal cortex of pregnant rats at 17 days of gestation.

BrDU: PI of CR at gestation day 12 yielded significant differences among the three adrenal cortex zones, while PI at gestation days 17 and 21 was significantly ($p < 0.001$) lower in reticular zone than in glomerular and fascicular zones, which did not show differences from each other (Fig. 9). The reticular zone PI in ER showed a significant ($p < 0.001$) decrease regarding glomerular and fascicular zones for the three gestation days studied (Fig. 10).

C. Zone-Treatment interaction effect on PI at 12, 17 and 21 days of gestation.

PCNA: Gestation day 12: fascicular and reticular zones showed interaction with treatment and PI. ER PI was significantly lower than CR PI (Fig. 11).

Gestation day 17: all adrenal cortex zones showed interaction with treatment and PI. As in gestation day 12, ER PI was significantly lower than CR PI (Fig. 12).

Gestation day 21: no interaction was observed between adrenal cortex zones and treatment or PI (Fig. 13).

BrDU: Gestation day 12: fascicular zone showed interaction with treatment and PI. ER PI was significantly lower than CR PI (Fig. 14).

Gestation day 17: glomerular and fascicular zones presented interaction with treatment and PI. Again, ER PI was lower than that of CR (Fig 15).

Gestation day 21: there was no evident interaction of adrenal cortex zones neither with treatment nor with PI (Fig. 16).

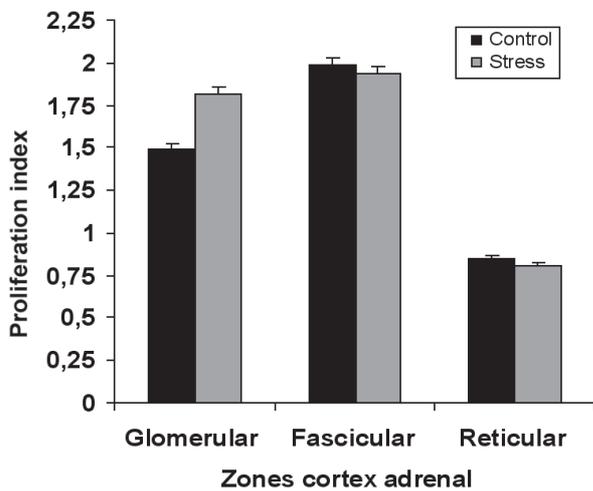


Fig. 13. Proliferation index with PCNA for adrenal cortex of pregnant rats at 21 days of gestation.

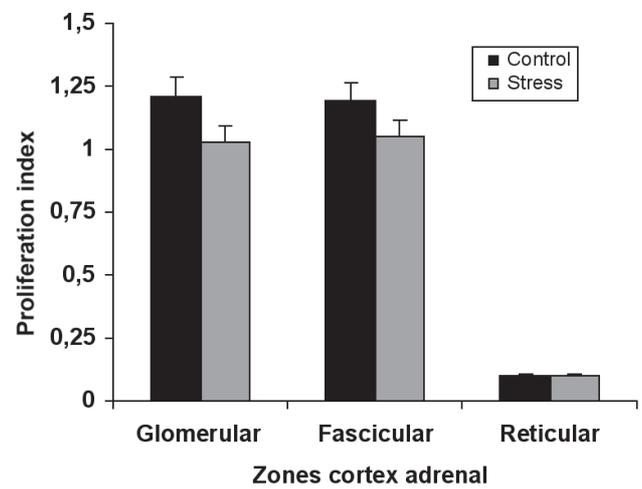


Fig. 15. Proliferation index with BrDU for adrenal cortex of pregnant rats at 17 days of gestation.

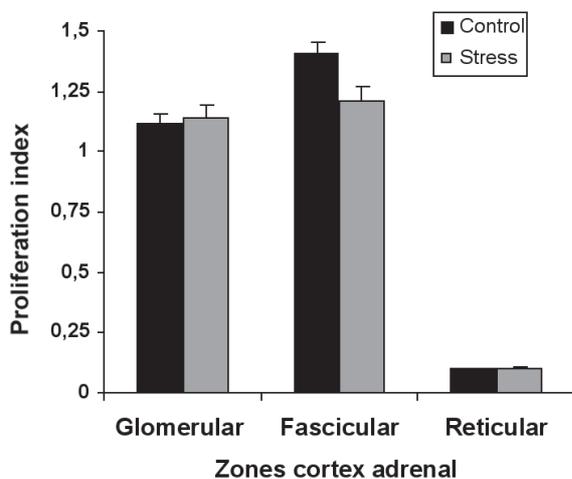


Fig. 14. Proliferation index with BrDU for adrenal cortex of pregnant rats at 12 days of gestation.

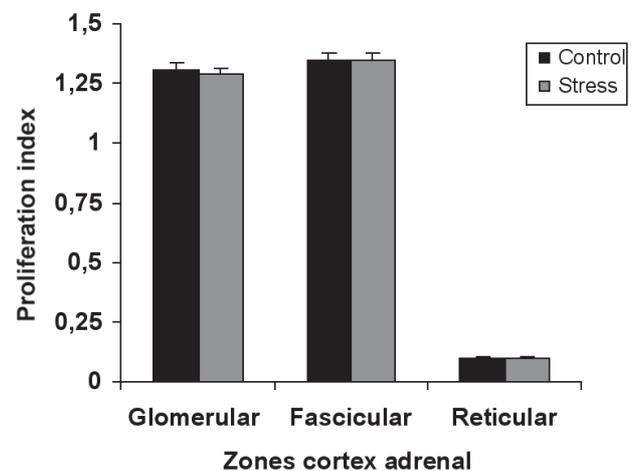


Fig. 16. Proliferation index with BrDU for adrenal cortex of pregnant rats at 21 days of gestation.

DISCUSSION

Results obtained in this study demonstrate that chronic stress produced by repeated intermittent immobilization applied during the second half of gestation period causes a decrease in PI at days 12 and 17, while it has no apparent effect at day 21. Statistical results obtained with PCNA and BrDU techniques are consistent, although PI estimated with PCNA is higher than the PI obtained by BrDU. This observed difference between techniques may be due to different marked cell populations. The fraction of cell nuclei marked with PCNA is the cell population in late G1, early S phase and DNA synthesis period, while BrDU is only incorporated in cells during DNA synthesis and repairing, offering more precise estimations (Connolly & Bogdanffy, 1993; Baccaro *et al.*, 2007).

The decrease in ER PI might be related to plasmatic levels of CORT 24 hours after immobilization stress exposure at gestation days 12, 15, 17, 19 and 21, given that stressed pregnant rats had higher plasmatic CORT levels than control rats of the corresponding gestation day (Romanini *et al.*, 1999).

These results could be explained by the effect of glucocorticoids (GC) on insulin-like growth factors, mainly type 1 (IGF-1). These growth factors are able to activate or repress specific genes promoting cell survival, proliferation and death when they interact with little hydrophobic molecules such as GC (Czech, 1989).

It has been demonstrated that IGF-1 levels diminish in response to nutrient restriction and/or hypoinsulinemia. Regarding hypoinsulinemia and stress, it is well known that metabolic activation caused by sympathetic adreno-medullary and pituitary-adrenal systems is opposite to insulin effects. That is why in stress situations insulin secretions would be inhibited most likely by a α -adrenergic direct effect on pancreas β cells (Porte & Robertson, 1973).

Furthermore, it has been described that GC mask IGF receptors, causing a decrease in cell growth (Collins *et al.*, 1994) that might be reflected in the observed PI reduction at the adrenal cortex. This shows the harmful effect produced by stress through maternal metabolic and hormonal changes that would influence IGF synthesis and/or expression via maternal GC and/or fetal GC liberated in response to stress. Plasmatic levels of CORT constitute a clear evidence of chronic stress: rat approaches delivery time and immobilization represents an intense stressogenic stimulus until the end of gestation, precluding adaptation or habituation.

In stress situations, the hypothalamus-pituitary-adrenal axis is activated and a rapid liberation of ACTH occurs. ACTH stimulates GC synthesis in the fascicular zone of the adrenal cortex. When the stimulus persists, even when it is highly intense, pituitary-adrenal hormones gradually return to normal levels. However, only ACTH displays this pattern, but not GC which remains in high levels (Martí & Armario, 1998).

Progressive reduction of ACTH is partially due to the negative feedback of GC and to the decrease in pituitary ACTH content. Pathways and signals regulating cell number and size in response to ACTH stimulation are very complex and they are the focus of multiple current research. Several authors have suggested that ACTH is a proliferative hormone that acts as a primary homeostasis regulator in adult adrenal gland, after finding a correlation between ACTH circulating levels and adrenal cortex size. On the contrary, "*in vitro*" studies have indicated that ACTH is a weakly mitogenic hormone in adrenocortical Y-1 tumor cells and anti-mitogenic hormone in cell lines and primary adrenocortical cultures from rats, mice and humans (Mattos & Lotfi, 2005). These observations suggest that "*in vivo*", ACTH is an indirect mitogenic hormone, likely mediated by other paracrine factors such as IGF and fibroblastic growth factor (FGF), which have a proliferative effect on adrenocortical cells (Vinson & Ho, 1998).

ACTH blocks progression of adrenocortical cells in G1 phase and inhibits DNA synthesis in S phase, even in presence of growth factors. After this inhibiting effect, ACTH induces expression of genes associated with cell cycle progression such as c-fos and c-jun. However, it is not clear yet whether the latter is a direct effect of ACTH or if it is a consequence of the hypertrophy and/or activation of some growth factor (Viard *et al.*, 1994).

It was also demonstrated that high ACTH plasmatic levels cause hypertrophy in adrenocortical cells (Vinson, 2003). This was observed in rats and mice treated with ACTH and, in genetic models with high concentrations of ACTH like knockout mice for GC receptors. In contrast, low plasmatic levels of ACTH in knockout mice for CRH and POMC or, in hypophysectomized rats, cause adrenocortical tissue regression with persistence of glomerular zone cells and disappearance of fascicular and reticular zone cells by apoptosis (Bland *et al.*, 2003).

ACTH exhibits this dual effect since in short inputs before the onset point in G1, it induces cell cycle progression

by promoting transition from G1 to S phase increasing cellular proliferation. On the contrary, a prolonged exposure to ACTH during G1 arrests cell growth by blocking transition to S phase (Bland *et al.*)

Another important factor in adrenocortical growth is FGF, which under ACTH stimulation, favors cells progression from G1 to S phase, since it induces c-fos and c-jun expression. Therefore, ACTH and FGF employ a common pathway of intracellular signals to promote cell cycle progression (Bland *et al.*). In our experimental model, the decrease in ACTH levels and the sustained increase in GC concentrations could be responsible for PI diminishment in adrenal cortex at 12 and 17 days of gestation. It was also proven, that prolonged high plasmatic concentrations of CORT as it occurs at gestation day 21, mask GC (Mizoguchi *et al.*, 2001) receptors and that would be the reason why there were no evident PI changes in ER at this point.

CR and ER reticular PI showed a significant decrease regarding glomerular and fascicular zones of adrenal cortex at the three gestation days studied. These results would be related to those obtained for apoptotic index (AI) both in CR and ER, since it was demonstrated that the latter shows high values in reticular zone, followed by fascicular zone and lastly by glomerular zone, where the lowest values are observed (unpublished data). These findings would be in agreement with migration theory of adrenal cells.

It was proven that parental cells proliferation is limited to the outer part of the cortex and that then adrenal cells move in centripetal direction towards the cortex inner part limiting the medulla. This process lasts approximately 100 days in rats. Approximately a half of cells dies during migration and a large number of them are eliminated by apoptosis in the reticular zone (Feige *et al.*, 1998).

PI at gestation day 12 in fascicular and reticular zones with PCNA and in fascicular zone with BrDU showed a significant reduction in ER compared to CR, while at gestation day 17 the three adrenocortical zones with PCNA and the glomerular and fascicular zones with BrDU showed a significant decrease in ER. Baccaro *et al.* demonstrated that when administrating pharmacological doses of ACTH *in vivo*, fascicular and reticular zones showed an increase in DNA synthesis and in the expression of early response genes for Jun and Fos proteins related to cycle progression. However, this effect was inhibited when animals were previously treated with dexametasone (Baccaro *et al.*). In chronic stress conditions, high CORT levels may act in the adrenal gland causing a decrease in cellular proliferation by blocking the expression of genes involved in cell cycle progression.

Immobilization stress produces an increase in Y neuropeptide (NPY) concentrations at adrenal cortex and medulla. Most studies about adrenal NPY regulation do not differentiate cortical from medullar peptide. Others assume that the origin is only medullar. Some authors however, have found immunoreactive fibers for NPY at the adrenal cortex of rats with higher proportions in fascicular and reticular zones (Renshaw & Hinson, 2001).

In vivo experiments with intraperitoneal doses of NPY administrated for a prolonged time or by continuous perfusion have obtained a proliferation reduction at glomerular and fascicular zones accompanied by glomerular hypertrophy (Renshaw & Hinson). It was demonstrated that NPY perfusion into the adrenal gland diminishes local blood flow in a dose-dependent way, probably through arteriolar vasoconstriction (Renshaw & Hinson). This diminishment of blood flow may cause a lower availability of growth factors acting at the adrenal cortex and producing a decrease in adrenocortical cellular proliferation under stress conditions.

Although several stress factors increase adrenal NPY, it still has not been proven that this may influence NPY plasmatic concentrations, so this peptide may be considered a paracrine agent of adrenal gland instead of a hormonal product (Bernet *et al.*, 1998).

Spexine, a polipeptide involved in stress response in adrenocortical rat cortex, was recently identified. Although it is expressed in the three zones of adrenal cortex, it has been found in higher concentrations in both fascicular and reticular zones. Moreover, it has been demonstrated that Spexine has a strong inhibiting effect upon proliferative activity at the adrenal cortex under stress conditions (Rucinski *et al.*, 2010).

In previous studies it was demonstrated that adrenal glands total weight in ER showed a similar curve to that of CR, but there was a significant weight increase in ER at gestation day 17 (Soñez, 2001). However, if the mechanism responsible for that weight increase was hypertrophy, hyperplasia or decreased cellular apoptosis remained unknown.

It could be inferred that AI is related to adrenal glands weight given that at gestation day 17 a lower AI was observed in fascicular and reticular zones in ER (unpublished data).

Regarding cellular proliferation, PI was higher in glomerular and fascicular zones and lower in the reticular zone. Chronic stress caused a reduction in adrenal cortex proliferation and apoptosis processes, therefore it could be

inferred that the gland increased weight would be due to cellular hypertrophy.

Besides, prolactin plasmatic levels significantly increased in ER at gestation day 17 (Soñez *et al.*, 1996). This might be a factor inhibiting apoptosis and inducing adrenal hypertrophy, since hyperprolactinemia causes increased adrenal weight as a consequence of cellular hypertrophy (Silva *et al.*, 2004).

In conclusion, chronic stress by immobilization produces a decrease in cellular proliferation index at gestation days 12 and 17, which may be related to changes in plasmatic concentrations of corticosterone and prolactin and, to the reduction of specific grow factors. Furthermore, the observed proliferation diminishment in reticular zone regarding the other cortical zones would be consistent with the migration theory of adrenal cells.

BOZZO, A. A.; SOÑEZ, C. A.; COBETA, I. A.; AVILA, R.; ROLANDO, A. N.; ROMANINI, M. C.; LAZARTE, M.; GAUNA, H. F. & MUGNAINI, M. T. Efectos del estrés crónico sobre la proliferación celular en la corteza suprarrenal en ratas preñadas. *Int. J. Morphol.*, 29(4):1148-1157, 2011.

RESUMEN: El estrés crónico por inmovilización durante la gestación puede provocar alteraciones de los mecanismos que mantienen la homeostasis en la glándula adrenal. El objetivo de este trabajo fue cuantificar el índice de proliferación en la corteza adrenal durante la segunda mitad de la gestación y comprobar los efectos que produce el estrés crónico sobre el mismo. El índice de proliferación en la corteza adrenal de ratas estresadas presentó una disminución significativa a los 12 y 17 días de gestación, mientras que en el día 21 no presentó modificaciones con respecto a sus controles. Por otro lado, el índice de proliferación de la zona reticular en ratas controles y experimentales, presentó una disminución significativa con respecto a las zonas glomerular y fascicular de la corteza adrenal en los tres días de la gestación estudiados. Se puede concluir que el estrés crónico por inmovilización produce disminución del índice de proliferación celular a los 12 y 17 días de la gestación que podría estar en relación con las variaciones de las concentraciones plasmáticas de corticosterona, prolactina, y con la disminución de factores de crecimiento específicos. Asimismo, la disminución de la proliferación en la zona reticular en relación con las otras zonas corticales estaría en concordancia con la teoría de la migración celular adrenal.

PALABRAS CLAVE: Estrés crónico; Proliferación celular; Corteza adrenal; Gestación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armario, A. & Jolin, T. Influence of intensity and duration of exposure to various stressors on serum TSH and GH levels in adult male rats. *Life Sci.*, 44(3):215-21, 1989.
- Baccaro, R. B.; Mendonça, P. O.; Torres, T. E. & Lotfi, C. F. Immunohistochemical Jun/Fos protein localization and DNA synthesis in rat adrenal cortex after treatment with ACTH or FGF2. *Cell Tissue Res.*, 328(1):7-18, 2007.
- Bernet, F.; Dedieu, J. F.; Laborie, C.; Montel, V. & Dupouy, J. P. 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. *Neurosci. Lett.*, 250(1):45-8, 1998.
- Bland, M. L.; Desclozeaux, M. & Ingraham, H. A. Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 995:59-72, 2003.
- Czech, M. P. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell*, 59(2):235-8, 1989.
- Collins, M. K.; Perkins, G. R.; Rodriguez-Tarduchy, G.; Nieto, M. A. & López-Rivas, A. Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. *Bioessays*, 16(2):133-8, 1994.
- Connolly, K. M. & Bogdanffy, M. S. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: a dual-stain comparison with 5-bromo-2'-deoxyuridine. *J. Histochem. Cytochem.*, 41(1):1-6, 1993.
- Feige, J. J.; Keramidas, M. & Chambaz, E. M. Hormonally regulated components of the adrenocortical cell environment and the control of adrenal cortex homeostasis. *Horm. Metab. Res.*, 30(6-7):421-5, 1998.
- Ferreira, J. G.; Cruz, C. D.; Neves, D. & Pignatelli, D. Increased extracellular signal regulated kinases phosphorylation in the adrenal gland in response to chronic ACTH treatment. *J. Endocrinol.*, 192(3):647-58, 2007.
- Idelman, S. *General comparative and clinical endocrinology of adrenal cortex*. In: Adrenal cortex. Jones, I. C. (Ed.). London, Academic Press, 1978. pp.1-119
- Kataoka, Y.; Ikehara, Y. & Hattori, T. Cell proliferation and renewal of mouse adrenal cortex. *J. Anat.*, 188(Pt 2):375-81, 1996.
- Kobayashi, H.; Kambe, F.; Imai, T.; Hibi, Y.; Kikumori, T.; Ohmori, S.; Nakao, A. & Seo, H. Differential expression of

- cyclin-dependent kinase inhibitors, p27Kip1 and p57Kip2, by corticotropin in rat adrenal cortex. *J. Endocrinol.*, 189(3):671-9, 2006.
- Martí, O. & Armario, A. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 16(3-4):241-60, 1998.
- Mattos, G. E. & Lotfi, C. F. Differences between the growth regulatory pathways in primary rat adrenal cells and mouse tumor cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 245(1-2):31-42, 2005.
- Michajlovskij, N.; Lichardus, B.; Kvetnansk, R. & Ponec, J. Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake, urine output and vasopressin changes in rats. *Endocrinol. Exp.*, 22(3):143-57, 1988.
- Mizoguchi, K.; Yuzurihara, M.; Ishige, A.; Sasaki, H.; Chui, D. H. & Tabira, T. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 26(5):443-59, 2001.
- Nussdorfer, G. G. Cytophysiology of the adrenal cortex. *Int. Rev. Cytol.*, 98:1-405, 1986.
- Pastorino, I. C.; Mugnaini, M. T.; Rolando, A. N.; Romanini, M. C.; Rodríguez, M. I.; Soñez, C. A. & Gauna, H. F. Effects of chronic stress on morphometrical variables of pregnant rats and their fetuses. *Biocell*, 22:71, 1998.
- Porte, D. Jr. & Robertson, R. P. Control of insulin secretion by catecholamines, stress, and the sympathetic nervous system. *Fed. Proc.*, 32(7):1792-6, 1973.
- Renshaw, D. & Hinson, J. P. Neuropeptide Y and the adrenal gland: a review. *Peptides*, 22(3):429-38, 2001.
- Romanini, M. C.; Rodríguez, N.; Mugnaini, M. T.; Rolando, A.; Soñez, C. A. & Gauna, H. Effects of chronic stress by immobilization on the plasmatic levels of corticosterone in pregnant rats. *Biocell*, 23(1):89, 1999.
- Rucinski, M.; Porzionato, A.; Ziolkowska, A.; Szyszka, M.; Macchi, V.; De Caro, R. & Malendowicz, L. K. Expression of the spexin gene in the rat adrenal gland and evidences suggesting that spexin inhibits adrenocortical cell proliferation. *Peptides*, 31(4):676-82, 2010.
- Silva, E. J.; Felicio, L. F.; Nasello, A. G.; Zaidan-Dagli, M. & Anselmo-Franci, J. A. Prolactin induces adrenal hypertrophy. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37(2):193-9, 2004.
- Soñez, C. A.; Mugnaini, M.; Becú, D.; Rolando, A.; Romanini, M. C.; Díaz, M. C.; Rodríguez, M. I. & Gauna, H. Effects of chronic stress on the plasmatic levels of PRL, FSH, LH, estradiol and progesterone in pregnant rats. *Biocell*, 14:81, 1996.
- Soñez, C. A. Efectos del estrés crónico sobre algunas poblaciones celulares adenohipofisarias durante la segunda mitad de la gestación en ratas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, 2001.
- Swann, H. The pituitary-adrenocortical relationship. *Physiol. Rev.*, 20:493, 1940.
- Ulrich-Lai, Y. M.; Figueiredo, H. F.; Ostrander, M. M.; Choi, D. C.; Engeland, W. C. & Herman, J. P. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 291(5):E965-73, 2006.
- Viard, I.; Penhoat, A.; Ouali, R.; Langlois, D.; Bégeot, M. & Saez, J. M. Peptide hormone and growth factor regulation of nuclear proto-oncogenes and specific functions in adrenal cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 50(5-6):219-24, 1994.
- Vinson, G. P. & Ho, M. M. Origins of zonation: the adrenocortical model of tissue development and differentiation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.*, 25:S91-6, 1998.
- Vinson, G. P. Adrenocortical zonation and ACTH. *Microsc. Res. Tech.*, 61(3):227-39, 2003.
- Wolkersdörfer, G. W. & Bornstein, S. R. Tissue remodelling in the adrenal gland. *Biochem. Pharmacol.*, 56(2):163-71, 1998.

Correspondence to:
Biología Celular y Embriología
Dpto. de Anatomía Animal
Facultad de Agronomía y Veterinaria
Universidad Nacional de Río Cuarto
Ruta 8 Km 601 Campus Universitario
ARGENTINA

Email: abozzo@unrc.edu.ar

Received: 06-05-2011
Accepted: 04-07-2011

BIBLIOGRAFÍA

Capítulo 5**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Achotegui Loizate, J. Los duelos de la migración: una perspectiva psicopatológica y psicosocial. Barcelona. Perdiguero, E. y J.M. Cornelles (Eds) Medicina y cultura. Ed. Bellaterra. 88-100; 2000.
2. Achotegui Loizate, J. La depresión en los inmigrantes: una perspectiva transcultural. Barcelona. Del Castillo-Olivares J L (Ed). Ed. Mayo.1-7; 2002.
3. Aguilera, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 15:321-350; 1994.
4. Aguilera, G.; Kiss, A.; Lu, A.; Camacho, C. Regulation of adrenal steroidogenesis during chronic stress. *Endocr Res* 22:433-443; 1996.
5. Alfaro Moreno, E.; García Cuéllar, C.; Dueñas González, A. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Inst Nal Cancerol (Mex)* 46(4):275-280; 2000.
6. Andreis, P.; Markowska, A.; Champion, H.; Mazzocchi, G.; Malendowicz, L.; Nussdorfer, G. Adrenomedullin enhances cell proliferation and deoxyribonucleic acid synthesis in rat adrenal zona glomerulosa: receptor subtype involved and signaling mechanism. *Endocrinol* 141:2098-2104; 2000.
7. Andreis, P.; Malendowicz, L.; Trejter, M.; Neri, G.; Spinazzi, R.; Rossi, G.; Nussdorfer, G. Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal cortex: evidence that ghrelin stimulates the growth, but not the secretory activity of adrenal cells. *FEBS Lett* 536:173-179; 2003.
8. Angoa Pérez, M. & Rivas Arancibia, S. Acciones protectoras de los estrógenos en el sistema nervioso central. *Rev Fac Med UNAM* 49(6):248-251; 2006.
9. Arias, P.; Arzt, E.; Bonet, J. Estrés y procesos de enfermedad. *Psiconeuroinmunoendocrinología. Modelos de integración mente-cuerpo*. Bs. As. Edit. Biblos 224-249; 1998.
10. Armario, A.; López Calderón, A.; Jolin, T.; Balasch, J. Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. *Neurosci Biobehav Rev* 10:245-250; 1986.

11. Armario, A. & Jolin, T. Influence of intensity and duration of exposure to various stressors of serum TSH and GH levels in adult male rats. *Life Sci* 44: 215; 1989.
12. Armario, A.; Martí, J.; Gil, M. The serum glucosa response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinol* 15:341; 1990.
13. Armario, A.; Martí, O.; Molina, T.; De Pablo, J.; Valdés, M. Acute stress markers in humans: reponse of plasma glucose, cortisol and prolactin to two examinations differing in the anxiety they provoke. *Psychoneuroendocrinol* 20: 445-453; 1995.
14. Armario, A. Fisiología y fisiopatología del estrés. El estrés crónico: aspectos clínicos y terapéuticos. Barcelona. Ed. Mayo 1(3):19-29; 2007.
15. Armelin, H.; Lotfi, C.; Lepique, A. Regulation of growth by ACTH in the Y-1 line of mouse adrenocortical tumor cells. *Endocr Res* 22:373-383; 1996.
16. Arola, J.; Heikkila, P.; Kahri, A. Biphasic efect of ACTH on growth of rat adrenocortical cells in primary culture. *Cell Tissue Res* 271:169-176; 1993.
17. Baccaro, R.; Mendoca, P.; Torres, T.; Lotfi, C. Immunohistochemical Jun / Fos protein localization and DNA synthesis in rat adrenal cortex after treatment with ACTH. *Cell Tissue Res* 328:7-18; 2007.
18. Belloni, A.; Mazzocchi, G.; Meneghelli, V.; Nussdorfer, G. Cytogenesis in the rat adrenal cortex: evidence for an ACTH induced centripetal cell migration from the zona glomerulosa. *Arch Anat Histol Embriol Exp* 61:195-205; 1978.
19. Benjamin, C.; Hiebsch, R.; Jones, D. Caspase activation in MCF7 cells responding to etoposide treatment. *Mol Pharmacol* 53: 446-450; 1998.
20. Ben-Jonathan, N. & Hnasko, R. Dopamine as a Prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22(6): 724-63; 2001.
21. Bernet, F.; Dedieu, J.; Laborie, C.; Montel, V.; Dupouy, J. Circulating neuropeptide Y and catecholamines in rat under resting and stress conditions. Arguments for an extra-adrenal origin of NPY, adrenal and extra-adrenal sources of catecholamines. *Neurosci Lett* 250: 45-48; 1998
22. Bicknell, A. Identification of a serine protease involved with the regulation of adrenal growth. *Ann Acad Sci* 994: 118-122; 2003.

-
23. Blanco, A.; Monterde, J.; Mendez A.; Artacho-Perula, E. Stereological study of normal and apoptotic cell populations in the adrenal gland in calves. *Cell Tissues Organs* 169 (1) :73-80; 2001.
24. Bland, M.; Desclozeaux, M.; Ingraham, H. Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland. *Ann Acad Sci* 995:59-72; 2003.
25. Bole-Feysot, C.; Goffin, V.; Edery, M. Prolactin and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 3:225-68; 1998.
26. Bornstein, S.; Ehrhart-Bornstein, M.; Guse-Behling, H.; Scherbaum, W. Structure and dynamics of adrenal mitochondria following stimulation with corticotropin releasing hormone (CRH). *Anat Rec* 234:255-262; 1992.
27. Bornstein, S. The adrenal functional unit. Stuttgart. Georg Thieme Verlag 1-172; 1996.
28. Bornstein, S. & Chrousos, G. Adrenocorticotropin (ACTH) and non-ACTH mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J Clin Endocrinol Metab* 84(5):1729-1736; 1999.
29. Bornstein, S. & Rutkowski, H. The adrenal hormone metabolism in the immune/inflammatory reaction. *Endocr Res* 28:719-728; 2002.
30. Bozzola, J. & Russell, L. Principles and techniques for biologists. Boston. Jones and Bartlett (Eds.) 58-97; 2000.
31. Cáceres-García, C.; Lagunas, N.; Calmarza-Font, I.; Azcoitia, I.; Diz-Chaves, Y.; García-Segura, L.; Baquedano, E.; Frago, L.; Argente, J.; Chowen, J. Gender differences in the long-term effects of chronic prenatal stress on the HPA axis and hypothalamic structures in rat. *Psychoneuroendocrinol* 35:1525-1535; 2010.
32. Calogero, A. Regulation of rat hypothalamic CRH secretion in vitro, potential clinical implications. In: Mechanism of physical and emotional stress. New York. Plenum Press 83-105; 1988.
33. Canepa, E. Proliferación o quiescencia: una difícil decisión celular. Bs. As. Celia Cotto (Ed.) UBA. *Química Viva*. 1(6):17-27; 2007.
34. Cascales Angosto, M. Bases moleculares de la apoptosis. *Ann Real Acad Nal Farm* 69(1):36-64; 2003.
35. Carsia, R.; Macdonald, G.; Gibney, J.; Tilly, K.; Tilly, J. Apoptotic cell death in the rat adrenal gland: an in vivo and in vitro investigation. *Cell Tissue Res* 283:247-254; 1996.

-
36. Carsia, R.; Nagele, R.; Morita, Y.; Tilly, K.; Tilly, J. Models to elucidate of adrenal cell death. *Endocr Res* 24(3-4):899-908; 1998.
37. Collins, M.; Perkins, G.; Rodriguez-Tarduchy, G.; Nieto, M.; López-Rivas, A. Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. *Bioessays* 16: 133-138; 1994.
38. Connolly, K.; Bogdanffy, M. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: a dual-stain comparison with 5-bromo-2-deoxyuridine. *J Histochem Cytochem* 41(1):1-6; 1993.
39. Chrousos, G. & Gold, P. The concepts of stress systems disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267:1244-1252; 1992.
40. Cremoux, P.; Rosenberg, D.; Goussard, J.; Bremont-Weil, C.; Tissier, F.; Tran-Perennou, C.; Groussin, L.; Bertagna, X.; Bertherat, J.; Raffin-Sanson, M. Expression of progesterone and estradiol receptors in normal adrenal cortex, adrenocortical tumors, and primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Endocr Relat Cancer* 15: 465-474; 2008.
41. Czech, M. Signal transmission by the insuline-like growth factors. *Cell* 59: 235; 1989.
42. Danial, N. & Korsmeyer, S. Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219; 2004.
43. De Boer, S.; Van der Guten, J.; Slangen, J. Plasma catecholamine and corticosterone response to predictable and unpredictable noise stress in rats. *Physiol Behav* 45: 789; 1989.
44. Degoeij, D.; Kvetnansky, R.; Whitnall, M.; Jezova, D.; Berkenbosch, F.; Tilders, F. Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin-releasing factor in the median eminence of rats. *Neuroendocrinol* 53:150-159; 1991.
45. Degterev, A. & Yuan, J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:378-390; 2008.
46. Eck, J.; Kuhn, C. Effect of ether stress on growth hormone during development in the neonatal rat. *Neuroendocrinol* 56:605-610; 1992.
47. Ehrhart-Bornstein, M.; Hinson, J.; Bornstein, S.; Scherbaum, W.; Vinson, G. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 19:101-143; 1998.

-
48. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495-516; 2007.
49. Feige, J.; Keramidas, M.; Chambaz, E. Hormonally regulated components of the adrenocortical cell environment and the control of the adrenal cortex homeostasis. *Horm Metab Res* 30:421-425; 1997.
50. Feige, J.; Vilgrain, I.; Brand, C.; Bailly, S.; Souchelnitskiy, S. Fine tuning of adrenocortical functions by locally produced growth factors. *J Endocrinol* 158: 7-19; 1998
51. Ferreira, J.; Cruz, C.; Neves, D.; Pignatelli, D. Increased extracellular signal regulated kinases phosphorylation in the adrenal gland in response to chronic ACTH treatment. *J Endocrinol* 192(3):647-58; 2007.
52. Fesus, L. Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Lett* 328:1-5; 1993.
53. Frankenhaeuser, M. Behavior and circulating catecholamines. *Brain Res* 31:241; 1971.
54. Fraser, A. & Evan, G. A license to kill. *Cell* 85:781-784; 1996.
55. Gadzar, A.; Oie, H.; Shackleton, C. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 50:5488-5496; 1990.
56. Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501; 1992.
57. Gewies, A. Introduction to apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm* 266 (2):504-511; 2003.
58. Gill, G. & Weidman, E. Hormonal regulation of initiation of DNA synthesis and of differentiated function in Y-1 adrenal cortical cells. *J Cell Physiol* 92:65-75; 1977.
59. Gill, G.; Ill, C.; Watson, R. Kinetics of cAMP inhibition of DNA synthesis in bovine adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* 19:113-122; 1980.
60. Glasow, A.; Breidert, M.; Haidan, A.; Anderegg, U.; Kelly, P.; Bornstein, S. 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.

-
61. Gómez González, B. & Escobar, A. Neuroanatomía del estrés. *Rev Mex Neuroci* 3(5):273-282; 2002.
62. Gosney, J. Adrenal corticomedullary hyperplasia in hypobaric hypoxia. *J Pathol* 146:59-64; 1985.
63. Gotohda, T.; Tokunga, I.; Kubo, S. Toluene inhalation-induced adrenocortical hypertrophy and endocrinological changes in rat. *Life Sci* 76: 1929-1937; 2005.
64. Guyton, A. & Hall, J. *Tratado de fisiología médica*. 9^{na} Ed. México. Editorial Interamericana. 77:1047-1058; 1997.
65. Harbuz, M. Neuroendocrine function and chronic inflammatory stress. *Exp Physiol* 87:519-525; 2002.
66. Herman, J.; Prewitt, C.; Cullinan, W. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit Rev Neurobiol* 10:371-394; 1996.
67. Herman, J.; Figueredo, H.; Mueller, N.; Ulrich-Lai, M.; Ostrander, M.; Choi, D.; Cullinan, W. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24:151-180; 2003.
68. Hinson, J.; Cameron, L.; Purbrick, A.; Kapas, S. The role of neuropeptides in the regulation of adrenal tone: effects of vasoactive intestinal polypeptide, substance P, neuropeptide Y, neurotensin, Met-enkephalin and Leu-enkephalin on perfusion medium flow-rate in the intact perfused rat adrenal. *Regul Pept* 51:55-61; 1994.
69. Hiremagalur, B.; Kvetnansky, R.; Nankova, B.; Fleischer, J.; Geertman, R.; Fukura, K.; Viskupic, E.; Sabban, E. Stress elicits trans-synaptic activation of adrenal neuropeptide Y gene expression. *Mol Brain Res* 27:138-144; 1994.
70. Hirst, J.; West, N.; Brenner, R.; Novy, M. Steroid hormone receptors in the adrenal glands of fetal and adults rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 75:308-314; 1992.
71. Ho, M. & Vinson, G. Peptide growth factors and the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 36:558-568; 1997.
72. Hoeflich, A. & Bielohuby, M. Mechanisms of adrenal gland growth: signal integration by extracellular signal regulated kinases 1/2. *J Mol Endocrinol* 42: 191-203; 2009.
73. Idelman, S. General comparative and clinical endocrinology of adrenal cortex. In: *Adrenal cortex*. London. (Ed. Jones IC) Academic Press. 1-119; 1978.

-
74. Kant, G.; Leu, J.; Anderson, S.; Mougey, E. Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav* 40:775-779; 1987.
75. Kataoka, Y.; Ikehara, Y.; Hattori, T. Cell proliferation and renewal of mouse adrenal cortex. *J Anat* 188:375-381; 1996.
76. Kendler, K.; Karkowski, L.; Prescott, C. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156: 837-41; 1999.
77. Kerr, J.; Wyllie, A.; Currie, A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257; 1972.
78. Kerr, J.F.; Gobé, G.; Winterford, C.; Harmon, B. *Methods in cell biology*. Ed. Schwartz, L. and Osborne. California. Academic Press, Inc. 46:1-19; 1995.
79. Kessler, R. The effects of stressful life events on depression. *Ann Rev Psychol* 48:191-214; 1997.
80. Kim, A. & Hammer, G. Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances. *Mol Cell Endocrinol* 265-266:10-16; 2007.
81. Kim, A.; Reuter, A.; Zubair, M.; Else, T.; Serecky, K.; Lavery, G.; Parker, K.; Hammer, G. Targeted disruption of betacatenin in Sf-1 expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development* 135:2593-2602; 2008.
82. Kim, A.; Barlasakar, F.; Heaton, J.; Else, T.; Kelly, V.; Krill, K.; Scheys, J.; Simon, D.; Trovato, A.; Yang, W.; Hamer, G. In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr Rev* 30(3):241-263; 2009.
83. Kimura, E.; Sonobe, M.; Armelin, H. Induction of FOS and JUN proteins by adrenocorticotropin and phorbol ester, but not by 3',5' cyclic adenosine monophosphate derivatives. *Mol Endocrinol* 7:1463-1471; 1993.
84. Kiuper, G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Emmark, E.; Haggblad, J.; Nilson, S.; Gustafsson, J. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol* 138:863-870; 2007.
85. Kobayashi, H.; Kambe, F.; Imai, T.; Hibi, Y.; Kikumori, T.; Ohmori, S.; Nakao, A.; Seo, H. Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 by corticotrophin in rat adrenal cortex. *J Endocrinol* 189:671-679 ; 2006.

-
86. Krishnan, N.; Thellin, O.; Buckley, D.; Horseman, N.; Buckley, A. Prolactin suppress glucocorticoid-induced thymocyte apoptotic in vivo. *Endocrinol* 144 (5):2102-2110; 2003.
87. Kroemer, G.; Pettit, P.; Zamzami, N.; Vayssiere, J.; Mignote, B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEBJ* 9:1277-1287; 1995.
88. Kuiper, G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Haggblad, J.; Nilsson, S.; Gutafsson, J. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol* 138:863-870; 1997.
89. Lazebnik, Y.; Takanashi, A.; Moir, R.; Goldman R.; Poirier, G.; Kaufmann, S.; Earnshaw, W. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:9042-9046; 1995.
90. Levine, S. & Ursin, H. What is stress? In: *Stress: Neurobiol Neuroendocrinol* (New York) Brown, M.; Koob, G.; Rivier, C. (Eds.) Marcel Dekker Inc 3:3-21; 1991.
91. Lizarbe Iracheta, M. El suicidio y la muerte celular. *Rev R Acad Cienc Exact Fis Nat (Esp)* 101(2):1-33; 2007.
92. Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.; Krieger, M.; Scott, M.; Zipursky, S.; Darnell, J. *Biología Celular y Molecular*. 5^{ta} Ed. Bs. As. Ed Médica Panamericana; 2005.
93. Lotfi, C.; Todorovic, H.; Armelin, H. Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *J Biol Chem* 272:2986-2991; 1997.
94. Lotfi, C.; Lepique, A.; Forti, F.; Schwindt, T.; Eichler, C.; Santos, M.; Rebutini, I.; Hajj, G.; Juliano, L.; Armelin, H. Proliferative signaling initiated in ACTH receptors. *J Med Biol Res* 33(10):1133-1140; 2000.
95. Lowry, P.; Silas, L.; McLean, C.; Linton, E.; Estivariz, F. Pro- γ -melanocyte-stimulating hormone cleavage in adrenal gland undergoing compensatory growth. *Nature* 306:70-73; 1983.
96. Mackay, I.; Leskovsek, N.; Rose, N. Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun* 30:5-11; 2008.
97. Malendowicz, L. Involvement of neuropeptides in the regulation of growth, structure and function of adrenal cortex. *Histol Histopathol* 8:173-186; 1993.
98. Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30(11):630-641; 2005.

-
99. Margioris, A. & Chrousos, G. (eds.) Adrenal Disorders. New Jersey. Editorial Humana Press 379-413; 2001.
100. Marin, M.; Cruz, F.; Planeta, C. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav* 90(1):29-35; 2007.
101. Martí, O.; Gavaldà, A.; Jolin, T.; Armario, A. Direct evidence for chronic stress-induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel acute stressor. *Neuroendocrinol* 60:1-7; 1994.
102. Mattos, G. & Lotfi, C. Differences between the growth regulatory pathways in primary rat adrenal cells and mouse tumor cell line. *Mol Cell Endocrinol* 254:31-42; 2005.
103. Mc. Ewen, B. & Milner, T. Hippocampal formation shedding light on the influence of sex and stress on the brain. *Brain Res* 5:343-355; 2007.
104. Mesiano, S. & Ja, R. Interaction of insulin-like growth factor II and estradiol directs steroidogenesis in the human fetal adrenal. In: *Cellular and Molecular Biology of the Adrenal Cortex*. London. Saez, J.; Brownie, A.; Capponi, A.; Chambaz, E.; Mantero, F. (Eds.) John Libbey and Company 235-245; 1992.
105. Mesiano, S. & Ja, R. Role of growth factors in the developmental regulation of the human fetal adrenal cortex. *Steroids* 62:62-72; 1997.
106. Michajlovskij, N.; Lichardus, B.; Kvetňasnsky, R.; Ponrc, J. Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake, urine output and vasopressin changes in rats. *Endocrinol Exp* 22:143-157; 1988.
107. Mitani, F.; Ogishima, T.; Miyamoto, H.; Ishimura, Y. Localization of P450 ald and p45011 beta in normal and regenerating rat adrenal cortex. *Endocrine Res* 21:413-423; 1995.
108. Mitani, F.; Mukai, K.; Miyamoto, H.; Suematsu, M.; Ishimura, Y. The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. *Biochim Biophys Acta* 1619:317-324; 2003.
109. Mizoguchi, K.; Yuzurihara, M.; Ishige, A.; Sasaki, H.; Chui, D.; Tabira, T. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinol* 26(5):443-459; 2001.
110. Murray, A. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116:221-234; 2004.

-
111. Nadal, R. & Armario, A. Mecanismo de susceptibilidad al estrés. Hipertensión y riesgo vascular. 27(3):117-124.; 2010.
112. Nankova, B.; Kvetnansky, R.; Hiremagalur, B.; Sabban, B.; Rusnak, M.; Sabban, E. Immobilization stress elevates gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: effects of adrenocorticotropin and glucocorticoids. *Endocrinol* 137:5597-5604; 1996.
113. Natelson, B.; Tapp, W.; Adamus, J.; Mittler, J.; Levin, B. Humoral indices of stress in rats. *Physiol Behav* 26:1049; 1981.
114. New, M. Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. *Ann Rev Med* 49:311-328; 1998.
115. Nussdorfer, G. Cytophysiology of the adrenal cortex. *Int Rev Cytol* 98:1-395; 1986.
116. Nussdorfer, G. & Gotardo, C. Neuropeptide Y family of peptides in the autocrine-paracrine regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res* 30:368-373; 1998.
117. Oitzl, M.; Van Haarts, A.; Sutanto, W.; De Kloet, E. Corticosterone, brain mineralocorticoid receptors (MRs) and the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: the Lewis rats as an example of increased central MR capacity and hyporesponsive HPA axis. *Psychoneuroendocrinol* 20:655-675; 1995.
118. Ortega-Camarillo, C.; Díaz-Flores, M.; Ávalos-Rodríguez, A.; Vergara-Onofre, M.; Rosales-Torres, A. La apoptosis y su importancia biomédica. *Gac Med Mex* 137:563-577; 2001.
119. Otis, M.; Campbell, S.; Payet, M.; Gallo-Payet, N. Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance de ACTH-associated functions. *J Endocrinol* 193:331-347; 2007.
120. Otis, M.; Battista, M.; Provencher, M.; Campbell, S.; Roberge, C.; Payet, M.; Gallo-Payet, N. From integrative signalling to metabolic disorders. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:224-229; 2008.
121. Pagano, M. & Gauvreau, K. *Principles of Biostatistics*. 2^{da} Ed. Pacific Grove, C.A. Duxbury Press; 2000.
122. Parhar, I. & Sakuma, Y. (Eds.) *GnRH neurons: gene to behavior*. Japan. 19:429-436; 1997.

-
123. Paulmyer-Lacroix, O.; Guillaume, V.; Anglade, G.; Grino, M.; Olivier, C. Regulation de la fonction corticotrope dans les situations de stress. *Ann Endocrinol* 56:245-251; 1995.
124. Pellerin, S.; Keramidis, M.; Chambaz, E.; Feige, J. Expression of laminin and its possible role in adrenal cortex homeostasis. *Endocrinol* 138(3):1321-1327; 1997.
125. Pignatelli, D.; Magalhaes, M.M.; Magalhaes, M.C. Direct effects of stress on adrenocortical function. *Horm Metab Res* 30:464-474; 1998.
126. Pignatelli, D.; Ferreira, J.; Vendeira, P.; Magalhaes, M.C.; Vinson, G. Proliferation of capsular stem cells induced by ACTH in the adrenal cortex. *Endocr Res* 28(4):683-691; 2002.
127. Plostky, P. Pathways to the secretion of adrenocorticotropin: a view from the portal. *J Neuroendocrinol* 3:1-9; 1991.
128. Poirier, J. Apoptosis techniques and protocols: *Neuromethods*. Humana Press. Totowa. Poirier, J. (Ed.) 33-46; 1997.
129. Porte, D. & Roberson R. Control of insulin secretion by catecholamines, stress and sympathetic nervous system. *Federation Proc* 32:1792; 1973.
130. Quaranta, V. & Plopper, G. Integrins and laminins in tissue remodeling. *Kidney Int* 51:1441-1446; 1997.
131. Rebuffat, P.; Malendowicz, L.; Belloni, A.; Mazzocchi, G.; Nussdorfer, G. Long-term stimulatory effects of neuropeptide Y on the growth and steroidogenic capacity of rat adrenal zona glomerulosa. *Neuropeptides* 11:133-136; 1988.
132. Rebuffat, P.; Belloni, A.; Malendowicz, L.; Mazzocchi, G.; Meneghelli, V.; Nussdorfer, G. Effects of streptozotocin-induced experimental diabetes on the morphology and function of the zona fasciculata of rat adrenal cortex. *Arch Biol Cell Pathol* 56:13-19; 1998.
133. Reed, J. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157:1415-1430; 2000.
134. Renshaw, D & Hinson, J. Neuropeptide Y and adrenal gland: a review. *Peptides* 22:29-438; 2001.
135. Romanini, M.; Rodríguez, N.; Mugnaini, M.; Rolando, A.; Soñez, C.; Gauna, H. Effects of chronic stress by immobilization on the plasmatic levels of corticosterone in pregnant rats. *Biocell* 23(1):89; 1999.
136. Rucinski, M.; Porzionato, A.; Ziolkowska, A.; Szyszka, M.; Macchi, V.; De Caro, R.; Malendowicz, G. Expression of the spexin gene in the rat adrenal gland

and evidences suggesting that spexin inhibits adrenocortical cell proliferation. *Peptides* 31:676-682; 2010.

137. Salazar, M. Techniques for detecting in vitro apoptosis and cell senescence and their importance in health biotechnology. *Rev Colomb Biotecnol* 11(2):152-166; 2009.

138. Sapolsky, R. Why Zebras don't get ulcers, and updated guide to stress, stress related diseases, and coping. 2^{da} Ed. New York. WH. Freeman and Company; 1998.

139. Saraste, A. & Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45:528-537; 2000.

140. Scaria, K. & Premalatha, L. Cold induced weight & volume changes in white rats. *J Exp Biol* 5:256-257; 1967.

141. Schmidt, K.; Gosselin, L.; Stanley, W. Endurance exercise training causes adrenal medullary hypertrophy in young and old Fischer 344 rats. *Horm Metab Res* 24:511-515; 1992.

142. Schulte, D.; Shapiro, I.; Reincke, M.; Beuschlein. Expression and spatio-temporal distribution of differentiation and proliferation markers during mouse adrenal development. *Genes Expr Patt* 7:72-81; 2007.

143. Schwartzman, R. & Cidlowski, A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 14:133-151; 1993.

144. Sherr, C. & Roberts, M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501-1512; 1999.

145. Silva, E.; Felicio, L.; Nasello, A.; Zaidan-Dagli, M.; Anselmo-Franci, J. Prolactin induces adrenal hypertrophy. *J Med Biol Res* 37:193-199; 2004.

146. Soñez, C.; Mugnaini, M.; Becú, D.; Rolando, A.; Romanini, M.; Díaz, M.; Rodríguez, M.; Gauna, H. Effects of chronic stress epon the plasmatic levels of PRL, FSH, LH, estradiol and progesterone in pregnant rats. *Biocell*. 14:81; 1996.

147. Soñez, C. Efectos del estrés crónico sobre algunas poblaciones celulares adenohipofisarias durante la segunda mitad de la gestación en ratas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba; 2001.

148. Stengel, A. & Taché, Y. Neuroendocrine control of the gut duringd stress: corticotropin releasing factor signaling pathways in the spotlight. *Annu Rev Physiol* 71:219-239; 2009.

-
149. Stratakis, C.; Gold, P.; Chrousos, G. Neuroendocrinology of stress: implications for growth and development. *Horm Res* 43:162-167; 1995.
150. Swann, H. The pituitary-adrenocortical relationship. *Physiol Rev* 20:493; 1940.
151. Tanaka, Y.; Yoshihara, K.; Itaya, A.; Kamika, T.; Koidde, S. Mechanism of the inhibition of the Ca, Mg, dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 259:6579-6585; 1984.
152. Tharp, G. The role of glucocorticoids in exercise. *Med Sci Sports* 7:6-11; 1975.
153. Thiele, T. & Heilig, M. Behavioral effects of NPY. In: NPY and related peptides. Berlin. Michael, M.C (Ed.) 255-282; 2004.
154. Thomas, M.; Keramidas, M.; Monchaux, E.; Feige, J. Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. *Endocrinol* 145(9):4320-4329; 2004.
155. Thornberry, A. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316; 1998.
156. Thurmond D, Baillie R, Goodridge A. Regulation of the action of steroid/thyroid hormone receptors by medium-chain fatty acids. *J Biol Chem* 273:15373-15381; 1998.
157. Traverso, J.; Ravaglia, M.; Visio, P.; Maggese, M.; Paz, D. Localization of neuropeptide Y-like immunoreactive structures in the brain of the pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Teleostei atheriniformes) *Anat Histol Embriol* 31:1-7; 2002.
158. Tronko, M.; Kovzun, O.; Grinchenko, E.; Mikosha, A. Effect of 17 beta-estradiol on mRNA expression of Bax proapoptotic protein and DNA fragmentation level in the human adrenal cortex. *J Biochem* 81(2):80-84; 2009.
159. Ulrich-Lai, Y. & Engeland, W. Hyperinnervation during adrenal regeneration influences the rate of functional recovery. *Neuroendocrinol* 71: 107-123; 2000.
160. Ulrich-Lai, Y.; Figueredo, H.; Ostrander, M.; Choi, D.; Engeland, W.; Herman, J. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Endocrinol Metab* 291(5):965-973; 2006.
161. Urban, J.; Dantoin-Baver, A.; Levine, J. Neuropeptide Y gene expression in the Arcuate Nucleus: sexual dimorphism and modulation by testosterone. *Endocrinol* 132:139-145; 1993.

-
162. Van Engeland, M.; Ramaekers F.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24:131-139; 1996.
163. Viard, I.; Penhoat, R.; Ouali, T. Peptide hormone and growth factor regulation of nuclear proto-oncogenes and specific functions in adrenal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 50:219-224; 1994.
164. Vidal, A. & Koff, A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247:1-15 ; 2000.
165. Vigas, M. Contribution to the understanding of the stress concept in catecholamines and stress: recent advance. New York. E. Usdin, R. Kvetnansky, I. J. Kopin (Eds.) Elsevier North. 573.; 1980.
166. Vinson, G.; Hinson, J.; Toth, I. The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J Neuroendocrinol* 6:235-246; 1994.
167. Vinson, G. & Ho, M. Origins of zonation: the adrenocortical model of tissue development and differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:91-96; 1998.
168. Vinson, G. Adrenocortical zonation and ACTH. *Microsc Res Tech* 61: 227-239; 2003.
169. Virtanen, I.; Korhonen, M.; Petajaniemi, N.; Karhunen, T.; Thornell, L.; Sorokin, L.; Konttinen, Y. Laminin isoforms in fetal and adult human adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4960-4966; 2003.
170. Wang, J. & Milner, R. Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrins via MAP kinase signalling. *J Neurochem* 96:148-159; 2006.
171. Weimann, E.; Baixeras E.; Zamzami, N.; Kelly P. Prolactin blocks glucocorticoid induced cell death by inhibition the mitochondrial membrane. *Leuk Res* 23(8):751-762; 1999.
172. Willenberg, H.; Bornstein S.; Dumser, T.; Ehrhart-Bornstein, M.; Barocka, A.; Chrousos, G.; Scherbaum, W. Morphological changes in adrenal from victims of suicide in relation to altered apoptosis. *Endocr Res* 24(3-4):963-967; 1998.
173. Wolkersdorfer, G.; Bornstein-Ehrhart, M.; Brauer, S.; Marx, C.; Scherbaum, W.; Bornstein; S. Differential regulation of apoptosis in the normal human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4129-4136; 1996.
174. Wolkersdorfer, G. & Bornstein, S. Tissue remodelling in the adrenal gland. *Biochemical Pharmacol* 56:163-171; 1998.

175. Wyllie, A. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555–556; 1980.

176. Xia, Y. & Wikberg, J. Localization of ACTH receptor mRNA by in situ hybridization in mouse adrenal gland. *Cell Tissue Res* 286:63-68; 1996.

177. Zarrow, M.; Philpott, J.; Denenberg. Passage of C-4 corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. *Nature* 226:1058-1059; 1970.

178. Zelena, D.; Mergl, Z.; Foldes, A.; Kovácks, K, Toth, Z.; Makara, G. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E1110-1117; 2003.

179. Zentella-Dehesa, A. & Alcántara-Hernández, R. Importancia de los dominios de interacción proteica en la formación de complejos en los sistemas de transducción. *REB* 22:117-129; 2003.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

- α -MSH:** hormona α -melanocitoestimulante
- ACTH:** hormona adrenocorticotrofina
- ACTHR:** receptor de ACTH
- AIF:** factor activador de proteínas apoptóticas
- AIP:** proteínas inhibidoras de la apoptosis
- AG:** angiotensina
- ANOVA:** análisis de la varianza
- APAF:** factor activador de proteasas apoptóticas
- ASP:** serinproteasa secretora adrenal
- ATM:** Ataxia Telangiectasia Mutated
- ATP:** adenosín trifosfato
- AVP:** arginina-vasopresina
- β -HSD:** beta hidroxiesteroide deshidrogenasa
- BrdU:** bromodeoxyuridina
- CA:** catecolaminas
- CBrDU:** grupo control inyectado con BrdU
- CF:** grupo control inyectado con solución fisiológica
- CARD:** dominio de reclutamiento de las caspasas
- CDK:** quinasas dependientes de ciclinas
- CKI:** Inhibidores de ciclinas
- CORT:** corticosterona
- CRH:** hormona liberadora de ACTH
- DAB:** diaminobenzidina
- DD:** dominio de muerte
- DED:** dominios efectores de muerte.
- DISC:** complejo de señalización de muerte
- DNA:** ácido desoxiribonucleico
- DNA-PK:** proteínquinasa dependiente de DNA:
- EBrdU:** grupo estrés inyectado con BrdU
- EF:** grupo estrés inyectado con solución fisiológica
- ER:** receptor de estrógeno

ERKs: quinasas reguladas por señales extracelulares
FADD: proteína adaptadora de FAS
FASL: ligando de FAS
FGF: factor de crecimiento fibroblástico
GC: glucocorticoides
GnRH: hormona hipotalámica liberadora de gonadotrofinas
GR: receptor de GC
HA (eje): eje hipofisiario-adrenal
H/E: hematoxilina/eosina
HHA (eje): eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal
IA: índice apoptótico
IAP: inhibidor de proteínas apoptóticas
IGF: factor de crecimiento insulínico
IPC: índice de proliferación celular
LH: hormona luteinizante
IMO: inmovilización
LC: locus coeruleus
MAPK: quinasas activadas por mitógenos
MC2R: receptor de melanocortina
MEC: matriz extracelular
MR: receptor de mineralocorticoides
MSH: hormona melanocito estimulante
NA: noradrenalina
NPY: neuropéptido Y
OX: oxitocina
PARP: poli ADP ribosa polimerasa
PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular
PIF: factor inhibidor de PRL
POMC: pro-opiomelanocortina
pRB: proteína del retinoblastoma
PRL: prolactina
PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo
RIA: radioinmunoensayo
RC: ratas madres controles

RE: ratas madres estresadas

ROS: especies reactivas de oxígeno

SMA: sistema simpático-médulo-adrenal

SNC: sistema nervioso central

TEM: microscopio electrónico de transmisión

TGF β : factor de crecimiento transformante beta.

TNF: factor de necrosis tumoral

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral

VEFG: factor de crecimiento endotelial vascular

VIP: péptido intestinal vasoactivo