

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL 17 β -ESTRADIOL Y EL RECEPTOR 5-HT_{1A} EN LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES EN UN MODELO ANIMAL DE DEPRESIÓN.

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Doctora en Biología Experimental**

P R E S E N T A

M. en B.E. Ofelia Limón Morales.

Comité tutorial:

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Dr. Gonzalo Vázquez Palacios

Dra. Marcela Arteaga Silva

Dr. Cesar Soria Fregozo

El presente trabajo fue realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, en el laboratorio de Farmacología Conductual y Reproductiva, bajo la dirección de la Dra. Herlinda Bonilla Jaime y el Dr. Gonzalo Vázquez Palacios; en el laboratorio de Psicobiología del Centro Universitario de los Lagos, perteneciente a la Universidad de Guadalajara, con la asesoría del Dr. Cesar Soria Fregozo y en el laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la asesoría de la Dra. Marcela Arteaga Silva y el Dr. Julio Rojas Castañeda. La alumna Ofelia Limón Morales recibió apoyo de CONACyT, número de registro (CVU/Becario) 268133/ 224660.

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020

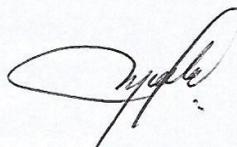
El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Evaluación de la participación de 17β -estradiol y el receptor $5-HT_{1A}$ en las alteraciones conductuales en un modelo animal de depresión", que presentó la alumna Ofelia Limón Morales. El día 12 de Enero del año 2015.

Sinodales:

Dra. Marcela Arteaga Silva

Profesor-Investigador Titular C
Departamento de Biología de la
Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-
Iztapalapa

(Presidenta)



Dra. Marisela Hernández González

Profesor Investigador
Instituto de Neurociencias. Universidad de
Guadalajara.

(Secretaria)



Dr. Julio César Rojas Castañeda

Investigador
Laboratorio de Biología de la
Reproducción. Instituto Nacional de
Pediatria

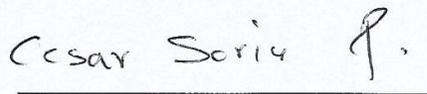
(Vocal)



Dr. Cesar Soria Fregozo

Profesor-Investigador
Departamento de Ciencias de la Tierra y
de la Vida.
Centro Universitario de los Lagos,
Universidad de Guadalajara.

(Vocal)



Comité Tutorial

Codirectora

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Profesor-Investigador Titular C

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Codirector

Dr. Gonzalo Vázquez Palacios

Profesor-Investigador

Colegio de Ciencia y Tecnología
Universidad Autónoma de la Ciudad de México
San Lorenzo Tezonco

Asesores

Dr. Cesar Soria Fregozo

Profesor-Investigador

Centro universitario de los Lagos
Universidad de Guadalajara

Dra. Marcela Arteaga Silva

Profesor-Investigador Titular C

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

DEDICATORIAS

A mis Padres

Gracias por sus enseñanzas y ejemplo de honestidad y trabajo. Gracias por siempre apoyarme e impulsarme en esta larga carrera, finalmente y después de muchas penurias llegamos. **GRACIAS**, este logro es tanto suyo como mío.

A mis hermanas

Gracias por estar aquí siempre. Gracias por los recuerdos, por las risas y los juegos, pero sobre todo gracias por seguir conmigo en buenas y malas.

A mis pequeños ya no tan pequeños (Isaac, Nataly y Alison)

Gracias por su inocencia y porque siempre me hacen olvidar que la vida a veces es complicada.

A Isaac

Gracias por ser el mejor compañero de vida, gracias por tu apoyo incondicional (y por la paciencia que me tienes, sobre todo estos días), eres la mejor de mis decisiones. Eres la mejor persona que conozco, gracias por los años compartidos y porque aunque a veces sea difícil seguimos juntitos. TE AMU MUCHO, MUCHO!!!

A la memoria de mi abuelito Patricio Limón

Hace un año que te adelantaste en el camino pero siempre estarás presente en nuestra memoria. Gracias por tu ejemplo, en donde quiera que estés quiero que sepas que este logro también es gracias a ti.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores

Dra. Herlinda Bonilla Jaime, Dr. Gonzalo Vázquez Palacios, Dra. Marcela Arteaga Silva y Dr. Cesar Soria Fregozo, por su apoyo y paciencia, gracias a sus comentarios y sugerencias para la realización tanto de los experimentos como este escrito. Y sobre todo infinitas gracias por la confianza.

A mis sinodales

Dra. Marcela Arteaga Silva, Dra. Marisela Hernández González, Dr. Julio César Rojas Castañeda y Dr. Cesar Soria Fregozo. Por sus valiosas aportaciones para la realización de esta tesis, gracias por el tiempo y la dedicación invertidos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio

Malinalli Brianza, Ana López, Joel Hernández, Tabata Mendoza y todos los que han pasado por el laboratorio, gracias por el apoyo y hacer más amenos los días de trabajo.

A CONACyT

Por apoyarme económicamente durante la realización de mi doctorado. (CVU/Becario) 268133/ 224660.

RESUMEN

En la actualidad, la depresión es una de las enfermedades mentales más comunes e incapacitantes, constituye un grave problema de salud a nivel mundial. El tratamiento neonatal con clomipramina (CMI) en ratas se ha considerado como un modelo de depresión, ya que en la edad adulta produce alteraciones que se asemejan a signos de la depresión en humanos. Dichas alteraciones han sido atribuidas a deficiencias en sistemas de neurotransmisión como; el noradrenérgico y serotoninérgico provocadas por el tratamiento en etapas críticas del desarrollo. Dentro de las alteraciones en el sistema serotoninérgico encontramos niveles disminuidos de serotonina (5-HT) en áreas límbicas, un incremento de la conducta de inmovilidad acompañado de disminución del nado en la prueba de nado forzado (PNF) y alteraciones en la expresión de ARNm del receptor 5-HT_{1A} en núcleo del rafe, hipotálamo e hipocampo. Por otro lado, ratas tratadas con CMI muestran un deterioro de la conducta sexual masculina (CSM), cuyo despliegue es controlado por hormonas como la testosterona (T), que se metaboliza a dihidrotestosterona (DHT) y 17-β estradiol (E₂), esta última ha sido relacionada con los efectos centrales de la T sobre la cópula, así como de regular procesos fisiológicos como el estado de ánimo. El interés del presente trabajo fue analizar el papel del receptor 5-HT_{1A} y del E₂ en las alteraciones conductuales que presentan las ratas tratadas neonatalmente con CMI. Para lo cual se utilizaron ratas Wistar a las que se les administro CMI o solución salina en la etapa neonatal (8-21 días de edad). Tres meses después se dividieron en grupos para realizar los siguientes objetivos; 1) Análisis de la participación de los receptores 5-HT_{1A} pre y post sináptico en el efecto del agonista 8-hydroxy-2-(di-npropylamino) tertralina (8-OH-DPAT) en la PNF, 2) Análisis del posible efecto antidepressivo de E₂ a través de la PNF en ratas CMI, 3) Efecto del tratamiento neonatal con CMI sobre la motivación sexual, 4) Efecto de la administración de E₂ y DHT sobre la motivación en ratas tratadas neonatalmente con CMI, 5) Efecto de la administración neonatal con CMI sobre las concentraciones séricas de T y E₂ y 6) Análisis del efecto del tratamiento con CMI sobre a expresión de receptores a estrógenos α y β en núcleo del rafe, hipotálamo e hipocampo. Nuestros resultados indican que el efecto antidepressivo de 8-OH-DPAT es mediado por el receptor 5-HT_{1A} post-sináptico ya que no se altera por el bloqueo de la síntesis de 5-HT. Por otro lado, el tratamiento neonatal con CMI afecta el despliegue conductual en la PNF, incrementando la inmovilidad y disminuyendo la conducta de nado, alteraciones que se ven revertidas por la administración de E₂; efecto que posiblemente esta mediado por una mejora en la función de la neurotransmisión serotoninérgica. Así también la administración de CMI provoca disminución en la motivación sexual, la cual se ve revertida por la administración de E₂ y DHT. Además, el tratamiento neonatal no produce cambios en las concentraciones séricas de T y E₂, sin embargo se requieren mediciones de la producción de estas hormonas a nivel cerebral para dar resultados concluyentes. Por otro lado el tratamiento con CMI induce una disminución en la expresión de los REβ en núcleo del rafe dorsal y región CA3 del hipocampo que se acompaña de un aumento en la expresión de REα y REβ en NPOm indicando que este podría ser uno de los mecanismos por el cual CMI produce las alteraciones en la CSM y la motivación. Sin embargo es necesario el análisis de los receptores en otras áreas cerebrales relacionadas con la conducta sexual y la regulación de estado de ánimo.

ABSTRACT

Currently depression is one of the most common and debilitating mental illness, a serious health problem worldwide. Neonatal treatment with clomipramine (CMI) in rats has been considered a model of depression, as in adulthood produces alterations that resemble signs of depression in humans. Such alterations have been attributed to deficiencies in neurotransmitter systems such as; noradrenergic and serotonergic caused by treatment at critical stages of development. Among the changes in the serotonergic system are decreased levels of serotonin (5-HT) in limbic areas, increased immobility behavior accompanied by decreased swim in forced swimming test (FST) and alterations in mRNA expression of the 5-HT_{1A} receptor in raphe nucleus, hypothalamus and hippocampus. On the other hand rats treated with CMI show a deterioration of male sexual behavior (MSB), whose deployment is controlled by hormones such as testosterone (T), which is metabolized to dihydrotestosterone (DHT) and 17- β estradiol (E₂), the latter has been linked to the central effects of T on the copula, as well as regulating physiological processes such as mood. The interest of this study was to analyze the role of the 5-HT_{1A} and E₂ in behavioral disorders presented neonatally with CMI treated rats. For which Wistar rats were administered saline CMI or neonatally (8-21 days old) were used. Three months later they were divided into groups for the following purposes; 1) Analysis of the involvement of 5-HT_{1A} receptors pre and post synaptic on the effect of the agonist 8-hydroxy-2-(di-npropylamin) tertralin (8-OH-DPAT) in the forced swimming test (FST) , 2) Analysis of the possible antidepressant effect of E₂ through the CMI FST in rats, 3) Effect of neonatal treatment with CMI on sexual motivation, 4) effect of administration of E₂ and DHT on motivation in rats treated neonatally with CMI, 5) Effect of neonatal CMI administration on serum concentrations of T and E₂ and 6) Analysis of the effect of treatment with CMI to expression of estrogen receptors (ER) α and β in the raphe nucleus, hypothalamus and hippocampus. Our results indicate that the antidepressant effect of 8-OH-DPAT is mediated by postsynaptic 5-HT_{1A} receptor as it is not disturbed by blocking 5-HT synthesis. Furthermore neonatal treatment with CMI deployment affect behavioral FST, increasing immobility and decreasing swimming behavior, alterations are reverted by the administration of E₂ effect of possibly through enhance serotonergic neurotransmission. So CMI administration also causes diminution in sexual motivation, which is reversed by administration of E₂ and DHT. Also, neonatal treatment produces no change in serum T and E₂ however require performance measurements these sexual hormones in the brain to give conclusive results, moreover CMI treatment induces a decrease in expression of ER β in dorsal raphe nucleus and hippocampal CA3 region which is accompanied by an increase in ER α and ER β expression in mNPO indicating that this could be one of the mechanisms by which CMI produces alterations in the MSB and motivation however it requires analysis of other receptors related to sexual behavior and mood regulation areas.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Depresión.....	1
1.1.1 <i>Sintomatología y diagnóstico</i>	2
1.2. Sistema Serotoninérgico.....	3
1.2.1. <i>Receptores 5-HT_{1A}</i>	5
1.3. Neuroquímica de la depresión.....	8
1.3.1. <i>Hipótesis monoaminérgica</i>	8
1.4. Neuroanatomía de la depresión.....	9
1.4.1. <i>Núcleo del rapé</i>	10
1.4.2. <i>Hipotálamo</i>	11
1.4.3. <i>Hipocampo</i>	13
1.5. Estrógenos.....	15
1.5.1. <i>Mecanismo de acción de hormonas estrogénicas</i>	16
1.6. Hormonas y depresión.....	19
1.6.1. <i>E₂ y sistema serotoninérgico</i>	21
1.7. Conducta sexual masculina (CSM) y motivación sexual.....	23
1.7.1. <i>Aspectos neuroendocrinos de la CSM</i>	26
2. ANTECEDENTES.....	28
2.1. Modelo de depresión inducido neonatalmente por clomipramina (CMI).....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. OBJETIVO GENERAL.....	33
4. 1. Objetivos particulares.....	33
5. HIPOTESIS.....	34
6. METODOLOGIA.....	35
6.1. Modelo animal de depresión neonatalmente inducido por CMI	35
6.2. <i>Análisis de la función de los receptores 5-HT_{1A} pre y post-sinápticos en la prueba de nado forzado (PNF)</i>	35
6.3. Evaluación del efecto antidepresivo de E ₂ en la PNF.....	37
6.4. Análisis de la motivación sexual en ratas tratadas neonatalmente con CMI.....	37

6.5. Efecto la administración de E ₂ , E ₂ +DHT, DHT y T en la motivación sexual en ratas CMI.....	41
6.6. Efecto del tratamiento con CMI sobre las concentraciones séricas de E ₂ y T.....	41
6.7. <i>Análisis de la población neuronal y expresión de los receptores a estrógenos α y β en núcleo del rafe dorsal, hipotálamo e hipocampo de ratas tratadas con CMI..</i>	42
6.7.1. <i>Preparación de los tejidos para inmunohistoquímica por flotación.....</i>	42
6.7.2. <i>Técnica de Nissl.....</i>	43
6.7.3. <i>Inmunohistoquímica.....</i>	47
6.7.4. <i>Determinación morfométrica.....</i>	48
6.8. Análisis estadístico.....	49
7. RESULTADOS.....	50
7.1. <i>Análisis de la función de los receptores 5-HT_{1A} pre y post-sinápticos en la PNF.....</i>	50
7.2. Evaluación del efecto antidepresivo de E ₂ en la PNF.....	51
7.3. Análisis de la motivación sexual en ratas tratadas neonatalmente con CMI.....	52
7.4. Efecto la administración de E ₂ , E ₂ +DHT, DHT y T en la motivación sexual en ratas CMI.....	55
7.5. Efecto del tratamiento con CMI sobre las concentraciones séricas de E ₂ y T...	56
7.6. Análisis de la población celular y expresión de los receptores a estrógenos α y β en núcleo del rafe dorsal, hipotálamo e hipocampo de ratas tratadas con CMI.	56
A. <i>Evaluación de la población neuronal.....</i>	56
B. <i>Evaluación por Inmunohistoquímica de la expresión de REα y REβ.....</i>	60
<i>Núcleo del rafe dorsal.....</i>	60
<i>Área preóptica media (APOm) y núcleo preóptico medio (NPOm).....</i>	61
<i>Hipocampo.....</i>	64
8. DISCUSIÓN.....	67
8.1. <i>Modelo de depresión inducida neonatalmente por CMI.....</i>	67
8.2. <i>Análisis de la función de los receptores 5-HT_{1A} pre y post-sinápticos en la PNF en la PNF.....</i>	71
8.3. <i>Efecto antidepresivo de E₂ en la PNF.....</i>	72
8.4. <i>Análisis de la motivación sexual en ratas tratadas neonatalmente con CMI....</i>	77

8.5. Efecto la administración de E_2 , E_2 +DHT, DHT y T en la motivación sexual en ratas CMI y efecto del tratamiento con CMI sobre las concentraciones séricas de T y E_2	82
8.6. Análisis de la población neuronal y expresión de los receptores a estrógenos α y β en núcleo del raqué dorsal, hipotálamo e hipocampo de ratas tratadas con CMI.....	86
9. CONCLUSIONES	92
10. PERSPECTIVAS	93
11. REFERENCIAS	94
ANEXO I	122
ANEXO II	123
ANEXO III	125

ABREVIATURAS

5-HIAA	5-hidroxi-indol acético
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5HTT	Transportador de 5-HT
8-OH-DPAT	8-hydroxy-2-(di-npropylamino) tertralina
ACTH	Hormona corticotrófica
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AMPc	Adenin monofosfato cíclico
APOm	Área preóptica media
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BSA	Albumina de suero bovino
CA	Cuerno de Amón
CIE-10	Clasificación Internacional de Enfermedades
CMI	Clomipramina
CON	Control tratado neonatalmente con solución salina
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CSM	Conducta sexual masculina
D.O.	Densidad óptica
DAB	Diaminobenzidina
DBD	Dominio central de unión al ADN
DES	Dietilestilbestrol
DHT	Dihidrotestosterona
DPN	(4-hidroxifenil)-propionitrilo
DSM-IV	Asociación Americana de Psiquiatría
E	Día embrionario
E₁	Estrona
E₂	17β-estradiol
E₃	Estriol
EE₂	Etinil estradiol

ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
ERαKO	Knockout de REα
FE	Frecuencia de eyaculaciones
FSL	Línea sensible de ratas Flinders
GD	Giro dentado
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHG	Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas
HR	Hit rate o tasa de aciertos
Ig	Inmunoglobulinas
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
KO	Knockout
LBD	Dominio de unión a ligando
LE	Latencia de eyaculación
LI	Latencia de intromisión
LM	Latencia de monta
MAO	Monoamin oxidasa
MSI	Motivación sexual incentiva
NA	Noradrenalina
NAM	Núcleo de la amígdala media
NI	Número de intromisiones
NM	Número de montas
NPOm	Núcleo preóptico medial
ORQ	Castrado u orquidectomizado
P	Día posnatal
PBS	Phosphate-buffered saline
PCPA	Paraclorofenilalanina
PET	Tomografía de emisión de positrones
PNF	Prueba de nado forzado
PR	Intervalo posteyaculatorio o periodo refractario
RE	Receptor a estrógenos
REα y	Receptor a estrógenos α
REβ	Receptor a estrógenos β

RIA	Radioinmunoensayo o radioinmunoanálisis
SERM	Moduladores selectivos de RE
SMOR	Sueño de movimientos oculares rápidos
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
T	Testosterona
TPH	Triptófano hidroxilasa
VHM	Núcleo ventromedial del hipotálamo
βERKO	Knockout de REβ

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Depresión

Dentro de los desórdenes del estado de ánimo, la depresión se ha convertido en años recientes en una de las enfermedades psiquiátricas más relevantes y en un grave problema de salud pública debido tanto a su alta prevalencia como a la incapacidad que produce. La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2008) prevé que si las tendencias demográficas continúan, para el año 2030 la depresión mayor será la mayor causa de discapacidad a nivel mundial. La Encuesta Mundial de Salud Mental realizada de manera simultánea en 15 países reveló que en general las personas atribuyen mayor discapacidad a los trastornos mentales que a los físicos, fundamentalmente debido a limitaciones en el ejercicio de las tareas cotidianas y a una mayor discapacidad social, entendida esta última como disminución en la capacidad para integrarse a su entorno, para insertarse laboralmente y para relacionarse (Ormel et al., 2008). En el caso de México, la Encuesta Mundial de Salud Mental determinó que las personas que padecieron trastornos mentales graves perdieron en promedio 27 días productivos en el periodo del 2001-2003 (Demyttenaere et al., 2004). Este padecimiento a menudo puede durar meses o años y aún con terapia adecuada puede llegar a causar recaídas frecuentes y discapacidad, que se acentúan con el tiempo y puede poner en riesgo la vida de los afectados. Se ha estimado que cerca del 70% de los suicidios a nivel mundial están relacionados con episodios depresivos mayores no tratados (OMS, 2006). Esto coloca a la depresión entre las diez primeras causas de mortalidad y morbilidad en el mundo (Mathers et al., 2004). Sin embargo, y a pesar de la gravedad de las cifras, en la actualidad los tratamientos farmacológicos actúan de manera lenta y muchas veces son poco tolerados por los pacientes y debido a los efectos adversos que provocan entre los que se encuentran algunos severos como ansiedad, insomnio o alteraciones de la función sexual (Rush et al., 2006; Sharp y Cowen, 2011).

A nivel mundial, se ha estimado que más del 16% de la población sufrirá al menos un episodio de depresión mayor (Kessler et al., 2003; Pan et al., 2011). En México, las estadísticas de este padecimiento para el año 2005 mostraron que

alrededor del 8% de la población padece depresión, con importantes diferencias entre géneros: siendo las mujeres dos veces más propensas a sufrir trastornos depresivos (5.8%) que los hombres (2.5%), desapareciendo esta diferencia una vez instalada la post-menopausia (Belló et al., 2005). La diferencia está dada principalmente por la fuerte relación que existe entre las fluctuaciones hormonales, principalmente por caídas drásticas en los niveles de hormonas estrogénicas (periodo premenstrual, el posparto y la peri menopausia) y una mayor incidencia en la aparición de trastorno del estado de ánimo (Kessler et al., 1993; Weissman y Olfson, 1995; Halbreich y Kahn, 2001). Aunque estudios epidemiológicos también sugieren que parte de esta diferencia de género se debe a que las mujeres son más propensas a buscar tratamiento de problemas psicológicos, mientras que los hombres tienden a lidiar con los síntomas depresivos a través de la tristeza o el incremento del abuso de alcohol o drogas (Frackiewicz et al., 2000).

En los últimos años se ha incrementado el número de casos de depresión mayor en niños y adolescentes, indicando una disminución en la edad de inicio de esta enfermedad (Sandanger et al., 1999; Mazza et al., 2010). En México se estima una prevalencia del 2% entre los 9 y 17 años de edad (Benjet et al., 2004). De acuerdo con la Encuesta Nacional de Exclusión, Intolerancia y Violencia de 2008, el 54.6% de los estudiantes de nivel bachillerato en México reporta haber presentado síntomas depresivos tales como: disminución del apetito, tristeza, o sentimientos de culpa y minusvalía mientras que un 8.8% de estos jóvenes dice haber intentado quitarse la vida (Székely-Pardo, 2008).

1.1.1. *Sintomatología y diagnóstico*

La depresión se considera un síndrome o agrupación de síntomas, que por definición se presentan en el plano afectivo (sentimientos o emociones: tristeza patológica, decaimiento, irritabilidad, sensación subjetiva de malestar e impotencia ante las exigencias de la vida) (Alberdi-Sudupe et al., 2006). Actualmente se piensa que este síndrome se origina de la interacción compleja entre una predisposición genética y factores ambientales estresantes que producen cambios significativos en la actividad del sistema nervioso central (SNC) (Mc Laren, 2004; Mathers et al., 2004;

Tsankova *et al.*, 2007). Así, se ha considerado a la depresión como un trastorno biológico y al mismo tiempo una respuesta al estrés psicosocial que incapacita al individuo para afrontar dicha situación.

De acuerdo con la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM-IV) y la CIE-10, en un episodio depresivo mayor se deben presentar cinco o más de los siguientes síntomas (de los cuales al menos uno de los dos primeros debe estar siempre presente) durante un periodo de por lo menos dos semanas, y que suponen un cambio importante en el paciente respecto a su actividad previa.

- Estado de ánimo depresivo: triste, disfórico, irritable (en niños y adolescentes) durante la mayor parte del día, y prácticamente todos los días.
- Disminución o pérdida de interés o de la capacidad para experimentar placer o bienestar en la mayoría de las actividades (anhedonia).

Síntomas somáticos

- Disminución o aumento de peso o del apetito
- Insomnio o hipersomnia
- Enlentecimiento o agitación psicomotriz
- Sensación de fatiga o falta de energía

Síntomas psíquicos

- Sentimientos de culpa o inutilidad excesivos
- Disminución de la capacidad de pensar o concentrarse
- Pensamientos recurrentes de muerte o ideación de planes de suicidio.

(CIE-10, 1992; DSM-IV-TR, 2003; Alberdi-Sudupe *et al.*, 2006; Gouin *et al.*, 2010).

1.2. Sistema serotoninérgico

En 1948, Rapport y sus colaboradores fueron los primeros en aislar una sustancia, liberada en las plaquetas durante la coagulación de la sangre a la que posteriormente se le llamó serotonina (Costagliola *et al.*, 2008). La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una monoamina que se encuentra ampliamente distribuida en el organismo. La 5-HT se ha encontrado en diferentes órganos del cuerpo humano (sangre, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal y ojos), y en los sistemas

nervioso central y periférico (SNC/SNP) (Feldman et al., 1997), donde funciona como neurotransmisor implicado en la regulación de numerosos procesos fisiológicos como el estado de ánimo, la cognición, la percepción, el sueño y el apetito (Costagliola et al., 2008).

En los seres humanos la 5-HT endógena se sintetiza *in situ* a partir de triptófano, su aminoácido precursor, a través de dos pasos (Stahl, 2002). En primer lugar, el triptófano es hidroxilado de 5-hidroxitriptófano por la triptófano hidroxilasa (TPH) y a continuación, el 5-hidroxitriptófano se descarboxila a 5-hidroxitriptamina o 5-HT. Una vez que la 5-HT ha sido producida, es empaquetada en vesículas de almacenamiento y transportada por el axón hacia la hendidura sináptica donde las vesículas son liberadas por un proceso de exocitosis. Una vez en la hendidura sináptica la 5-HT puede unirse a sus diferentes receptores (Feldman et al., 1997). Cumplida esta función, la 5-HT al igual que otras monoaminas (noradrenalina y dopamina) es metabolizada por la monoamin-oxidasa (MAO) y convertida a ácido 5-hidroxi-indol acético (5-HIAA) (Feldman et al., 1997; Costagliola et al., 2008). Además, en la neurona serotoninérgica también existe un sistema de recaptura, en el que participa el transportador de 5-HT y que sirve para “reciclar” al neurotransmisor que ya fue utilizado en la hendidura sináptica (Stahl, 2002).

Las neuronas serotoninérgicas, a nivel del SNC, se encuentran en los denominados núcleos del rafé ubicados en la región del tronco cerebral. Desde aquí, la 5-HT es capaz de influir en la mayoría de las áreas del SNC (ganglios basales, hipotálamo (núcleo supraquiasmático, área preóptica media (APOm), ventromedial e hipotálamo posterior), tálamo, hipocampo, sistema límbico, corteza cerebral, bulbo olfatorio, cerebelo y medula espinal en la modulación de una amplia variedad de vías sensoriales, motoras, circadianas y en funciones corticales (Figura 1; Jacobs y Azmitia, 1992; Carlson, 2006). Los núcleos del rafé se agrupan en nueve conglomerados celulares, la mayoría de ellos localizados en el mesencéfalo, protuberancia y bulbo raquídeo. Los dos grupos más importantes se encuentran en los núcleos del rafé dorsal y medial dado que ambos núcleos producen la mayor parte de la 5-HT del SNC (Carlson, 2006).

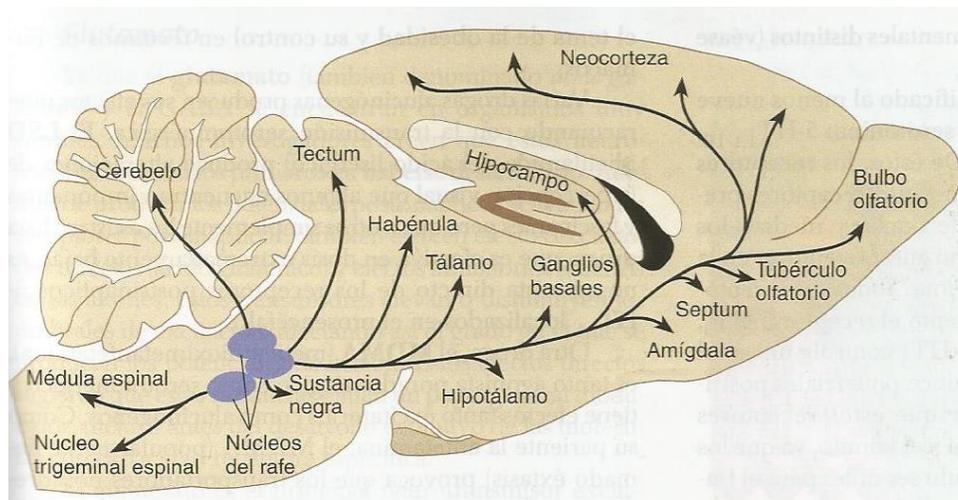


Figura 1. Sección sagital media esquemática del cerebro de ratona, mostrando las localizaciones de los grupos principales de neuronas serotonérgicas y la distribución de sus axones, vías aferentes y botones terminales. Tomado de Carlson, 2006.

Como se mencionó anteriormente, una disminución en los niveles de este neurotransmisor puede ser la causa de trastornos depresivos.

1.2.1. Receptor 5-HT_{1A}

La 5-HT produce su efecto como consecuencia de su interacción con diferentes receptores. A la fecha se conocen 16 tipos de receptores serotonérgicos cada uno de ellos agrupado dentro de siete familias, que se clasifican de la 5-HT₁ a la 5-HT₇ de acuerdo a sus mecanismos de señalización. Todas ellas excepto la familia 5-HT₃ (canal iónico dependiente de ligando) están conformadas por receptores acoplados a proteínas G (Feldman *et al.*, 1997). Además se han descrito diferentes subpoblaciones para cada una de las familias (Costagliola *et al.*, 2008).

En los núcleos del rafe dorsal y medial los receptores 5-HT_{1B/1D} funcionan como auto-receptores, mientras que el receptor 5-HT_{1A} es somatodendrítico, esto es que se encuentra en las dendritas y el soma. En los mamíferos, los receptores 5-HT_{1A} se dividen en dos clases de acuerdo a su localización se denominan auto-receptores (pre-sinápticos) y hetero-receptores (post- sinápticos). Los auto-receptores son receptores 5-HT_{1A} que se encuentran en el soma y dendritas de las neuronas serotonérgicas del

núcleo del rafé. Estos detectan la presencia de la 5-HT, suprimiendo el disparo neuronal y reduciendo la liberación de 5-HT y su producción (Polter y Li, 2010). Cuando la 5-HT es detectada en las dendritas y el cuerpo celular, el receptor 5-HT_{1A} (auto-receptor somatodendrítico) es activado. Una vez que se activa, el receptor 5-HT_{1A} es capaz de inhibir el disparo neuronal y de disminuir la liberación de 5-HT en la terminal axónica. Por otro lado, los hetero-receptores 5-HT_{1A} se localizan en neuronas no serotoninérgicas, principalmente en áreas límbicas como neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y colinérgicas (Polter y Li, 2010). Se han encontrado principalmente en hipocampo en áreas como CA1, la capa granular del giro dentado (GD) y en nivel moderado en CA3 (Polter y Li, 2010). El resto se ubica en áreas postsinápticas (5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇) que se encuentran en células inervadas por los núcleos del rafé (Carlson, 2006).

Existen múltiples estudios que apoyan la idea de que algunos receptores como el 5-HT_{1A} participan en el efecto tardío de diferentes tipos de antidepresivos, como por ejemplo de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS), antidepresivos tricíclicos e incluso inhibidores de la MAO (Li *et al.*, 1996; Blier y Ward, 2003; Stahl *et al.*, 2013). En el caso de los ISRS el efecto terapéutico se inicia cuando el fármaco se une al sistema de recaptura de 5-HT, provocando que la 5HT liberada en la sinapsis al no tener una forma de ser transportada de vuelta a la neurona, se acumule. Estos eventos moleculares ocurren casi inmediatamente después de la administración del fármaco, sin embargo, en los días y semanas subsecuentes se darán cambios adaptativos que a la larga provocarán que el paciente comience a experimentar una mejora en el estado de ánimo. Una de las hipótesis propuestas para explicar los efectos tardíos de los ISRS, menciona que para que se dé el efecto terapéutico de estos fármacos se requieren diferentes cambios adaptativos, como por ejemplo, la desensibilización de los receptores 5-HT_{1A} (Stalh, 1998; Savitzs *et al.*, 2009; Ohno, 2010). En situaciones normales, la estimulación del receptor 5-HT_{1A} localizado en el núcleo del rafé disminuye la tasa de disparo neuronal, reduciendo la liberación de 5-HT en los puntos donde se encuentran las proyecciones serotoninérgicas (Stahl, 1998; Li *et al.*, 1996; Stahl, 2002; Stahl *et al.*, 2013). Por otro

lado, durante el tratamiento crónico con ISRS los receptores se desensibilizan, por los altos niveles de 5-HT, y como consecuencia desinhiben el disparo neuronal. Por lo tanto, la transmisión serotoninérgica se incrementa, y la continua presencia de ISRS eleva los niveles de 5-HT en la sinapsis (Stahl, 1998). Este efecto ha sido corroborado en estudios con modelos animales (Goodwin et al, 1986, 1987; Hensler et al, 1991; Le Poul et al, 1997; Li et al, 1994; Martin et al, 1990; Mizuta y Segawa, 1988; Sleight et al, 1988), y en humanos (Lesch et al, 1990; Rausch et al, 1990). El continuo incremento en la liberación de 5-HT en las terminales de varias vías serotoninérgicas y dado que ellas se extienden por todo el SNC puede llevar a más cambios adaptativos. Por ejemplo, el receptor 5-HT_{1D} también podría desensibilizarse induciendo una mayor liberación de 5-HT (Stahl, 1998).

Estudios tanto clínicos como preclínicos indican que antagonistas del receptor 5-HT_{1A} (pindolol y WAY 100635) pueden facilitar la acción antidepressiva de ISRS (Cryan y Leonard, 2000). Más aún, algunos reportes indican que agonistas como el 8-hydroxy-2-(di-npropylamino) tertralina (8-OH-DPAT) o la buspirona producen efecto antidepressivo en algunos modelos animales de depresión como la prueba de nado forzado (PNF), disminuyendo la inmovilidad e incrementando la conducta de nado (Lucki et al., 1994). Acorde con lo anterior se ha demostrado que la administración de ISRS como fluoxetina o paroxetina no reducen la inmovilidad en ratones knockout (KO) para el receptor 5-HT_{1A} (Mayorga et al., 2001), indicando que dicho receptor es necesario para la actividad antidepressiva de los ISRS. Además, ratones KO para el receptor 5-HT_{1A} presentan comportamiento ansioso (Parks et al., 1998) mientras que la represión selectiva de los heteroreceptores 5-HT_{1A} (receptores postsinápticos) genera conductas tipo depresivo (Richardson-Jones et al., 2011; Albert, 2012) lo cual pone en evidencia la importancia de dicho receptor en el trastorno depresivo y en su tratamiento.

1.3. Neuroquímica de la Depresión

La idea de que los síntomas de la depresión están vinculados directamente con deficiencias de monoaminas cerebrales se generó desde los años 40 con el desarrollo de la primera generación de antidepresivos, fármacos que bloqueaban la recaptura de monoaminas o el metabolismo de estas como parte de su efecto terapéutico. Actualmente existen diferentes evidencias experimentales que vinculan a la depresión con la hipofunción de vías neuronales especialmente las que tienen que ver con la síntesis, almacenamiento y liberación de noradrenalina (NA) y 5-HT, ya que estas participan tanto en la expresión como en la regulación de conductas que acompañan a este tipo de padecimiento (Van de Kar, 1989; Catena-Dell'Osso et al., 2013).

1.3.1. *Hipótesis Monoaminérgica.*

En la década de los 60 se reportó que los pacientes depresivos presentaban una reducción en los sitios de unión para 5-HT en plaquetas y bajos niveles de 5-HIAA en líquido cerebro espinal (Cowen, 2008; Catena-Dell'Osso et al., 2013). Además, existe evidencia de que ciertos fármacos que reducían la cantidad de estos neurotransmisores podían inducir depresión, la primera observación a este respecto fue que la reserpina, un fármaco utilizado para el tratamiento de la hipertensión, precipitaba síndrome depresivo en algunos pacientes (Schildkraut, 1965). La reserpina inhibe la formación de vesículas de almacenamiento de monoaminas, haciendo que tanto NA como 5-HT no puedan ser almacenados para su liberación en la hendidura sináptica, sino que se mantengan en el citoplasma donde pueden ser degradados por la MAO, resultando en una disminución de los niveles 5-HT y NA (Kandel y Schwartz, 1991). Posteriormente se demostró que compuestos tricíclicos, los cuales bloquean la recaptura de monoaminas y los inhibidores de la MAO, pueden disminuir el estado de ánimo depresivo (Akiskal, 1995; Kandel y Schwartz, 1991). Estudios *post mortem* muestran que pacientes depresivos víctimas de suicidio tienen baja concentración de 5-HT en el tallo cerebral y en el núcleo del rafé. En el caso de sus metabolitos, se ha observado que existen bajos niveles de 5-HIAA, en pacientes con historia de depresión (Meltzer y Martin, 1987). Aunado a ello algunas investigaciones muestran que una

disminución en el aporte de triptófano de la dieta puede causar una caída aguda en el estado de ánimo (Maes y Meltzer, 1995; Maes et al., 2011), mientras que una depleción del triptófano plasmático causa disminución del estado de ánimo en pacientes deprimidos en remisión (Van der Does, 2001; Maes et al., 2011).

Estudios realizados mediante tomografía de emisión de positrones (PET) han permitido analizar la expresión de receptores en pacientes depresivos *in vivo*, mostrando que pacientes con depresión crónica poseen una disminución de receptores 5-HT_{1A}. Otros receptores de 5-HT, por ejemplo, el receptor 5-HT_{2A} y el transportador de 5-HT, también se han estudiado ampliamente en las investigaciones de imagenología en pacientes deprimidos, sin embargo; los datos de este trabajo son contradictorios (Cowen, 2008).

En los últimos años, se ha identificado un factor de vulnerabilidad genética. Existe una variación alélica en la región promotora del gen que codifica el transportador de 5-HT (5HTT), con lo cual los portadores de la variación del alelo de 5HTT (el alelo de baja actividad) tienen un mayor riesgo de padecer depresión que se desarrolla en respuesta a eventos estresantes de la vida. Curiosamente, los sujetos con la variación del alelo de baja actividad también muestran un aumento de las respuestas neuronales ante las expresiones faciales de miedo, lo que sugiere que dicha variación podría facilitar el procesamiento de la información emocional negativa, lo que tal vez podría empeorar el impacto psicológico de las experiencias adversas de la vida (Caspi et al., 2003; Cowen, 2008).

1.4. Neuroanatomía de la Depresión

El sistema límbico está conformado por varias estructuras cerebrales interconectadas ubicadas alrededor del tálamo y debajo de la corteza cerebral. En los mamíferos este conjunto de estructuras es el encargado de gestionar respuestas fisiológicas adecuadas ante estímulos medioambientales específicos y de integrar la información ambiental a través del aprendizaje. Está relacionado con la memoria, la atención, la conducta sexual, las emociones (por ejemplo placer, miedo, agresión, etc). El sistema límbico interacciona con el sistema endócrino y el sistema nervioso

autónomo. Está formado por el tálamo, hipotálamo, hipocampo, amígdala, cuerpo calloso, séptum y mesencéfalo, los cuales reciben inervaciones de diferentes sistemas de neurotransmisión que se han vinculado con la etiología del trastorno depresivo como son: 5-HT, NA y dopamina (MacQueen et al., 2003).

La depresión puede provocar cambios funcionales en diferentes áreas del cerebro. Por ejemplo; lesiones en lóbulo temporal e hipotálamo pueden resultar en episodios depresivos severos. Existen múltiples evidencias de que existen anomalías estructurales en el circuito límbico-tálamo-cortical en pacientes con depresión unipolar (MacQueen et al., 2003) algunas de las cuales se revisaran a continuación.

1.4.1. Núcleo del Rafé

La importancia del sistema serotoninérgico en un gran número de condiciones neurológicas y psiquiátricas ha sido ampliamente documentada. Los núcleos del rafé constituyen un área heterogénea y bilateral que se encuentra situada en cerebro medio y el tallo cerebral, cuyo neurotransmisor principal es la 5-HT. Se ha estimado que alrededor del 70-80% de las neuronas de los núcleos del rafé son serotoninérgicas (Michelsen et al., 2008). En el SNC de los mamíferos, la 5-HT se encuentra implicada en la regulación de la temperatura corporal, regulación del dolor, ciclo sueño-vigilia, regulación del apetito, conducta sexual y secreción de hormonas (por ejemplo la secreción de hormona liberadora de corticotropina, CRH) y procesos de memoria y aprendizaje (Contreras et al., 2002). Además su actividad está regulada por diferentes sistemas de neurotransmisión, por lo que expresa receptores para NA (α_1), dopamina (D2), GABA (GABA_A y GABA_B) y presenta retroalimentación negativa del propio sistema serotoninérgico, por lo que el núcleo del rafé expresa los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B/1D}. La amplia distribución del sistema serotoninérgico lo implica en numerosos procesos fisiológicos y patológicos dentro y fuera del SNC (Jacobs y Azmitia, 1992). Tanto el trastorno depresivo mayor como el comportamiento suicida se asocian con un déficit en la neurotransmisión serotoninérgica. Pacientes depresivos víctimas de

suicidio presentan una disminución en la concentración 5-HT en el tallo cerebral y el núcleo del rafé, además de una disminución en los niveles de 5-HIAA metabolito de la 5-HT en pacientes con historia de depresión (Meltzer y Martin, 1987; Jans et al 2006).

Aunado a estas alteraciones, se ha reportado por múltiples autores que víctimas de suicidio presentan alteraciones en la densidad y número de neuronas en el núcleo del rafé dorsal sugiriendo que esta alteración se acompaña de una disminución en su capacidad funcional (Underwood et al., 1999; Baumann et al., 2002). Al respecto, Underwood y cols. (1999) proponen que quizás estos cambios sean provocados por alteraciones en el neurodesarrollo en el que los mecanismos apoptóticos normales no ocurren, así una reducida función serotoninérgica o una inervación de neuronas incompleta llevaría a cambios compensatorios como por ejemplo; una reducida tasa de muerte celular o por el contrario una excesiva muerte de neuronas. Por otro lado, estudios realizados de forma paralela no muestran cambios morfológicos o cambios en el número de neuronas (Stockmeier et al., 1998; Hendricksen et al., 2004). Recientemente se ha encontrado una alta expresión de la enzima TPH en el núcleo del rafé dorsal de personas deprimidas (Boldrini et al., 2005; Bach-Mizrachi et al., 2006). Sin embargo, se requieren más estudios sobre cambios morfométricos en el núcleo del rafé de pacientes depresivos.

1.4.2. Hipotálamo

El hipotálamo se localiza en la base del encéfalo, debajo del tálamo y forma parte del diencefalo. Tiene el control sobre el sistema nervioso neurovegetativo y el sistema endocrino, y organiza conductas relacionadas con la supervivencia de la especie (por ejemplo lucha, huida, ingesta y apareamiento), además de estas también regula procesos fisiológicos como; ritmos circadianos, ingesta de agua, temperatura y presión arterial (Carlson, 2006; Hernández-González y Prieto-Beracoechea, 2002). Como parte del sistema límbico, el hipotálamo se encarga de la expresión conductual de las emociones (Bear et al., 2008). Se encuentra inervado por diferentes sistemas de neurotransmisión entre ellos el serotoninérgico, por lo que en el hipotálamo se

expresan diferentes receptores como son 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇ y 5-HT_{1A}, este último se puede encontrar en el hipotálamo en altas concentraciones (Jacobs y Azmitia, 1992). Algunas de las cuales se encuentran alteradas en la depresión manifestándose en síntomas depresivos como cambios en el apetito, alteraciones del sueño y disminución de la libido.

El hipotálamo libera al menos nueve hormonas que actúan como inhibidoras o estimulantes de la secreción de otras hormonas en la adenohipófisis por lo que se le ha denominado “la glándula maestra” (Carlson, 2006), entre ellas la CRH que estimula la liberación de la hormona corticotrófica (ACTH) en la hipófisis y esta a su vez promueve la liberación de corticosteroides en la glándula adrenal, constituyendo al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), el cual se activa de forma circadiana y en respuesta al estrés.

El estrés psicológico tiene un papel importante en el desencadenamiento y evolución de los trastornos mentales, ya que se sabe que pacientes con depresión mayor presentan una desregulación del eje HHA (Trucco, 2002; Robinson et al., 2009). Actualmente existe evidencia clínica, epidemiológica y experimental de que el estrés en etapas tempranas del desarrollo, en conjunto con factores de predisposición genética, contribuye a generar una vulnerabilidad de largo plazo a sufrir episodios depresivos (Trucco, 2002). La CRH es liberada del hipotálamo en respuesta a la percepción de estrés por las regiones corticales del cerebro. En respuesta ante el estrés agudo la CRH actuaría mediando la respuesta endocrina a través del eje HHA. El hipocampo ejerce una influencia inhibitoria sobre las neuronas hipotalámicas que contienen CRH (Jacobson y Sapolsky, 1991), en el estrés crónico esta retroalimentación negativa se interrumpe dando como resultado respuestas mal adaptativas en el eje HHA, que incluyen una sobre-activación que se expresa en una hipersecreción de CRH y cortisol (Robinson et al., 2009). Estudios *post-mortem* de pacientes deprimidos revelan algunos cambios morfométricos celulares en el hipotálamo en relación al trastorno depresivo, así Purba y cols. 1996 reportaron que el número de neuronas inmunorreactivas para vasopresina se incrementan en un 56%,

mientras que las células inmunorreactivas para oxitocina presentan un 23% de incremento, esto en el núcleo paraventricular. Aunado a ello se presenta un incremento en el número de neuronas que expresan CRH en este núcleo hipotalámico (Raadsheer et al., 1994).

1.4.3. Hipocampo

El hipocampo es una de las regiones centrales del sistema límbico. Forma parte del prosencéfalo, ubicado en el lóbulo medial temporal y juega un papel primordial en las funciones ejecutivas (procesos que asocian ideas, movimientos y acciones simples y los orientan a la resolución de conductas complejas). Entre ellas, la transformación de la memoria a corto plazo en memoria a largo plazo (Meisenzahl et al., 2010).

La formación hipocampal comprende cuatro estructuras corticales; el giro dentado, el hipocampo propiamente dicho que se divide en las subregiones *cornu ammonis* o cuerno de Amón (CA) 1, 2 y 3. Las neuronas principales son glutamatérgicas y comprenden las granulares en el giro dentado, y las piramidales localizadas en CA1, CA2 y CA3 todas ellas dispuestas en una única capa de somas. Las neuronas granulares presentan su aferencia en la capa molecular y su eferencia (mossy fibers) en el *hilus* y CA3 (Forster et al., 2006) (Figura 2).

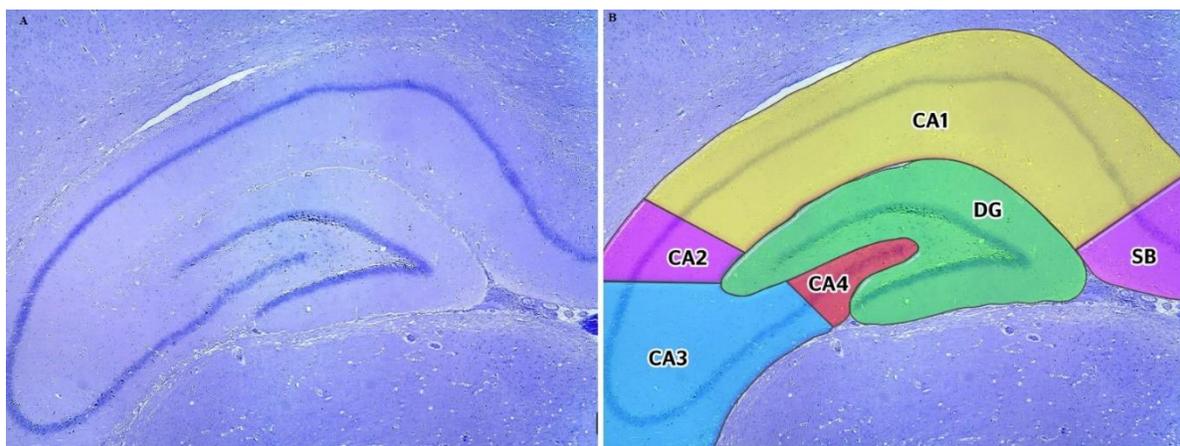


Figura 2. Anatomía del hipocampo de rata. A) Se observa la anatomía del hipocampo de rata con tinción de Nissl. B) Subregiones del Cuerno de Amón y giro dentado (GD) o CA4.

Recibe información de los sistemas colinérgico, GABAérgico, dopaminérgico, noradrenérgico y serotoninérgico; además de una gran inervación serotoninérgica y junto con otras áreas del sistema límbico contiene altas densidades de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT₇ especialmente en el giro dentado y en la región CA3 (Yau et al., 1999).

El hipocampo se encuentra relacionado con los déficits de memoria y de la regulación emocional que se presentan en la depresión. Numerosos estudios de neuroimagen funcional muestran que hay una reducción del volumen hipocampal a partir de la aparición del primer episodio depresivo mayor, disminución que se mantiene en pacientes con historia de depresión (Sheline et al., 1999; MacQueen et al., 2003; Videbech y Ravnkilde, 2004). Así también se presenta una marcada asimetría en el volumen hipocampal (MacQueen et al., 2003). Esto se ve reflejado en una disminución de la memoria verbal de pacientes con episodios depresivos recurrentes (Sheline et al., 1999). Por otro lado se ha demostrado que la depresión provoca atrofia neuronal y reorganización dendrítica en el hipocampo (Cook y Wellman, 2004). Consistente con estos datos el tratamiento crónico con antidepresivos induce vías de señalización neurotróficas y neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, dicha neurogénesis hipocampal es necesaria para provocar los efectos conductuales de fármacos antidepresivos (Malberg y Schechter, 2005). Algunas evidencias sugieren que una reducida señalización de factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en hipocampo puede estar implicado en la depresión.

Asimismo, el hipocampo constituye un punto de retroalimentación negativo importante para el eje HHA, y se ha reportado que el estrés puede tener importantes efectos neurotóxicos sobre el hipocampo, con pérdida neuronal y menor neurogénesis (Jacobson y Sapolsky, 1991; Trucco, 2002). En modelos animales de depresión como el modelo de estrés crónico moderado se reduce la producción de factores tróficos, arborización dendrítica, neurogénesis hipocampal y volumen del hipocampo (McEwen, 2001; Dranovsky y Hen, 2006; Ansorge et al., 2007). Lo cual se revierte con la

administración de antidepresivos y en algunos casos ambiente enriquecido (Duman, 2001).

Aunado a ello, se han reportado diversas anomalías en la expresión de receptores serotoninérgicos en esta área, por ejemplo; estudios *post-mortem* de pacientes deprimidos han mostrado que existe una disminución en la expresión del ARNm para el receptor 5-HT_{1A} en el hipocampo (López-Figueroa et al., 2004) En ratas Flinders se ha reportado que existe una disminución de la expresión de la proteína para dicho receptor en giro dentado del hipocampo (Wang et al., 2009).

1.5. Estrógenos

Los estrógenos son un grupo de hormonas esteroideas que participan en el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales secundarias en la mujer, son responsables del control del ciclo menstrual-ovulatorio y de la modulación de algunos procesos metabólicos de minerales, lípidos, carbohidratos y proteínas. En el hombre participan en la espermatogénesis, la fertilidad y son necesarios para la diferenciación sexual, el correcto funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG) y en el despliegue de conducta sexual (Rochira, et al., 2005). Los principales estrógenos endógenos en el humano son 17 β -estradiol (E₂), estrona (E₁) y estriol (E₃), siendo el E₂ el de mayor potencia. En la mujer no gestante el principal es E₂, mientras que E₁ es principalmente secretado en la menopausia y E₃ durante el embarazo (Horst, 2010).

Los estrógenos se producen a partir de la aromatización de diferentes andrógenos por parte de la enzima citocromo P450 aromatasa principalmente en los ovarios. Sin embargo también son sintetizados en las glándulas suprarrenales, en la placenta durante el embarazo y en los testículos en el macho (Lemini-Guzman et al., 2008). Recientemente se ha descubierto que se produce también en ciertas áreas cerebrales (Simpson, 2003). En el caso del E₂, es el resultado de la aromatización de la testosterona (T).

Durante el ciclo menstrual normal, el promedio de excreción urinaria de E₂ en la fase lútea es de 10 a 80 µg/día (concentración plasmática 0.2 nmol/L), en la mitad del ciclo aumenta entre 25 a 100 µg/día (concentración plasmática 2.2nmol/L) y en la menopausia disminuye entre 5 a 10 µg/día. El hombre excreta entre 2 a 25 µg/día (Lemini-Guzman et al., 2008).

1.5.1. *Mecanismo de acción de hormonas estrogénicas*

Los estrógenos llevan a cabo sus funciones biológicas a través de su unión a los receptores a estrógenos (REs) los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Hasta la fecha han sido identificados dos receptores nucleares denominados RE α y RE β , a los cuales E₂ pueden unirse con una alta afinidad (Kuiper et al., 1997). Estos receptores son codificados por dos genes diferentes lo cual está relacionado con que ambos presenten diferencias en aspectos como su acción biológica así como su afinidad por compuestos estrogénicos (Kuiper et al., 1997), en secuencias específicas de ADN reconocidas (Paech et al., 1997; Cowley y Parker, 1999) y patrones tisulares de expresión (Kuiper et al., 1997).

Los REs, están conformados por seis dominios denotados de la A a la F. Tienen un dominio central de unión al ADN (DBD), muy conservado entre ambos receptores el cual posee dos “dedos de zinc”, los cuales se unen específicamente a una secuencia del ADN denominada elemento de respuesta a estrógenos (ERE) que son secuencias específicas en el promotor de genes regulados por estrógenos. La región carboxilo-terminal del receptor constituye el dominio de unión al ligando (LBD) el cual reconoce a los estrógenos naturales como E₂ y a ligandos sintéticos que pueden ser antagonistas totales o moduladores selectivos de RE (SERMs), que pueden activar (coactivadores) o inhibir (correpresores) al receptor dependiendo del contexto celular y del promotor. Adicionalmente, el LBD contiene una región de localización nuclear, regiones de homodimerización y un dominio de transactivación (AF-2) dependiente del ligando (Noriega-Reyes y Langley-McCarron, 2008).

El mecanismo clásico de acción dependiente del ligando ha sido el más estudiado. El RE, en ausencia de ligando, se encuentra mayoritariamente en el núcleo, en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico como Hsp90 y Hsp70. Cuando se une a un estrógeno, el RE se activa, disociándose de las proteínas de choque térmico, lo que induce varios cambios conformacionales para lograr la unión con sus EREs en las regiones reguladoras de los genes blanco, dicho cambio conformacional facilita las interacciones entre los componentes del complejo de transcripción basal y el promotor del gen blanco, también permite la entrada de otras proteínas, incluyendo a corre reguladores, que pueden estabilizar las interacciones y promover el inicio de la transcripción. Los receptores unidos al ADN reclutan a los factores basales de transcripción y la ARN polimerasa II por medio de su interacción directa o por medio de proteínas intermediarias. El conjunto RE-coactivador regula el acceso a la cromatina y estabiliza el complejo de preiniciación transcripcional (Noriega-Reyes y Langley-McCarron, 2008). Dependiendo del tipo de célula y del contexto del promotor, el receptor unido al ADN ejerce un efecto, ya sea positivo o negativo, sobre la expresión del gen (Simoncini y Genazzani, 2003; McEwen, 1991).

En el SNC, ambos receptores presentan una alta expresión principalmente en estructuras límbicas, las cuales gestionan respuestas fisiológicas ante estímulos emocionales y se relaciona con memoria, atención, conducta sexual, emociones y estado de ánimo; sin embargo, los patrones de expresión de ambos receptores no se empalman completamente (Weiser et al., 2008). En particular el receptor RE α muestra una expresión moderada en hipocampo tanto en machos como en hembras, mientras que se encuentran en alta densidad en hipotálamo, especialmente en la zona periventricular incluyendo el núcleo preóptico medio (NPOm), área preóptica media (APOm), núcleo del lecho de la estría terminal, núcleo supraquiasmático, núcleo arcuato, núcleo amigdaloides medial (NAM) y cortical (Mize, 2001; Laflamme *et al.*, 1998; Pérez et al., 2003; Horst, 2010). En el caso de los RE β , se ha detectado alta expresión en el APOm, el hipocampo, el núcleo paraventricular y el supraóptico (Zhang et al., 2002; Pérez et al., 2003; Horst, 2010) mientras que en el núcleo del rafe se expresa de manera moderada (Laflamme *et al.*, 1998).

Además de los receptores intracelulares clásicos, algunos efectos de los estrógenos se caracterizan por producir respuestas rápidas mediadas por receptores de membrana los cuales se han descrito como mecanismos no genómicos. En los últimos años se ha documentado que pulsos breves de estrógenos pueden inducir en milisegundos diversas cascadas de señalización (Almeida et al., 2006; Chen et al., 2010).

Recientemente se reportó la existencia de un receptor a estrógenos acoplado a proteínas G al que se denominó GPR30 que activa diferentes vías rápidas de señalización intracelular como ERK, PI3K, movilización de calcio y producción de adenin monofosfato cíclico (AMPc) (Prossnitz et al., 2008). Sin embargo, tanto la función como la presencia de GPR30, como un RE asociado a membrana, siguen siendo controversiales, ya que algunos grupos sostienen que su localización es estrictamente citosólica o en retículo endoplásmico (Prossnitz et al., 2008), mientras que otros grupos han mantenido que es un receptor asociado a la membrana (Chimento et al., 2010).

En los últimos años, numerosos autores han propuesto que el RE α y el RE β pueden estar asociados a las membranas plasmáticas (Milner et al., 2005; Hart et al., 2007), lo cual explicaría el rápido efecto biológico del E₂ en sistema nervioso, sugiriendo que los estrógenos podrían también producir respuestas del tipo no genómico. Además, se ha propuesto que tanto RE α como RE β podrían ser modificados postranscripcionalmente para permitir su inserción en la membrana (Acconcia et al., 2005; Marino et al., 2006; Boulware et al., 2007). Actualmente se han logrado identificar al menos tres variantes de splicing (corte y empalme) del RE α que se encuentran en la membrana plasmática y son responsables de producir los efectos rápidos de los estrógenos. Estas variantes son RE α 66, RE α 46 y RE α 36 (Irsik et al., 2013; Banerjee et al., 2014), sin embargo, aún no se sabe si alguna de ellas se expresa en SNC.

1.6. Hormonas y depresión

Algunos estudios asocian el decline de los niveles de testosterona (T) relacionados con la edad con la aparición de un gran número de síntomas depresivos. Sin embargo algunos autores no han encontrado una correlación entre los niveles hormonales de pacientes hipogonadales y la severidad de la depresión (Schweiger, 1999). Reportes sobre el papel de los andrógenos en enfermedades afectivas indican que la terapia con hormonas androgénicas mejora los síntomas de depresión en hombres hipogonadales (Wagner et al., 1996; Vogel et al., 1985). En modelos animales como la PNF se ha observado que la castración después de al menos 3 semanas provoca un incremento en la inmovilidad y disminución de las conductas activas (Bonilla-Jaime et al., 2010), lo cual estaría relacionado con un estado de desesperanza conductual (estado “depresivo”) (Detke et al., 1995; Lopez-Rubalcava y Lucki, 2000; Duman, 2010) y una disminución de la actividad del sistema de neurotransmisión serotoninérgico (Cryan et al., 2002; Vázquez-Palacios *et al.* 2005). Además, la disminución de las concentraciones de hormonas gonadales debida a la castración en machos inhibe el efecto de fármacos antidepresivos. En este sentido, se ha observado que en un modelo de depresión por estrés crónico variable en ratas macho, animales de edad avanzada presentan mayor vulnerabilidad a desarrollar anhedonia ante estímulos estresantes comparado con machos jóvenes lo cual podría estar relacionado a cambios neuroendocrinos que se dan con la edad (Herrera-Pérez et al., 2008). Además, en este modelo se observa una disminución de la sensibilidad a ISRS, posiblemente debida a la disminución en las concentraciones de hormonas como T y E₂ (Herrera-Pérez et al., 2010).

La PNF ha permitido analizar el efecto antidepresivo de diferentes tipos de hormonas. De este modo, la administración de propionato de T en machos con 3 semanas de castración no produce efecto antidepresivo *per se* (Martínez-Mota y Fernández-Guasti, 2004; Bonilla-Jaime et al., 2010). Sin embargo, reestablece el efecto antidepresivo de fármacos antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptura de NA pero no de ISRS (Martínez-Mota y Fernández-Guasti, 2004).

En el caso de los estrógenos, estudios en mujeres sugieren una fuerte relación entre las fluctuaciones hormonales, principalmente dada por caídas drásticas en los niveles de estrógenos y una mayor incidencia en la aparición de trastorno del estado de ánimo (depresión mayor, desorden distímico, trastorno bipolar, etc.) (Halbreich y Kahn, 2001). Esta diferencia comienza con el inicio de la pubertad (Bouma, 2010), acentuándose en periodos clave como el periodo premenstrual, el posparto y la perimenopausia, dicha diferencia entre géneros desaparece una vez que el climaterio se ha instalado (Shors y Leuner, 2003; Kessler, 2003; Horst, 2010). Sin embargo, esto no es una regla ya que algunas mujeres parecen ser más sensibles a los cambios hormonales que otras y dichos cambios en conjunto con situaciones ambientales estresantes y cierta predisposición genética pueden disparar la aparición del trastorno depresivo (Payne, 2003). Se ha observado que en la pubertad, posparto, y perimenopausia en las cuales se presentan cambios significativos en el estado hormonal son típicamente asociados con un incremento en el riesgo de sufrir trastorno depresivo. Por esa razón, se le ha atribuido esta diferencia de género en las tasas de prevalencia de trastornos afectivos a la liberación cíclica de hormonas sexuales femeninas, particularmente de estrógenos (Horst, 2010).

Algunos estudios en mujeres perimenopáusicas con depresión, muestran una mejoría significativa en los síntomas depresivos cuando han sido tratadas con terapia de reemplazo hormonal en conjunto a la terapia antidepresiva convencional con ISRS (Schneider, *et al.*, 1997; McCarthy, 2008). Otras investigaciones muestran que la respuesta al tratamiento antidepresivo con ISRS parece no afectarse en mujeres con un hipoestrogenismo crónico como puede ser la post-menopausia (Usall et al., 2011). Sin embargo en otros casos no se ha observado mejoría por lo que su uso es controversial (Soares et al., 2001; Cohen et al., 2003).

En modelos animales, se ha observado por ejemplo, que el E₂ y el etinil estradiol (EE₂) inducen efecto antidepresivo en hembras ovariectomizadas después de un tratamiento agudo disminuyendo el escalamiento y aumentando la conducta de nado en la PNF lo que sugiere la participación del sistema serotoninérgico (Estrada-Camarena et al., 2003), además recientes estudios muestran que también posee

efecto antidepresivo en machos orquidectomizados en un esquema de tratamiento agudo y crónico (Martínez-Mota et al., 2008; Bonilla-Jaime et al., 2010). En este mismo sentido, resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento crónico (14 días) con benzoato de E₂ reduce la conducta de inmovilidad en machos orquidectomizados (Bonilla-Jaime et al., 2010). Así también, la administración de E₂ en conjunto con antidepresivos ISRS como fluoxetina es capaz de acortar la latencia de su acción antidepresiva (Estrada-Camarena et al., 2003; Estrada-Camarena et al., 2004). En machos la administración de E₂ restablece el efecto de fármacos ISRS (Martínez-Mota et al., 2008; Bonilla-Jaime et al., 2010).

Así también, se ha reportado que algunos agonistas del RE β como el 4-hidroxi-phenil-propionitrilo (DPN) (Walf et al., 2004) y los moduladores selectivos de RE (SERM) como el raloxifen poseen efecto antidepresivo en la PNF (Walf y Frye, 2010). Además, estudios recientes sugieren que algunos fitoestrógenos como equol, metabolito gástrico de la daidzeína, contenida en la soya y sus derivados es capaz de reducir el tiempo de inmovilidad en la PNF (Blake et al., 2011). En contraste, el 17 α -estradiol (Kuiper et al., 1997), otros compuestos estrogénicos sintéticos como el dietilestilbestrol (DES) (Estrada-Camarena et al., 2003) y agonistas para el RE α como el 4,4',4''-(4-Propil [1H]-pirazol-1,3,5-tril) trisfenol (Walf et al., 2004) no muestran efectos sobre la inmovilidad o en las conductas activas evaluadas en la PNF, evidencias que sugieren una importante participación del RE β en el efecto antidepresivo de diversos compuestos de naturaleza estrogénica.

1.6.1. E₂ y sistema serotoninérgico

El E₂ puede ser sintetizado en diferentes áreas cerebrales (Azcoitia et al., 2011) y diferentes estudios en modelos animales muestran que el E₂ puede modular la actividad de diferentes sistemas de neurotransmisión incluyendo al noradrenérgico, dopaminérgico, GABAérgico, colinérgico y serotoninérgico (Shupnik, 2002). Así también como ya se mencionó, hay una alta expresión de RE en sitios de producción de 5-HT (Laflamme et al., 1998) y en proyecciones del sistema serotoninérgico como

hipotálamo e hipocampo (Pérez et al., 2003). Además de esto, múltiples estudios sugieren que los estrógenos pueden incrementar el riesgo de desarrollar depresión a través de la alteración de la función serotoninérgica. Así, el E₂ ha mostrado tener una fuerte interacción con el sistema serotoninérgico a diferentes niveles. Por ejemplo; se conoce que puede influir en la síntesis y degradación de 5-HT. En este sentido, los niveles de triptófano total y triptófano libre en suero (este último precursor de la 5-HT) varían a lo largo del ciclo menstrual, siendo más altos durante los primeros días de la fase lútea después de la ovulación (Carretti et al., 2005). En modelos animales se ha observado que la disminución de los niveles hormonales provocada por la orquidectomía, disminuye los niveles de la 5-HT e incrementa los niveles de 5-HIAA. Los niveles de ambos se restituyen en hipotálamo e hipocampo únicamente al administrar E₂ (Bitar, 1991). Asimismo, el tratamiento crónico con E₂ incrementa la expresión de la TPH2, enzima limitante en la síntesis de 5-HT que es específica del SNC, tanto en ratas como en primates no humanos (Sánchez et al., 2005; Hiroi et al., 2006). Dicha regulación de la expresión está dada por el REβ, ya que el efecto del E₂ se encuentra ausente en ratones KO para este receptor (Gundlah et al., 2005) y la administración de agonistas específicos para dicho receptor como el DPN incrementa la expresión de TPH2 (Donner y Handa, 2009). Además, datos recientes muestran que la administración de E₂ y algunos fitoestrógenos como la genisteína a ratas ovariectomizadas, producen un efecto protector del sistema serotoninérgico ante situaciones estresantes, ya que; el estrés por nado forzado disminuye la expresión de TPH en el rafe dorsal y el medial y el pretratamiento con E₂ previene esta disminución (Yang et al., 2010; Kageyama et al., 2010).

Por otro lado, los estrógenos también pueden regular la degradación de 5-HT. Se sabe que la actividad de la enzima MAO, implicada en la degradación de las monoaminas se incrementa en la depresión posparto (Sacher et al., 2010) y en ratas hembra de edad avanzada (Kumar et al., 2011). Así también, el tratamiento con E₂ es capaz de disminuir la expresión de la MAO en áreas como núcleo del rafe (Gundlah et al., 2002) e hipotálamo (Gundlah et al., 2002; Ortega-Corona et al., 1994) tanto en

ratas hembra como en macacos ovariectomizadas, además de revertir el incremento en la actividad de la enzima MAO provocado por la edad (Kumar et al., 2011). Aunado a ello, los estrógenos también pueden regular la cantidad de 5-HT en la sinapsis a través de la regulación de la expresión del sistema de recaptura de 5-HT, el transportador encargado del reciclaje de 5-HT en el SNC. El tratamiento con E₂ es capaz de disminuir la expresión del transportador en algunas áreas cerebrales (Lu et al., 2003). En resumen, la acción del E₂ sobre el sistema serotoninérgico es incrementar la cantidad de 5-HT, mediante un incremento de su síntesis y una disminución de su degradación.

Con respecto a los receptores serotoninérgicos, estudios recientes muestran que la administración de E₂ y andrógenos aromatizables, como la testosterona incrementan el disparo neuronal en neuronas serotoninérgicas (Robichaud y Debonnel, 2005), además el tratamiento con E₂ disminuye la expresión del receptor presináptico 5-HT_{1A} en el rafe dorsal de hembras de mono ovariectomizadas (Lu y Bethea, 2002).

Todo lo anterior sustenta que los estrógenos ejercen acción sobre sistemas de neurotransmisión que participan en la etiología de la depresión, además de participar en el estado de ánimo, al ejercer su acción sobre sus receptores. Sin embargo poco se sabe acerca de modificaciones de los receptores a estrógenos RE β o los RE α en pacientes depresivos o en modelos animales con depresión. Existe un solo estudio que reporta una disminución en la expresión del ARNm del RE β en el tallo cerebral de víctimas de suicidio (Ostlund et al., 2003). Por lo anterior, no se descarta que sea un factor que podría estar contribuyendo a las alteraciones conductuales del modelo animal de depresión inducido neonatalmente por clomipramina.

1.7. Conducta sexual masculina (CSM) y motivación sexual

La conducta sexual en los mamíferos es una expresión de la fisiología reproductiva, entendiéndose como fisiología reproductiva a toda la serie de procesos

fundamentales que permitirán el desarrollo y maduración sexual de los organismos (Hull et al., 2002).

La conducta sexual en la rata macho es probablemente una de las mejor descritas entre los mamíferos. La CSM se distingue en conductas que se reconocen como precopulatorias, copulatorias y postcopulatorias. Durante la conducta precopulatoria, el macho y la hembra se persiguen, hay exploración del área anogenital de la hembra, y emiten vocalizaciones ultrasónicas (Lucio y Tlachi-López, 2008). Las conductas copulatorias en la rata macho consisten de diferentes patrones motores innatos y altamente estereotipados. Estos pueden distinguirse fácilmente en tres conductas: monta, intromisión y eyaculación (Guevara-Pérez y Hernández-González, 2006; Hull et al., 2006). La conducta postcopulatoria en el macho comprende el periodo refractario absoluto y el relativo. Durante el periodo refractario absoluto el macho presenta poca locomoción, es insensible a estimulación sexual y poco sensible a otro tipo de estímulos, durante el periodo refractario relativo el macho empieza a responder a estímulos externos y emite vocalizaciones ultrasónicas (Lucio y Tlachi-López, 2008).

Una de las divisiones que más utilidad ha tenido en la investigación neuroendocrina sexual es aquella que propone que toda conducta sexual puede dividirse en dos fases: una motivacional o apetitiva que lleva al individuo a la búsqueda y al inicio de la interacción con la pareja y una consumatoria o de ejecución que le permite llevar a cabo dicha interacción (Moralí, 1998; Hull et al., 2006). Dentro de la fase motivacional pueden incluirse las conductas precopulatorias antes descritas, mientras que dentro de la fase consumatoria se agrupan las conductas copulatorias (González-Pimentel y Hernández-González, 2002).

Dado que la “motivación” es un constructo hipotético que no puede medirse directamente, ha sido necesario desarrollar varias formas de evaluar (aunque sea de manera indirecta) la motivación sexual. En la rata macho, su orientación hacia la hembra, investigación olfatoria o gustativa del área genital de la hembra, investigación de la orina, persecución y monta son algunas conductas que se consideran como “indicadores de la motivación sexual”. Otros parámetros susceptibles de ser medidos durante el despliegue sexual han servido también; por ejemplo, la duración de la

conducta precopulatoria estimada a través de la latencia de monta y de intromisión (el tiempo que transcurre desde la presentación de la hembra hasta que el macho realiza la primera monta o intromisión) proporcionan una estimación de la motivación sexual del individuo (González-Pimentel y Hernández-González, 2002).

Algunas otras formas de medir la motivación sexual de los individuos se han realizado mediante pruebas conductuales en las que las preguntas básicas son: ¿Qué prefiere una rata saciar su hambre, su sed o sus impulsos sexuales? ¿Qué niveles de privación son necesarios para que una necesidad biológica anule a otra? ¿Cuánto dolor soportara un individuo para reducir su impulso sexual? Atravesar un campo eléctrico, accionar una palanca o internarse en un laberinto para tener acceso a una hembra receptiva, son ejemplos de pruebas conductuales utilizadas para medir la motivación sexual (González-Pimentel y Hernández-González, 2002).

Sin embargo, en estos diseños se pierden de vista varios aspectos como por ejemplo; a diferencia de la privación de alimento o agua, la privación sexual no existe. La duración de la abstinencia sexual no tiene relación con la intensidad de la conducta sexual. Por lo que se ha concluido que la motivación sexual no aumenta con la privación (Agmo, 2010). En los casos que el animal se somete a estímulos dolorosos o campos eléctricos, el sujeto es sometido a dos motivaciones opuestas, una de acercamiento al incentivo sexual y otra de alejamiento del incentivo negativo de choques eléctricos en las patas. La conducta será resultado de la suma de estas dos motivaciones, lo que causa confusión y la imposibilidad de interpretar el efecto de las manipulaciones experimentales (Agmo, 2010).

Un método para medir la motivación de una manera más directa y sencilla es la prueba de motivación sexual incentivada (MSI). Tiene sus bases en que para que se dé la copula requiere que dos individuos se encuentren en proximidad. Dada esta premisa, la prueba de MSI permite cuantificar las conductas de acercamiento con un fin sexual dado que permite disociarlo del acercamiento con un fin social a través del uso de un incentivo social y uno sexual. El método consiste de un campo abierto modificado con forma rectangular, en donde estos dos tipos de incentivos se colocan en la periferia detrás de mallas de alambre. El sujeto experimental es libre de moverse

en el campo y la medida de las conductas de acercamiento es el tiempo que pasa el sujeto en el área próxima al incentivo sexual (sujeto del sexo opuesto, posible pareja sexual) comparada con el tiempo que pasa en la cercanía del incentivo social (individuo del mismo sexo) (Agmo, 2010). Utilizando el procedimiento descrito se ha demostrado que el valor del incentivo sexual depende de hormonas sexuales.

1.7.1. Aspectos Neuroendocrinos de la CSM

Las hormonas gonadales regulan la expresión de conductas reproductivas, especialmente en áreas neuroanatómicas involucradas en la regulación de la CSM. Así se sabe, que el núcleo ventromedial del hipotálamo (VHM), el APOm, el NAM y el lecho de la estría terminal, son regiones del SNC blanco de hormonas gonadales, estructuras que a su vez son esenciales para que se propicien las respuestas copulatorias en el macho (Blaustein, 1992; Hull et al., 2006).

Tanto la fase apetitiva o motivacional como la consumatoria requieren de una compleja regulación hormonal, en el caso del macho depende de hormonas testiculares, en especial de T producida por las células de Leydig de los testículos o en diferentes áreas cerebrales (Steckelbroeck et al., 2001) que se metaboliza en sus células blanco a E₂ (por aromatización) o dihidrotestosterona (DHT) (por 5 α -reducción) y al variar los niveles circulantes de estas hormonas puede modificar la expresión de estos componentes (Moralí, 1998; Hull y Domínguez, 2007; Rochira, et al., 2005). En este sentido, la castración en mamíferos suprime en forma gradual la expresión de la CSM en un lapso de días o semanas, a pesar de que la T deja de detectarse en plasma aproximadamente después de 24 horas. Se sabe que la administración de T es capaz de restituir la capacidad de los machos para la monta, inserción peneana y eyaculación (Krey y McGinnis, 1990; Hull et al., 2006). La DHT se considera el metabolito activo de la T en tejidos periféricos sensibles a andrógenos como la próstata, sin embargo múltiples estudios muestran que resulta inefectiva para estimular la CSM si no se administra en compañía de metabolitos aromatizables (Vagell y McGinnis, 1997; Hull et al., 2006). Por otra parte, la administración de E₂, andrógenos aromatizables (androstendiona y androstendiol) y andrógenos que pueden interactuar con REs

como el 5α - 3β androstandiol, son capaces de restituir la conducta sexual de la rata macho castrada (Moralí, 1998). De hecho, las acciones de la T sobre esta conducta pueden ser interferidas por la administración de inhibidores de la aromatasa, por lo que se ha propuesto que las hormonas estrogénicas juegan un papel fundamental en la expresión de esta conducta sobre todo a nivel SNC (Moralí et al., 1977). Por otro lado, algunos trabajos reportan que el tratamiento con E₂ únicamente puede restablecer parcialmente la conducta copulatoria (no restablece el patrón de eyaculación), por lo que podría ser necesaria la metabolización de T a DHT para mantener las funciones motoras y sensoriales en tejidos periféricos (Hull et al., 2006).

En cuanto a la participación de estas hormonas en la fase motivacional de la CSM existen pocos estudios y resultan controversiales. Acerca de la contribución de E₂ en el mantenimiento de la motivación sexual. Roselli y cols. (2003) reportaron que al inhibir la producción de E₂ administrando fadrozole (inhibidor de la aromatasa) se disminuye la motivación sexual medida como un incremento en la latencia de monta y una disminución de cambios de nivel anticipatorios y la administración de E₂ disminuye la latencia de monta pero no restablece la motivación en la prueba de cambio de nivel (Roselli et al., 2003). En un estudio más reciente la administración de E₂ disminuye la latencia de monta e incrementa la investigación anogenital en animales castrados previamente tratados con DHT, sin embargo, el tratamiento con E₂ no restituye la motivación en la prueba de cambio de nivel (Kaufman et al., 2013). Attila y cols (2010) analizaron la participación de la T, el E₂ y la DHT en la motivación sexual mediante la prueba de MSI. En esta prueba tanto el E₂ como DHT por si solos no logran restablecer la motivación sexual en ratas macho castrados, únicamente la combinación de ambos y la administración de T la reestablecen en su totalidad. En este mismo estudio la administración de fadrozole es capaz de inhibir el efecto de la T sobre la prueba de MSI.

2. ANTECEDENTES

2.1. Modelo de depresión inducido neonatalmente por clomipramina

Un modelo animal se define como una preparación experimental desarrollada en una especie para estudiar patologías humanas o condiciones fisiológicas de estudio. Los modelos de psicopatologías humanas buscan desarrollar síndromes en animales que reflejen en uno o varios componentes de síndromes humanos, aunque los modelos pueden no reflejar todos los aspectos de la psicopatología. Así, un modelo animal puede simular sólo alguno de ellos como; etiología, síntomas o respuesta a tratamientos.

En la década de los 80`s Mirmiran y cols. (1981) realizaron investigaciones con el fin de analizar el papel del sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR) en la maduración cerebral de la rata y su conducta en la edad adulta. Para ello privaron a ratas neonatas de SMOR mediante la administración neonatal de clomipramina (CMI), un fármaco antidepresivo inhibidor de la recaptura de monoaminas y poderoso supresor de SMOR. En la edad adulta, estas ratas manifestaron una reducción de la conducta sexual masculina, disminución en la búsqueda de conductas de recompensa, incremento en la actividad motora y una mayor latencia de SMOR (Neill, 1990; Vogel *et al*, 1982; Vogel *et al.*, 1990a, 1990b, 1990c, 1990d), alteraciones que semejan algunos de los signos de la depresión humana, como por ejemplo, disminución de la libido, anhedonia y alteraciones en el patrón de SMOR. Además de estas alteraciones, el tratamiento neonatal con CMI incrementa el tiempo de inmovilidad en la PNF (Velázquez-Moctezuma y Díaz, 1992). Por todo ello fue propuesto como un modelo animal de depresión (Vogel y Vogel, 1982) con gran validez de apariencia, por su capacidad de reproducir varios de los signos del cuadro depresivo humano, los cuales se ha observado que se pueden revertir con la administración de antidepresivos como la fluoxetina (Vázquez-Palacios, 2005) o terapias conductuales como la privación del SMOR (Vogel *et al.*, 1990b). Así mismo, este modelo presenta validez teórica, ya que estas alteraciones han sido atribuidas a deficiencias en sistemas de neurotransmisión tales como: el noradrenérgico, dopaminérgico, colinérgico o serotoninérgico, acorde

con las principales hipótesis sobre el origen neuroquímico de la depresión que postulan que la causa de este padecimiento es la hipofunción de más de uno de estos sistemas de neurotransmisión (Van de Kar, 1989).

Se ha propuesto que las anormalidades conductuales de este modelo son debidas a cambios a largo plazo en la función de los neurotransmisores monoaminérgicos durante la maduración cerebral, así como de su interacción con otros sistemas de neurotransmisión. La CMI y su metabolito desmetilado son inhibidores de la recaptura de 5-HT y NA, neurotransmisores que parecen tener un papel importante en el neurodesarrollo. Diferentes estudios han mostrado que manipulaciones farmacológicas realizadas en el cerebro inmaduro pueden producir cambios permanentes en el contenido de neurotransmisores o en la cantidad de sus receptores en el cerebro maduro (Vijayakumar y Meti, 1999; Whitaker-Azmitia, 1991). Así, diversos estudios han mostrado que en este modelo existen alteraciones neuroquímicas como una disminución en los niveles hipotalámicos de 5-HT (Feenstra *et al.*, 1996). En este sentido, se ha reportado que los niveles de 5-HT y NA se encuentran disminuidos en la corteza frontal, hipocampo, tallo cerebral, hipotálamo y septum (Vijayakumar y Meti, 1999). Además de las alteraciones en los niveles de 5-HT, también ha sido reportado un decremento en la tasa de disparo neuronal en el núcleo del rafé dorsal que podría ser causado por un probable incremento en la activación o en el número de receptores 5-HT_{1A}, ya que la activación de este receptor inhibe el disparo neuronal en el núcleo del rafé e induce una disminución en los niveles de 5-HT (Kinney *et al.*, 1997). Estas alteraciones en los sistemas de NA y 5-HT así como en las interacciones con otros sistemas de neurotransmisión han sido vinculadas con la etiología de la depresión y con alteraciones conductuales, particularmente de la CSM.

Recientes estudios en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento neonatal con CMI disminuye los niveles de ARNm del receptor 5-HT_{1A} en núcleo del rafé mientras que los incrementa en hipocampo e hipotálamo. Por otro lado, no se altera la sensibilidad farmacológica del receptor ante la administración de 8-OH-DPAT en la PNF el cual induce efecto antidepresivo al inducir una disminución de la inmovilidad

acompañada de un incremento del nado (Limón-Morales et al., 2014a). Sin embargo, actualmente existe una controversia en cuanto al papel de los receptores pre y post sinápticos en dicho efecto antidepresivo.

Por otro lado, en este modelo, investigaciones en nuestro laboratorio han mostrado que los niveles plasmáticos de T no se modifican en las ratas tratadas neonatalmente con CMI (Bonilla-Jaime *et al.*, 2003a; 2003b), por lo que las alteraciones en la CSM pueden ser atribuidas a alteraciones en la producción de metabolitos de la testosterona como E₂ o DHT o en la expresión de los REs que parecen tener una participación más importante a nivel SNC (Weiser et al., 2008).

Una de las alteraciones en los pacientes con depresión es una disminución de la libido, así también el modelo neonatalmente inducido por CMI presenta una disminución en la CSM la cual se ha asociado con una disminución en la motivación más que con la ejecución debido a que presenta un incremento en las latencias para iniciar la copula entre otras alteraciones. Anteriormente, en roedores la motivación que lleva al individuo a la búsqueda y al inicio de la interacción con la pareja se analizaba de manera indirecta a través de los parámetros copulatorios como la latencia de monta, latencia de intromisión y periodo refractario (González-Pimentel and Hernández-González, 2002), sin embargo, una prueba que permite evaluar la conducta motivacional de manera más objetiva es a través de la prueba de MSI. A pesar de que varios autores analizan el efecto de la administración de CMI sobre la conducta sexual, hasta el momento no existen estudios que analicen el efecto de CMI sobre la motivación sexual. En este mismo modelo en trabajos previos de nuestro grupo se analizaron diferentes hormonas gonadales en las alteraciones de la conducta sexual de ratas CMI, mostrando que el tratamiento con E₂ logra disminuir las latencias de monta e intromisión posiblemente a través de una mejora en la motivación sexual, mientras que la administración de E₂+DHT logra restablecer todos los parámetros alterados. Recientemente diferentes autores han analizado el papel de hormonas gonadales en la motivación sexual (Attila et al., 2010) por lo que es de interés analizar si las hormonas utilizadas para restablecer la CSM en este modelo podrían restablecer la motivación de un modo similar.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la depresión constituye un grave problema de salud pública y resulta de suma importancia el estudio de las bases neurobiológicas de este padecimiento, lo cual permitirá proponer nuevas y mejores estrategias para su tratamiento. El modelo de depresión inducido por el tratamiento neonatal con CMI presenta grandes similitudes con la sintomatología de la depresión endógena en humanos, como son alteraciones del SMOR, disminución en la búsqueda de conductas recompensantes, incremento en la actividad motora, además de una hipersecreción de corticosterona. Estas alteraciones en las ratas tratadas neonatalmente con CMI han sido atribuidas a deficiencias en sistemas de neurotransmisión tales como; el sistema noradrenérgico y el sistema colinérgico sistemas que se encuentran alterados en pacientes con depresión.

Se sabe que el tratamiento neonatal con CMI genera alteraciones específicamente sobre el sistema serotoninérgico al disminuir la concentración de 5-HT en áreas como el septum y el hipocampo y un incremento en la tasa de disparo neuronal en el núcleo del rafé dorsal, indicando una posible alteración en el receptor 5-HT_{1A}, el cual cuando es activado inhibe el disparo neuronal y la liberación de 5-HT y constituye un importante blanco de fármacos antidepresivos, ya que ISRS pueden desensibilizarlo y de este modo ejercer su efecto terapéutico. Además, se encuentra sobre expresado en pacientes deprimidos víctimas de suicidio y en algunos modelos de depresión. Trabajos previos han demostrado que este receptor no muestra alteraciones en la sensibilidad farmacológica a 8-OH-DPAT (agonista de 5-HT_{1A}), sin embargo, existe una controversia acerca del papel de los receptores pre y postsinápticos en este efecto.

Por otro lado, las ratas tratadas neonatalmente con CMI presentan un deterioro de la CSM, entre ellas una alta latencia de monta y de intromisión (posible indicador de disminución de la motivación). Esta conducta que es regulada tanto por neurotransmisores como por hormonas como la T. Sin embargo, los niveles de esta hormona en ratas tratadas con CMI no se ven alterados La testosterona se metaboliza a la DHT encargada de mantener la integridad de órganos periféricos y el E₂

responsable de los efectos centrales de la testosterona sobre la conducta copulatoria. Además, se sabe que hormonas estrogénicas pueden regular múltiples procesos fisiológicos en la depresión. Trabajos previos en el laboratorio han demostrado que los niveles plasmáticos de la T no se modifican (Bonilla-Jaime *et al.*, 2003a; 2003b); sin embargo, la administración del E₂ y la DHT) revierten las alteraciones en la conducta sexual de este modelo por lo que se ha propuesto que pueden existir alteraciones en algunos de sus metabolitos como el E₂.

Por todo lo anterior, resulta de interés el análisis de la participación de los receptores 5HT_{1A} pre y post-sinápticos en el efecto antidepresivo de 8-OH-DPAT y la participación de E₂, así como de sus receptores en las alteraciones conductuales de este modelo.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación del E₂ y el receptor 5-HT_{1A} en las alteraciones conductuales en un modelo animal de depresión.

4.1. *Objetivos particulares*

- Analizar la función de los receptores 5-HT_{1A} pre y post-sinápticos en la PNF.
- Evaluar si el E₂ produce efecto antidepresivo en ratas tratadas neonatalmente con CMI evaluado en la PNF.
- Analizar el efecto del tratamiento neonatal con CMI sobre el componente motivacional de la conducta sexual, por medio de la prueba de motivación sexual incentiva (MSI).
- Determinar el efecto de la administración de E₂, E₂+DHT, DHT y T sobre la motivación sexual de ratas tratadas con CMI, por medio de la prueba de MSI.
- Analizar el efecto del tratamiento neonatal con CMI los niveles séricos de T y E₂.
- Determinar el efecto del tratamiento neonatal con CMI sobre la población neuronal del núcleo del rafé dorsal, hipocampo, área preóptica media (APOm) y núcleo preóptico medial (NPOm).
- Analizar el efecto del tratamiento neonatal con CMI sobre la expresión de los receptores a estrógenos α y β en ratas tratadas con CMI en rafé dorsal, hipocampo, área preóptica media (APOm) y núcleo preóptico medial (NPOm).

5. HIPÓTESIS

- Si la administración neonatal con CMI modifica la función de los receptores 5-HT_{1A} pre y/o post-sináptico entonces el tratamiento con un agonista del receptor 5-HT_{1A}, el 8-OH-DPAT, no ejercerá efecto alguno en la PNF.
- La administración de E₂ reducirá el incremento de la conducta de inmovilidad por efecto del tratamiento neonatal con CMI e incrementará la conducta de nado en la PNF.
- Si el tratamiento neonatal con CMI disminuye los niveles de E₂, y T o modifica la expresión de los receptores a estrógenos entonces la administración de T, DHT y E₂ revertirá las alteraciones en la motivación sexual.

6. METODOLOGÍA

6.1. *Modelo animal de depresión neonatalmente inducido por CMI*

Se obtuvieron hembras gestantes provenientes del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Cada una se colocó en una caja individual y mantenidas en ciclos invertidos de 12: 12 horas de luz-oscuridad (luz de 20:00 a 8:00) a una temperatura constante (24 °C) y libre acceso a comida y agua. Las crías macho se seleccionaron en el día 4 de vida posnatal, posteriormente se colocó un número igual de crías macho con cada hembra lactante (n=6), mientras que las crías hembras fueron sacrificadas.

Todos los machos junto con sus respectivas nodrizas fueron divididos en dos grupos, a cada uno de los cuales se le administraron los siguientes tratamientos por vía subcutánea: grupo control (0.1 ml de solución salina (CON) y grupo experimental (15 mg/kg de clorhidrato de CMI), del día 8 hasta el 21 de vida posnatal. Estos tratamientos fueron aplicados dos veces al día (8:00 y 18:00 horas). Cuando los machos cumplieron 25 días de edad fueron destetados y divididos en grupos (n=6). Posteriormente, luego de cumplir 3 meses de edad, se realizaron las manipulaciones experimentales respectivas.

6.2. • *Análisis de la función de los receptores 5-HT_{1A} pre y post-sinápticos en la PNF en la prueba de nado forzado (PNF).*

Descripción de la PNF

La prueba de nado forzado se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Lucki y colaboradores (1997; Vázquez-Palacios et al., 2005). Se colocó a cada rata en un cilindro de vidrio (46 cm de alto x 20 cm de diámetro) conteniendo una columna de agua de 30 cm a una temperatura de 24°C (±1°C). Este método ha sido previamente descrito y ha mostrado validez para detectar propiedades antidepressivos de diversos fármacos (Detke et al., 1995).

Se realizaron dos sesiones de prueba: la primera con una duración de 15 minutos y la segunda 24 horas después, con una duración de 5 minutos con la finalidad de evaluar el efecto de los tratamientos. En esta segunda prueba se evaluaron las siguientes conductas de acuerdo con Lucki (1997):

- Inmovilidad: permanece flotando y sólo realiza los movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua.
- Nado: realiza movimientos activos de desplazamiento más de los necesarios para mantener su cabeza fuera del agua, por ejemplo: movimientos alrededor del cilindro.
- Escalamiento: movimientos con sus patas delanteras, usualmente por las paredes dirigidas hacia la boca del cilindro.

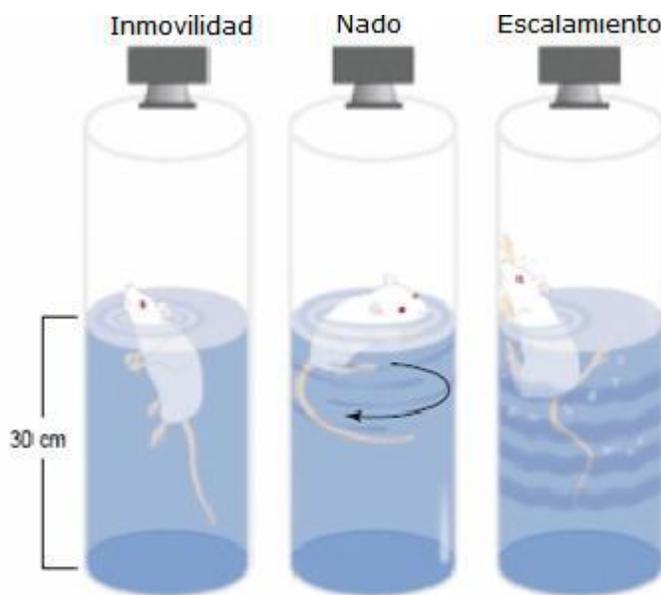


Figura 3. Ratas sometidas a la PNF modificada para poder evaluar conductas activas. Se muestran las tres conductas evaluadas durante la prueba: inmovilidad, nado y escalamiento. Modificado de: Cryan et al., 2002.

Se tomaron registros del comportamiento de las ratas en un muestreo cada 5 segundos (número de cuentas). durante los 5 minutos que dura la PNF (60 cuentas en

total). La prueba fue realizada 4 horas después del inicio de la fase de oscuridad (12:00 pm).

Procedimiento experimental

Con el fin de evaluar la participación de los receptores 5-HT_{1A} pre y post-sinápticos en el efecto del 8-OH-DPAT en la PNF se administró tanto al grupo CON como CMI, vía intraperitoneal, un inhibidor de la síntesis de 5-HT; PCPA (vía intraperitoneal) previo a la administración de 8-OH-DPAT (vía subcutánea) en el siguiente esquema: PCPA (72, 48 y 24 horas antes de la PNF) y 8-OH-DPAT (48, 24 y 1 hora antes de la PNF), ambos grupos se dividieron como sigue cada uno con una n=7.

- solución salina (0.1mL)
- 0.25 mg/kg 8-OH-DPAT (0.1mL)
- 100 mg/kg PCPA (1mL)
- 100 mg/kg PCPA + 0.25 mg/kg 8-OH-DPAT (0.1mL)

6.3. Evaluación del efecto antidepresivo de E₂ en la PNF

Para realizar la evaluación del efecto antidepresivo del E₂, a ambos grupos se les administró un tratamiento crónico de E₂ por 14 días, posteriormente se realizó la PNF y los grupos CON y CMI se dividieron de la siguiente forma:

- Sham + aceite (0.1mL) (n=7)
- Castrado (ORQ) + aceite (0.1mL) (n=7)
- ORQ + 5 µg de 17β-estradiol (0.1mL) (n=7)
- ORQ + 10 µg de 17β-estradiol (0.1mL) (n=7)

Dosis efectivas tomadas de Martínez-Mota et al., 2008. Al finalizar los tratamientos todos los grupos fueron sometidos a la PNF. La prueba fue realizada 4 horas después del inicio de la fase de oscuridad (12:00 pm).

6.4. Análisis de la motivación sexual en ratas tratadas neonatalmente con CMI.

La secuencia temporal de los experimentos realizados para cumplir con los objetivos 3 y 4 se observa en la Figura 4. Una semana antes de comenzar el

experimento, tanto machos CON como CMI fueron sometidos a tres pruebas de habituación en la caja de MSI, cada prueba tuvo una duración de 10 minutos y se realizaron con una diferencia de 48 h entre cada una. Durante las sesiones de habituación las cajas de incentivo se encontraban vacías y entre cada animal experimental se limpió cuidadosamente la arena con una solución de etanol al 70%, esperando a que este se evaporara completamente antes de iniciar con el experimento. La prueba comenzó 4 horas después del inicio de la fase de oscuridad (12:00 pm).

La prueba de MSI consistió de dos sesiones de 10 minutos durante las cuales se colocó al sujeto experimental en el centro de la arena en condiciones idénticas a la habituación, excepto que las cajas de incentivos contenían una hembra receptiva (incentivo sexual) o un macho (incentivo social). La posición de los incentivos se alternó en cada sesión para balancear el efecto de la preferencia de lugar. Se registró el tiempo que la rata experimental pasaba en la cercanía de los incentivos (área relacionada al incentivo) considerando el tiempo a partir de que el animal colocaba dos patas dentro del área marcada. Se evaluó el tiempo que el macho se encontrara en el área relacionada al incentivo fue contabilizado y calculado con la fórmula:

$$\frac{\text{(Tiempo con hembra)}}{\text{(Tiempo con hembra) + (Tiempo con macho)}} = \text{Índice de preferencia}$$

Así a los machos CMI como CON (n=7 por grupo) se evaluaron en condiciones basales y después de haber sido sometidos a 3 pruebas de CSM (ver descripción adelante). La última prueba se realizó 48 h después de que los machos tuvieron interacción sexual con la hembra.

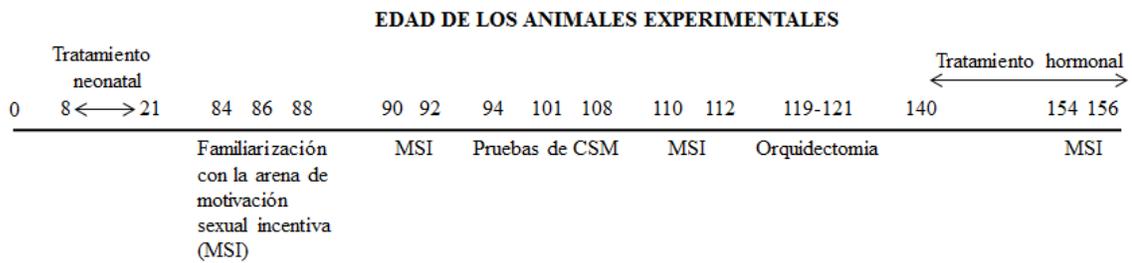


Figura 4. La línea de tiempo ilustra la secuencia temporal de eventos en las manipulaciones experimentales de los animales experimentales desde el nacimiento hasta el tratamiento hormonal.

Prueba de Motivación Sexual Incentiva

La arena de MSI consta de una caja de acrílico negro (100 x 50 cm, 45 cm de alto). En dos de sus esquinas posee 2 cajas donde se colocaron los incentivos (25x15, 25 cm de alto), las cuales se encuentran separadas de la caja principal por una malla de alambre, de manera que los animales únicamente puedan escuchar y oler a los incentivos, dichos incentivos fueron **social** (macho) y **sexualmente relevante** (hembra receptiva). Enfrente de cada caja de los incentivos se encuentra una zona virtual (25x21 cm) denominada área relacionada al incentivo. Para descripción detallada del aparato ver Ågmo, 2003; Ågmo et al., 2004; Spiteri y Ågmo, 2006 (Figura 5).

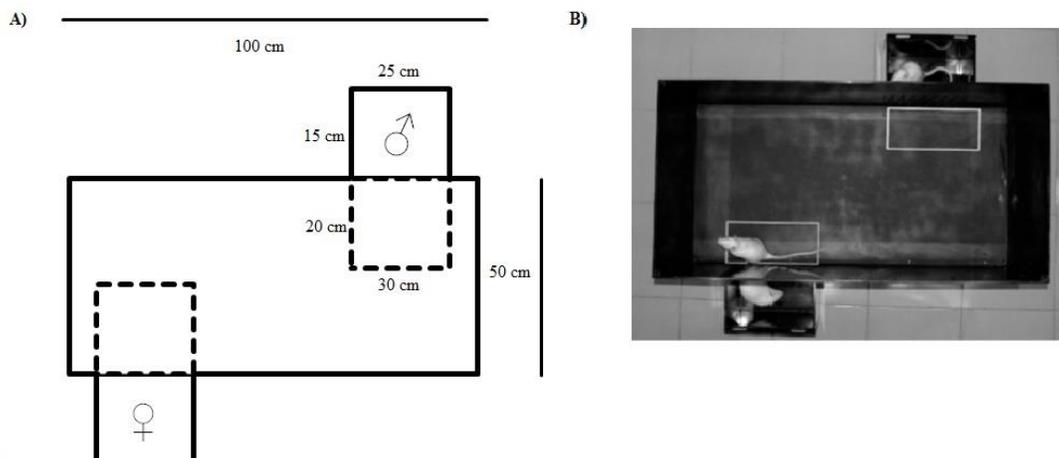


Figura 5. Descripción de caja para Motivación Sexual Incentiva (MSI). A) Dimensiones de cada uno de los componentes de la caja. Las áreas asociadas a los incentivos se señalan con líneas punteadas. B) Caja de MSI conteniendo a los incentivos y al macho experimental.

Prueba de conducta sexual masculina

Con la finalidad de validar el modelo de depresión y analizar el efecto de la experiencia en la prueba de MSI se realizaron tres pruebas de CSM a ambos grupos (n=53 para cada grupo). El macho se introdujo en un redondel de plexiglás transparente con un diámetro de 45 cm con piso de aserrín, durante 5 minutos como habituación. Posteriormente se introdujo una hembra receptiva, la cual fue tratada previamente con estradiol (10 µg/0.1 ml 48 horas antes de la prueba) y progesterona (1 mg/0.1 ml 4 horas antes de la prueba). La prueba tuvo una duración de 30 minutos durante los cuales se cuantificaron los siguientes parámetros conductuales:

Latencia de monta (LM): tiempo (medido en segundos) transcurrido entre la introducción de la pareja de roedores hasta que se presenta la primera monta.

Latencia de intromisión (LI): tiempo (medido en segundos) transcurrido desde que la hembra y el macho entran en contacto hasta la primera intromisión.

Latencia de eyaculación (LE): tiempo (medido en segundos) transcurrido desde la primera intromisión hasta la primera eyaculación. Indicador del componente ejecutorio.

Intervalo posteyaculatorio o periodo refractario (PR): tiempo (medido en segundos) transcurrido entre una eyaculación y el reinicio de la actividad copulatoria, dada por una monta o una intromisión.

Número de montas (NM): número de veces que se presenta una monta en una serie eyaculatoria.

Número de intromisiones (NI): número de veces que se presenta una intromisión en una serie eyaculatoria.

Frecuencia de eyaculación (FE): número de eyaculaciones que se presentan durante el tiempo total de la prueba.

Hit rate o tasa de aciertos (HR): corresponde al número de intromisiones dividido entre el número de intromisiones más el número de montas que se presentan antes de una eyaculación, unidades arbitrarias (UA).

6.5. Efecto la administración de E₂, E₂+DHT, DHT y T en la motivación sexual en ratas CMI.

Los animales utilizados en el objetivo 2 fueron posteriormente orquidectomizados (ORQ) y 3 semanas después de la cirugía se comenzaron los siguientes tratamientos hormonales durante los siguientes 14 días. Las hormonas utilizadas fueron suministradas por Sigma Chemical and Co (St. Louis MO, USA). Testosterona (T; Androstan-17- β -ol-3-ona), 17 β -estradiol (E₂; (17 β)-estra-1, 3, 5(10)-trieno-3,17-diol), y dihidrotestosterona (DHT; 5 α -Androsten-17- β -ol-3-ona). Todos los animales se alojaron en grupos de 7 individuos, excepto en el grupo sham (n=4). Tanto los controles como los tratados neonatalmente con CMI se sometieron a los siguientes tratamientos:

- Sham + aceite (0.1 mL)
- ORQ + aceite (0.1 mL)
- ORQ + 5 μ g de 17 β -estradiol (0.1 mL)
- ORQ + 10 μ g de 17 β -estradiol (0.1 mL)
- ORQ + 5 μ g de 17 β -estradiol (0.1 mL) + 1 mg de DHT (0.1 mL)
- ORQ + 10 μ g de 17 β -estradiol (0.1 mL) + 1 mg de DHT (0.1 mL)
- ORQ + 1 mg de DHT (0.1 mL)
- ORQ + 1 mg de T (0.1 mL)

Al finalizar los tratamientos los machos se sometieron a la prueba de MSI.

6.6. Efecto del tratamiento con CMI sobre las concentraciones séricas de E₂ y T.

Tanto al grupo CON (n=8) como al grupo CMI (n=10) (sin ninguna otra manipulación excepto los tratamientos neonatales) se les realizó la cuantificación de E₂ y T mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA). A ambos grupos con 3 meses de edad se les realizó eutanasia por decapitación para obtener las muestras de sangre y posteriormente se obtuvo suero por centrifugación (1500 rpm por 30 min).

T o E₂ en suero se midieron usando los kits comerciales TKTT-1 para T y TKE-21 para E₂ (Diagnostic Product Corporation, CA, Estados Unidos). El método consiste

en un RIA con ^{125}I marcado, diseñado para la determinación cuantitativa de estas hormonas. El procedimiento se describe brevemente; se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpos (anti-estradiol o anti-testosterona), en donde la hormona marcada con ^{125}I compite por los sitios de unión al anticuerpo con la hormona presente en la muestra. Luego de la incubación, los tubos fueron introducidos en el contador gamma (Cobra, Packard, Estados Unidos) donde la cantidad de cuentas leídas están inversamente relacionadas con la cantidad de hormona presente en la muestra. La cantidad de hormona presente en la muestra se determinó comparando las cuentas con una curva de calibración (Martínez-Mota et al., 2008).

6.7. Análisis de la población neuronal y expresión de los receptores a estrógenos α y β en núcleo del rafe dorsal, hipotálamo e hipocampo de ratas tratadas con CMI.

6.7.1. Preparación de los tejidos para inmunohistoquímica por flotación.

Los animales de los grupos CON y CMI (n=3, únicamente con tratamiento neonatal) con 3 meses de edad fueron anestesiados con un cóctel integrado por una mezcla de: xylazina [2.5 mg/kg], y ketamina [22 mg/kg] vía intraperitoneal y posteriormente los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca con solución amortiguadora de lavado vascular (pH 7.4) (Ver anexo II). Seguida de paraformaldehído (4%) en solución amortiguadora de fosfatos salino (phosphate-buffered saline; PBS) 0.1 M a un pH de 7.4 con una bomba peristáltica (Masterflex, Vernon Hills, IL, Estados Unidos). Inmediatamente después de la perfusión se obtuvieron los cerebros y fueron post-fijados en paraformaldehído por 12 horas. Posteriormente se realizaron cuatro lavados de 30 min en PBS 0.1 M. Al terminar estos lavados se colocaron en soluciones con concentraciones crecientes de sacarosa (10, 20 y 30%) permaneciendo en cada una, al menos 12 horas o hasta que el tejido descendiera al fondo de la solución, durante la infiltración con sacarosa los tejidos permanecieron a 4 °C. Finalmente los tejidos fueron embebidos en medio para cortar

tejido en congelación (Tissue Tek CRYO-OCT Compound, Sakura, CA, Estados Unidos) y guardados a -70 °C hasta su utilización.

Tanto para el proceso de inmunohistoquímica como la tinción de Nissl se realizaron cortes coronales seriados de 40 µm de grosor en un criostato (CM 1850 UV, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Alemania); las cuales se lavaron en PBS 0.1 M para su procesamiento posterior. Se realizaron 18 cortes seriados de cada área divididos de la siguiente forma (6 cortes, tinción con violeta de cresilo; 6 cortes, inmunohistoquímica, RE α ; 6 cortes inmunohistoquímica, RE β).

6.7.2. Técnica de Nissl.

Con la finalidad de analizar si el tratamiento neonatal con CMI modificaba el número total de neuronas en diferentes regiones cerebrales, cortes seleccionados de cada una de las áreas se montaron en portaobjetos cargados (Kling-on HIER super charged Slides; Biocare Medical, CA, Estados Unidos) y con medio de montaje de gelatina (Ver anexo II), se tiñeron con violeta de cresilo (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) durante 20 min. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Una vez secas las laminillas se aclararon con xilol y se montaron con medio permanente (Entellan OB467707, MERCK, Alemania) cubriendo con cubreobjetos.

Las áreas medidas para cada región cerebral evaluada se definieron de acuerdo con el Atlas esterotáxico de Paxinos y Watson (2005). Cada área se delimitó de la siguiente forma:

Rafé dorsal

En la figura 6 se muestra el área limitada para la medición de los parámetros de núcleo del rafé dorsal. El área definida como núcleo del rafé dorsal se muestra definido en rojo en el diagrama. Se realizaron 6 cortes seriados del núcleo del rafé dorsal. A continuación se muestran las coordenadas de los cortes seriados utilizados.

Inicio: Interaural 1.56 y Bregma -7.44. Termino: Interaural 0.60 y Bregma -8.40.

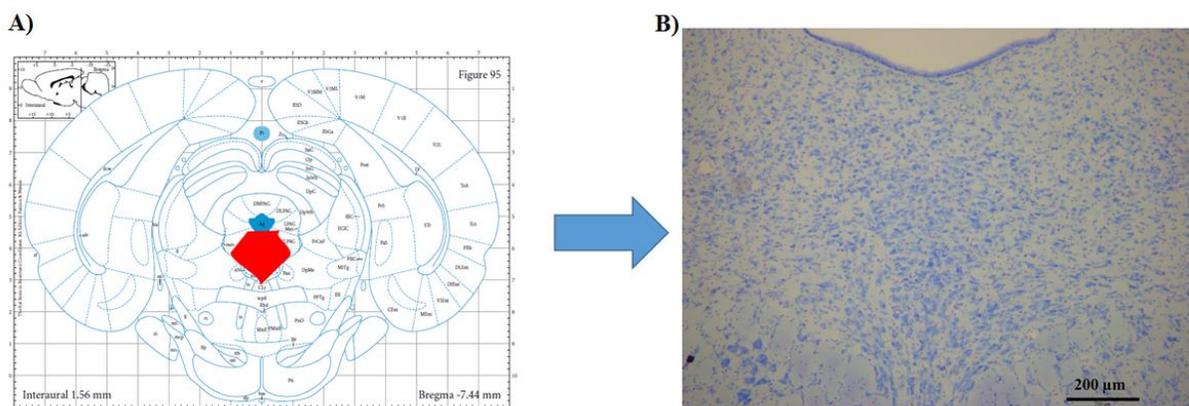


Figura 6. Límites del área seleccionada para realizar las mediciones del núcleo del rafé dorsal. Diagrama del Atlas esterotaxico de Paxinos y Watson (2005) donde se muestra definida en rojo el área que comprende el núcleo del rafé dorsal; figura 95, coordenadas Bregma -7.44 mm (A), sección de rafé dorsal teñida con violeta de cresilo (tinción de Nissl) de un sujeto control (B), (Amplificación: 10X).

Hipotálamo

Área preóptica media (APOm) y núcleo preóptico medial (NPOm)

En la figura 7 se muestra el área definida para la medición de los diferentes parámetros en el área preóptica media (APOm) y en el núcleo preóptico medial (NPOm). Las dos áreas evaluadas se muestran definidas en color rojo en el diagrama con una área de 850 000 μm^2 y 880 000 μm^2 respectivamente. A continuación se muestran las coordenadas de los cortes seriados utilizados. Se realizaron 6 cortes seriados del APOm y del NPOm.

Inicio: Interaural 9.36 y Bregma 0.36. Termino: Interaural 8.28 y Bregma -0.72

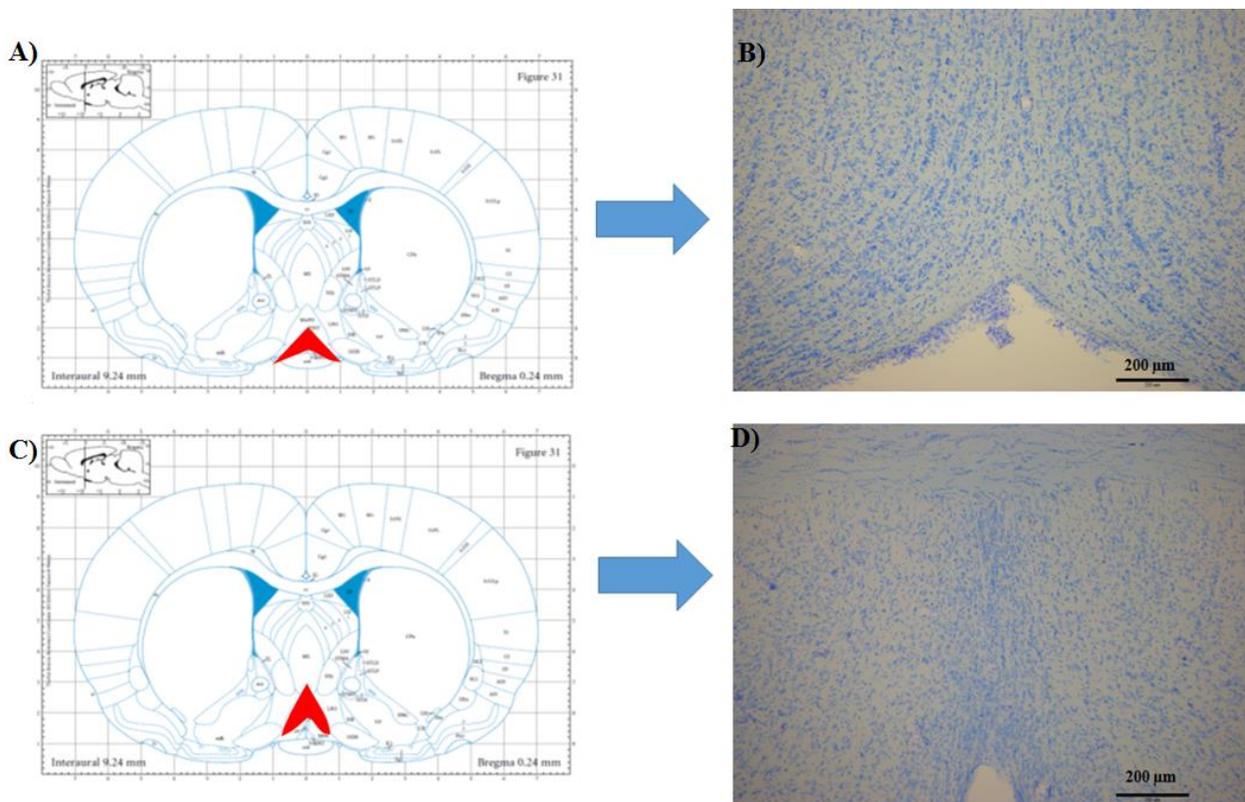


Figura 7. Límites del área seleccionada para realizar las mediciones del área preóptica media (APOm) y núcleo preóptico medial (NPOm). Diagrama del Atlas esterotaxico de Paxinos y Watson (2005) donde se muestra definida en rojo el área que comprende el APOm y el NPOm; figura 31, coordenadas Bregma -0.24 mm (A y C), sección del APOm y del NPOm teñida con violeta de cresilo (tinción de Nissl) de un sujeto control (B y D), (Amplificación: 10X).

Hipocampo

En la figura 8 se muestra el área limitada para la medición de los diferentes parámetros en hipocampo. Las áreas evaluadas CA1, CA3, *hilus* y giro dentado se muestran delimitadas dentro de un rectángulo rojo en el diagrama. Se realizaron 6 cortes seriados del hipocampo. A continuación se muestran las coordenadas en los cortes seriados utilizados.

Inicio: Interaural 5.88 y Bregma -3.12. Termino: Interaural: 4.44 y Bregma -4.56

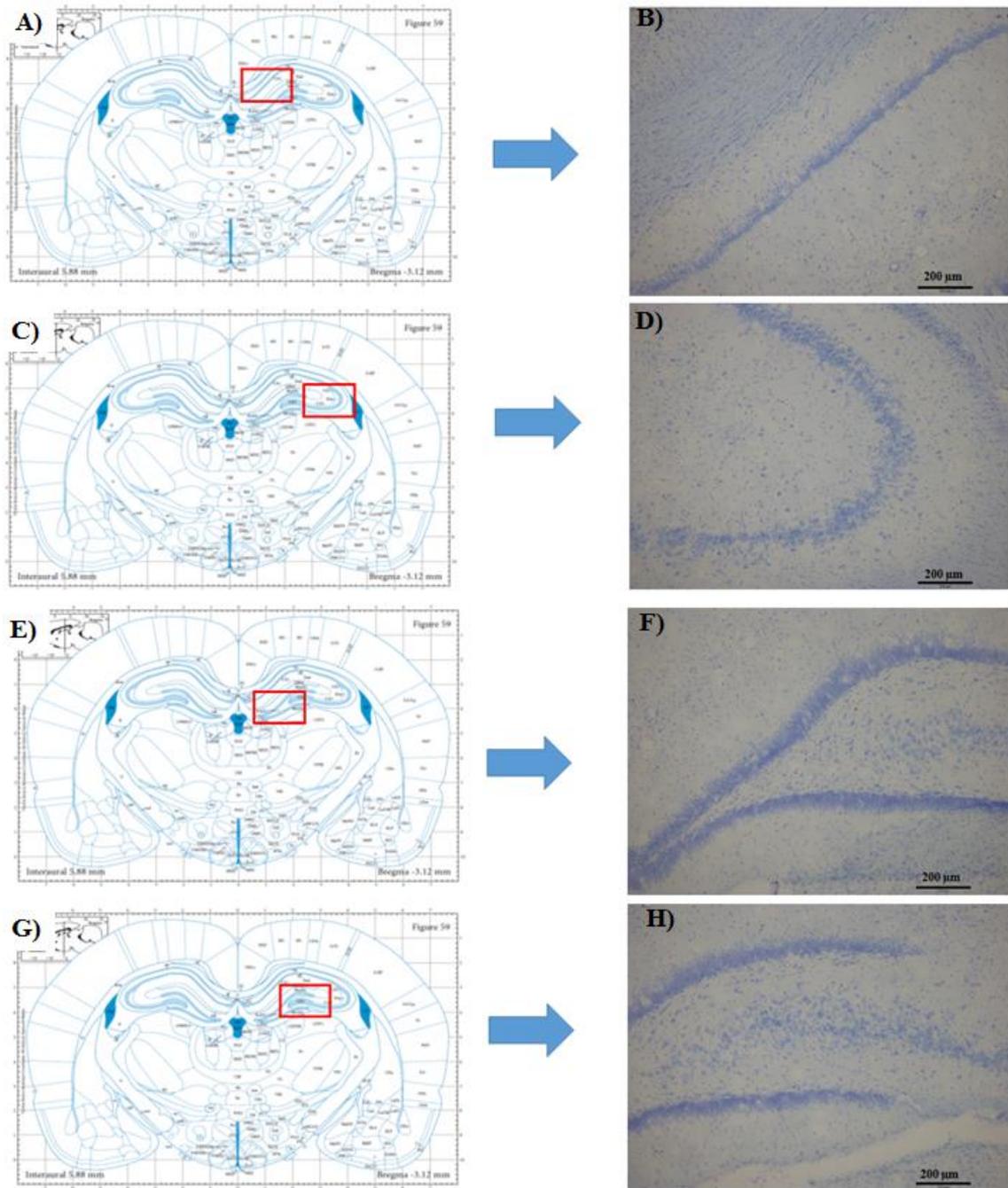


Figura 8. Límites de las áreas del hipocampo seleccionadas para realizar las mediciones de CA1, CA3, giro dentado (GD) e *hilus*. A la izquierda se muestra el diagrama del Atlas esterotaxico de Paxinos y Watson (2005) donde se muestra definida dentro de recuadros de color rojo las áreas que comprenden CA1 (A), CA3 (C), GD (E) e *hilus* (G); figura 59, coordenadas Bregma -3.12 mm. A la derecha se muestran secciones del hipocampo CA1 (B), CA3 (D), GD (F) e *hilus* (H) teñidas con violeta de cresilo (tinción de Nissl) de un sujeto control, (Amplificación: 10X).

6.7.3. Inmunohistoquímica.

Una vez lavados los tejidos con PBS 0.1 M, se procedió a bloquear la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno (3 %) durante 10 minutos y se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS 0.1 M, posteriormente se realizó un lavado con PBS 0.1 M + Twin 20 al 0.1%. Inmediatamente después, los cortes fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente con albumina de suero bovino (BSA; Sigma) al 5 % en PBS 0.1 M + Twin 20 al 0.1% (BSA+PBS+Twin). Posteriormente los cortes fueron incubados a 4 °C en BSA+PBS+Twin + el anticuerpo primario (RE α o RE β según el caso):

- RE α (anticuerpo policlonal en conejo para RE- α ; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos) dilución 1:200
- RE β (anticuerpo policlonal en conejo para RE- β ; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos) dilución 1:200.

Después de 72 horas se realizaron cinco lavados de PBS 0.1 M + Twin 20 al 0.1%, cada uno de 5 minutos. Entonces los cortes fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con inmunoglobulinas (Ig) anti-conejo biotiniladas (Biotinilate linked univaler; Dako, CA, Estados Unidos). Se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con PBS 0.1M y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el Complejo Estreptavidina-HRP Biotinilada (Streptavidin-HRP; Dako) después de lo cual se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con PBS 0.1M. El revelado del marcaje inmunohistoquímico se realizó con diaminobenzidina (DAB; Dako) durante 2 minutos aproximadamente, se detuvo la reacción con agua destilada y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agua destilada para eliminar los restos de DAB. Finalmente los cortes fueron montados en portaobjetos cargados y con medio de montaje de gelatina (Ver anexo II) y posteriormente con medio permanente (Entellan OB467707; MERCK). Los cortes fueron observados por microcopia de luz en un microscopio (DMLS, Leica Microsystems) a un aumento de 10X y se determinó el número de neuronas positivas.

6.7.4. Determinación morfométrica

Las laminillas fueron observadas con un microscopio de luz (DMLS, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Alemania) acoplado a una cámara digital (DFC 300FX Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Alemania). El tamaño del área y la densidad óptica (D.O) se evaluaron a través del programa de análisis de imágenes (Metamorph, versión 4.5; Molecular Devices, Downington, PA, Estados Unidos). Mientras que el conteo de las células totales teñidas con violeta de cresilo (tinción de Nissl) y de las células inmunorreactivas a RE α y RE β se realizó de manera manual. El área de cada región evaluada fue medida a un aumento de 10X y el conteo de células se realizó a 40X. La densidad celular total con tinción de Nissl y el número de células inmunorreactivas a RE α y RE β fueron expresadas en 10 000 μm^2 (calculado del número de células contadas en relación al área de la cual estas fueron contadas). Estudios previos han mostrado que las mediciones de D.O reflejan cambio en la expresión de proteínas paralelos a aquellos obtenidos utilizando un ensayo de medición de proteínas bioquímico como el Western blot (Mufson et al., 1997). Por lo tanto, en estas mismas células la D.O fue expresada como unidades arbitrarias de D.O.

6.8. Análisis estadístico

Para comparar los tiempos de inmovilidad en la PNF se realizó una ANOVA factorial ($2 \times 2 \times 2$) donde los factores fueron el tratamiento neonatal (CON vs. CMI), tratamiento con PCPA (salina vs. PCPA) y tratamiento con 8-OH-DPAT (salina vs. 8-OH-DPAT) con una significancia de $p < 0.05$ y $p < 0.01$.

En el caso del análisis de la motivación sexual incentiva en niveles basales y con tratamientos hormonales se analizó mediante Kruskal-Wallis seguido de prueba de Bonferroni con ajuste de Dunn, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

Los porcentajes de machos que despliegan montas intromisiones y eyaculaciones, así como los parámetros de CSM se evaluaron medio de una prueba de X^2 , con una significancia de $p < 0.05$ y $p < 0.01$.

Para analizar las concentraciones séricas de E_2 , T; la densidad celular y la D.O de los REs se realizó una prueba de t de Student para grupos independientes, con una significancia de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis de la función de los receptores 5-HT_{1A} pre y post-sinápticos en la PNF.

En la Figura 9 se muestra el análisis de la participación de los receptores pre y post-sinápticos en el efecto inducido por 8-OH-DPAT en la PNF evaluado a través del bloqueo de la síntesis de 5-HT provocado por el pre-tratamiento con PCPA. La administración neonatal de CMI induce un aumento de la inmovilidad y disminución de la conducta de escalamiento ($p < 0.05$). El tratamiento con 8-OH-DPAT disminuyó la conducta de inmovilidad, así mismo incremento la conducta de nado ($p < 0.01$) sin alterar el escalamiento en ninguno de los grupos. Por otro lado, el tratamiento con PCPA no generó cambios significativos en las conductas evaluadas en la PNF. El pretratamiento con PCPA no alteró significativamente las acciones de 8-OH-DPAT en las conductas desplegadas en la PNF.

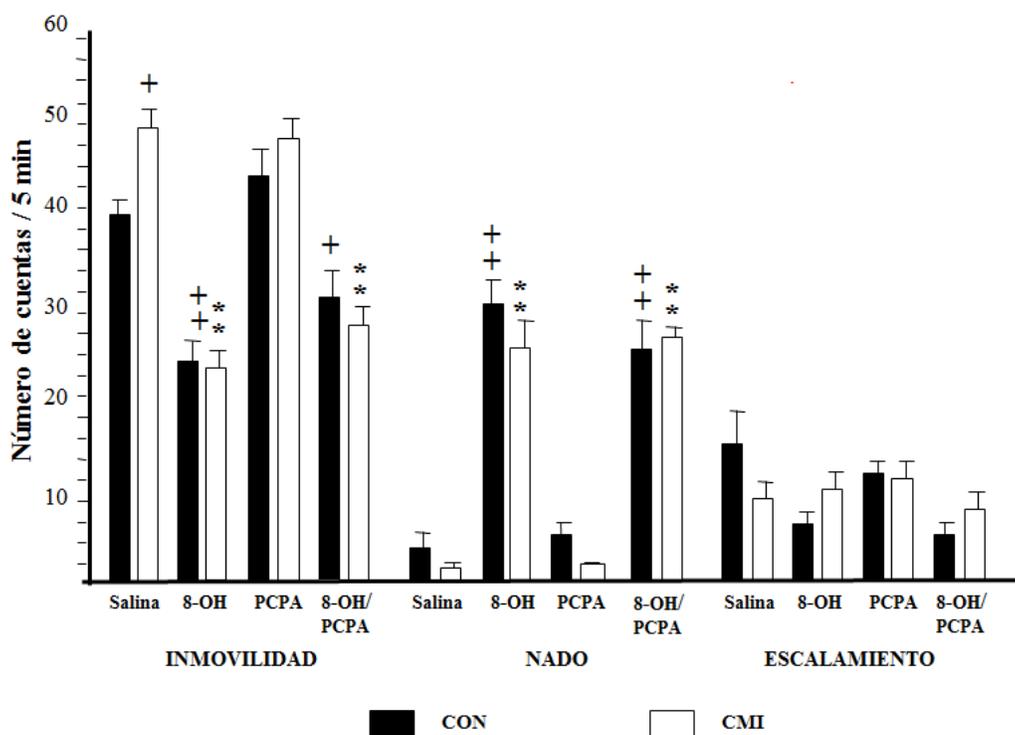


Figura 9. Efectos del pre-tratamiento con paraclorofenilalanina (PCPA) y la administración de 8-OH-DPAT sobre la prueba de nado forzado (PNF) en ratas tratadas neonatalmente con CMI ($n=7$). El pretratamiento con PCPA no altera el efecto de la administración de 8-OH-DPAT en ninguno de los parámetros conductuales evaluados. Media \pm E.E.M, ANOVA factorial * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CMI salina; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs CON salina.

7.2. Evaluación del efecto antidepresivo de E₂ en la PNF

Con respecto al efecto de E₂ en la PNF, se observa en la Figura 10. Tanto el tratamiento neonatal con CMI como la orquidectomía produjeron un incremento de la inmovilidad la cual se acompañó de una disminución en la conducta de nado ($p < 0.01$). Por otro lado, la administración de 5 μg de E₂ en ratas neonatalmente tratadas con CMI indujo una disminución de la conducta de inmovilidad e incremento de la conducta de nado ($p < 0.05$). En contraste, la dosis de 10 μg provocó una disminución de la conducta de inmovilidad además de aumentar la conducta de nado en los grupos CON ($p < 0.05$) y CMI ($p < 0.01$) comparado con los grupos SHAM. Con ningún tratamiento se observaron cambios significativos en la conducta de escalamiento.

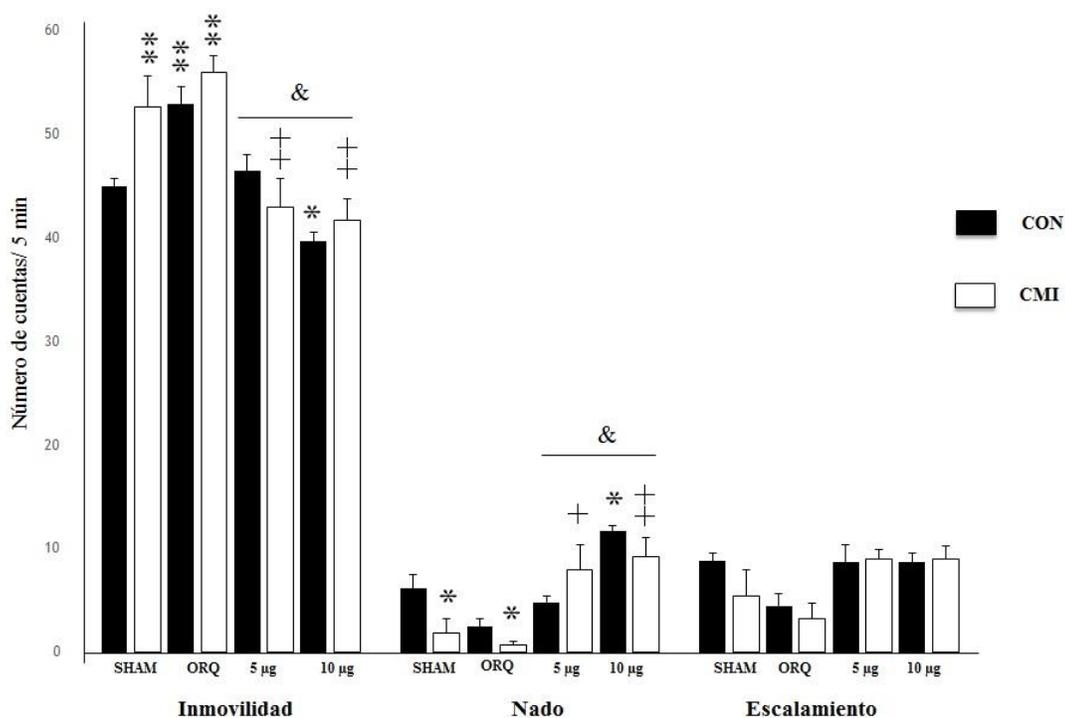


Figura 10. Efecto de la administración de 17 β -estradiol (E₂) sobre las conductas en la prueba de nado forzado (PNF) (n=7). El tratamiento con 5 μg de E₂ disminuye la inmovilidad incrementando el nado de forma significativa en el grupo tratado con clomipramina (CMI). La dosis de 10 μg disminuye la inmovilidad incrementando la conducta de nado en ambos grupos. Media \pm E.E.M, ANOVA de una vía seguida por la prueba de Newman Keuls * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CMI salina; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs CON salina; & $p < 0.01$ vs castrado (ORQ).

7.3. Análisis de la motivación sexual en ratas tratadas neonatalmente con CMI

Los efectos del tratamiento neonatal con CMI sobre la motivación sexual en ratas adultas con y sin experiencia sexual previa se muestran en la Figura 11. Se observa que la motivación dirigida al incentivo sexual se ve disminuida por efecto del tratamiento neonatal con CMI ($p < 0.05$), dado que el macho pasa el mismo tiempo en el área asociada al incentivo sexual que con el social. Por otro lado, la experiencia sexual (tres pruebas de CSM) incrementan la motivación sexual en ratas del grupo CON ($p < 0.05$), sin embargo, no produce efecto significativo en la motivación sexual del grupo tratado con CMI.

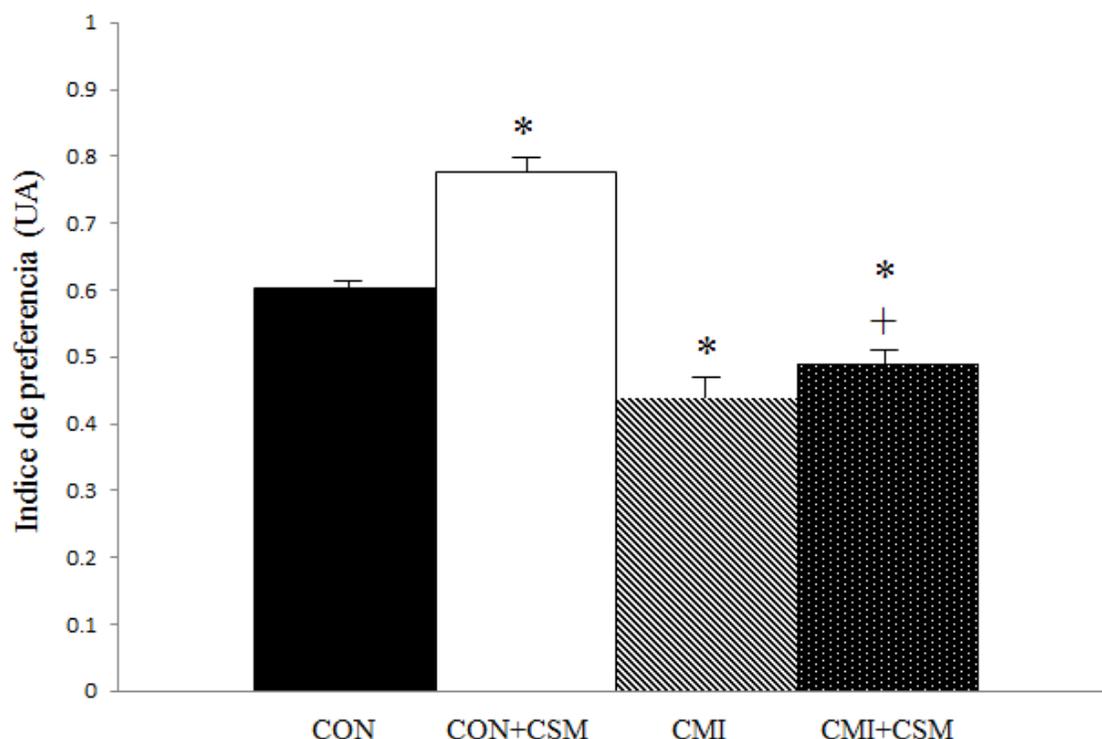


Figura 11. Efecto de la interacción sexual sobre la motivación en la prueba de motivación sexual incentiva en ratas tratadas con clomipramina (CMI) ($n=7$). La conducta sexual masculina (CSM) aumenta la motivación sexual en el grupo tratado neonatalmente con solución salina (CON), pero no modifica la reducida motivación sexual observada en el grupo CMI. Unidades arbitrarias (UA). Media \pm EEM. Kruskal-Wallis seguida de Bonferroni con ajuste de Dunn; * $p < 0.05$ vs CON; + $p < 0.05$ vs grupo CON + CSM.

El porcentaje de machos que desplegaron las conductas de monta, intromisión y eyaculación durante la tercera prueba de CSM se observa en la figura 12. El tratamiento neonatal con CMI no altera significativamente el porcentaje de machos que despliegan montas, sin embargo, disminuye el porcentaje de machos que realizan intromisiones, ya que; únicamente el 40% de machos tratados con CMI presento esta conducta ($p < 0.01$). De un modo similar solo 10% de los animales tratados con CMI presentó el patrón de eyaculación ($p < 0.01$). Esto se vio reflejado en el número de eyaculaciones (2.7 vs 1.5) en estas ratas.

Con respecto a los patrones copulatorios (Tabla 1) únicamente se muestran los resultados de los machos que presentaron los tres parámetros de CSM, es decir que montaron, realizaron intromisiones y eyacularon (51 machos CON y 5 machos tratados con CMI), el tratamiento neonatal con CMI, indujo un incremento significativo en las latencias de monta e intromisión ($p < 0.05$), llegando en el caso de la latencia de monta a 279.4 ± 55.1 segundos en machos CMI comparada con 9.2 ± 1.0 presentado por los machos CON y una latencia de intromisión de 283.2 ± 65.7 en promedio para el grupo tratado con CMI comparada con 12.6 ± 1.4 presentados por los machos tratados con solución salina.

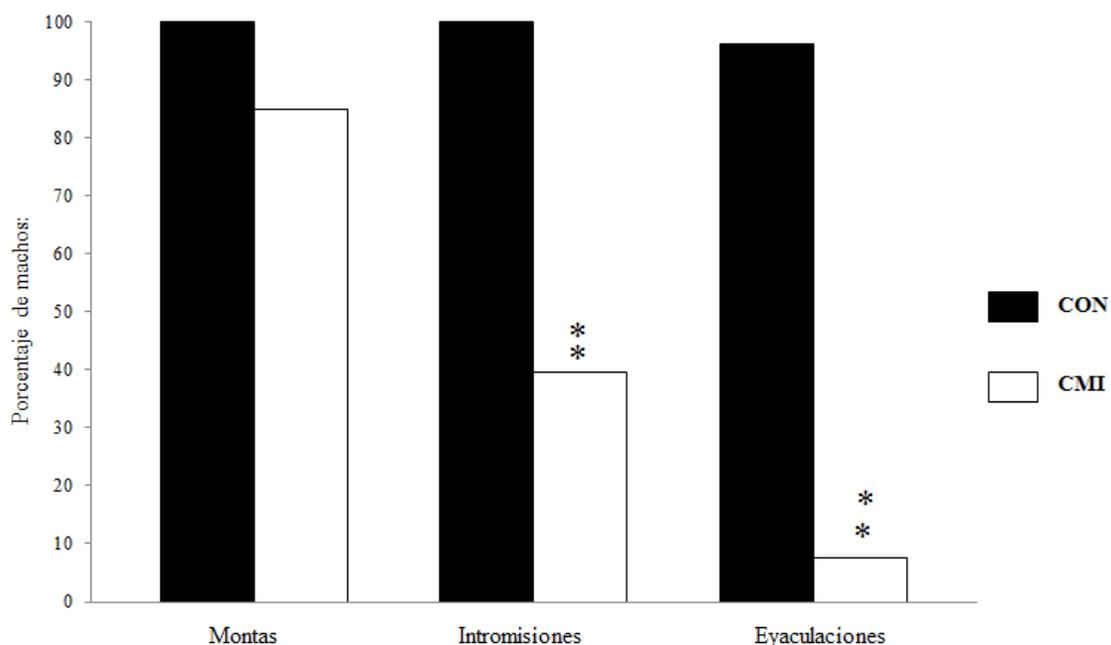


Figura 12. Porcentaje de machos tratados neonatalmente con clomipramina (CMI) que presentan montas, intromisiones y eyaculaciones en la tercera prueba de conducta sexual masculina (CSM) (n=53). El tratamiento con CMI en la etapa neonatal provocó una disminución en el porcentaje de individuos que presentaron intromisiones y eyaculaciones pero no alteró el porcentaje de machos que montan. X^2 , Media \pm E.E.M, ** $p < 0.01$ vs grupo tratado neonatalmente con solución salina (CON).

Tabla 1. Parámetros copulatorios de machos tratados neonatalmente con CMI presentados en su tercera prueba de CSM. X^2 , Media \pm E.E.M, * $p < 0.05$ vs grupo CON.

	FE	LM (seg)	LI (seg)	LE (seg)	NM	NI	HR (UA)	PR (seg)
CON (n=53)	n=51 2.7 \pm 0.1	n=53 9.2 \pm 1.0	n=53 12.6 \pm 1.4	n=51 457.4 \pm 48.9	n=51 7 \pm 0.76	n=51 12.5 \pm 0.8	n=51 0.67 \pm 0.02	n=51 380.4 \pm 24.6
CMI (n=53)	n=5 1.5 \pm 0.25	n=45 279.4 \pm 55.1*	n=21 283.2 \pm 65.7*	n=5 904 \pm 225.7	n=5 11.2 \pm 3.9	n=5 8.2 \pm 1.8	n=5 0.52 \pm 0.07	n=5 332.7 \pm 45.9

Abreviaturas: FE= frecuencia de eyaculación, LM= latencia de monta, LI= latencia de intromisión, LE=latencia de eyaculación, NM= número de montas, NI= número de intromisiones, HR= hit rate o tasa de aciertos, PR= periodo refractario, UA=unidades arbitrarias.

7.4. Efecto la administración de E₂, E₂+DHT, DHT y T en la motivación sexual en ratas CMI.

La Figura 13 muestra el efecto de la CSM sobre la motivación sexual en animales CON y CMI castrados, tratados con hormonas sexuales. La castración (ORQ + aceite, n=4 por grupo) disminuye la motivación sexual en ambos grupos (p<0.05), así mismo se observa que la administración de DHT no logro restablecerla. La administración de E₂ y E₂+DHT restauró los niveles de motivación sexual en ambos grupos CMI (p<0.05) y CON incrementándolos a niveles similares de machos CON SHAM. Sin embargo, el tratamiento con T únicamente restableció dicha motivación en el grupo CON. (Grupos sham y tratados con hormonas, n=7 por grupo).

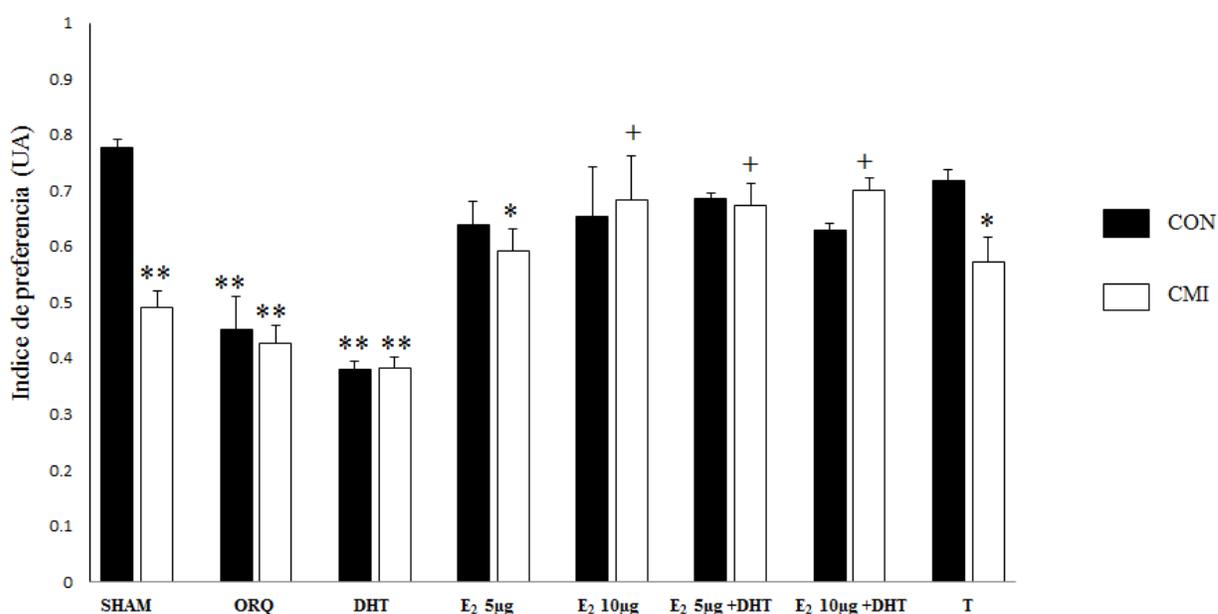


Figura 13. Efecto de la administración de diversas hormonas gonadales en la motivación de incentivo sexual de ratas tratadas con clomipramina (CMI). Tanto la combinación de 17β-estradiol (E₂) + dihidrotestosterona (DHT) y la dosis de 10mg de E₂ restablecieron la motivación sexual alterada por el tratamiento neonatal con CMI. UA: unidades arbitrarias. Media ± EEM; prueba estadística de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Bonferroni con ajuste de Dunn; *p<0.05, **p <0,001 vs CON sham; +p<0.05, ++p <0.001 vs CMI sham.

7.5. Efecto del tratamiento con CMI sobre las concentraciones séricas de T y E₂.

El tratamiento con CMI no produjo efecto significativo sobre las concentraciones séricas de T y E₂ (Tabla 2), se observa que las ratas tratadas con CMI presentan niveles hormonales similares al grupo CON.

Tabla 2. Niveles séricos de testosterona (T) y 17β-estradiol (E₂) en machos tratados neonatalmente con clomipramina (CMI) cuantificados por radioinmunoanálisis (RIA). El tratamiento con CMI no modificó los niveles hormonales. Media ± EEM; t de student; *p<0.05 vs grupo tratado neonatalmente con solución salina (CON).

	17β-estradiol pg/ml	Testosterona ng/ml
<i>CON</i> <i>n=8</i>	7.808 ± 1.96	1.2548 ± 0.083
<i>CMI</i> <i>n=10</i>	7.452 ± 2.28	1.6493 ± 0.1024

7.6. Análisis de la población neuronal y expresión de los receptores a estrógenos α y β en núcleo del rafé dorsal, hipotálamo e hipocampo de ratas tratadas con CMI.

A. Evaluación de la población neuronal

La evaluación de la población neuronal con la técnica de Nissl, en diferentes regiones cerebrales de ratas tratadas con CMI se observa en las Tablas 3, 4 y la figura 14. La administración de CMI en la etapa neonatal no altero significativamente el número de neuronas en ninguna de las áreas evaluadas en comparación con el grupo CON.

Tabla 3. Número de neuronas totales en las diferentes regiones cerebrales evaluadas en ratas tratadas neonatalmente con CMI. No se observan cambios significativos en el número de neuronas contabilizadas por región analizada para rafé, APOM y NPOM. Media \pm EEM; t de student; *p<0.05 vs grupo CON. **Abreviaturas:** APOM (área preóptica media), NPOM (núcleo preóptico medio), GD (giro dentado).

	Rafé dorsal	APOM	NPOM
	<i>Densidad celular</i> (10 000 μm^2)	<i>Densidad celular</i> (10 000 μm^2)	<i>Densidad celular</i> (10 000 μm^2)
CON	15.80 \pm 1.07	19.97 \pm 1.18	16.92 \pm 2.57
CMI	15.76 \pm 0.21	16.40 \pm 1.48	13.56 \pm 0.93

Tabla 4. Número de neuronas totales en diferentes áreas del hipocampo evaluadas en ratas tratadas neonatalmente con CMI. No se observaron cambios en el número de neuronas contabilizadas por región analizada. Media \pm EEM; t de student; *p<0.05 diferente de grupo CON.

	CA1	CA3	Hilus	GD
	<i>Densidad celular</i> (10 000 μm^2)			
CON	82.32 \pm 1.74	93.90 \pm 2.5	59.18 \pm 1.5	191.23 \pm 4.9
CMI	81.83 \pm 1.96	89.45 \pm 1.9	54.92 \pm 3.6	197.95 \pm 2.8

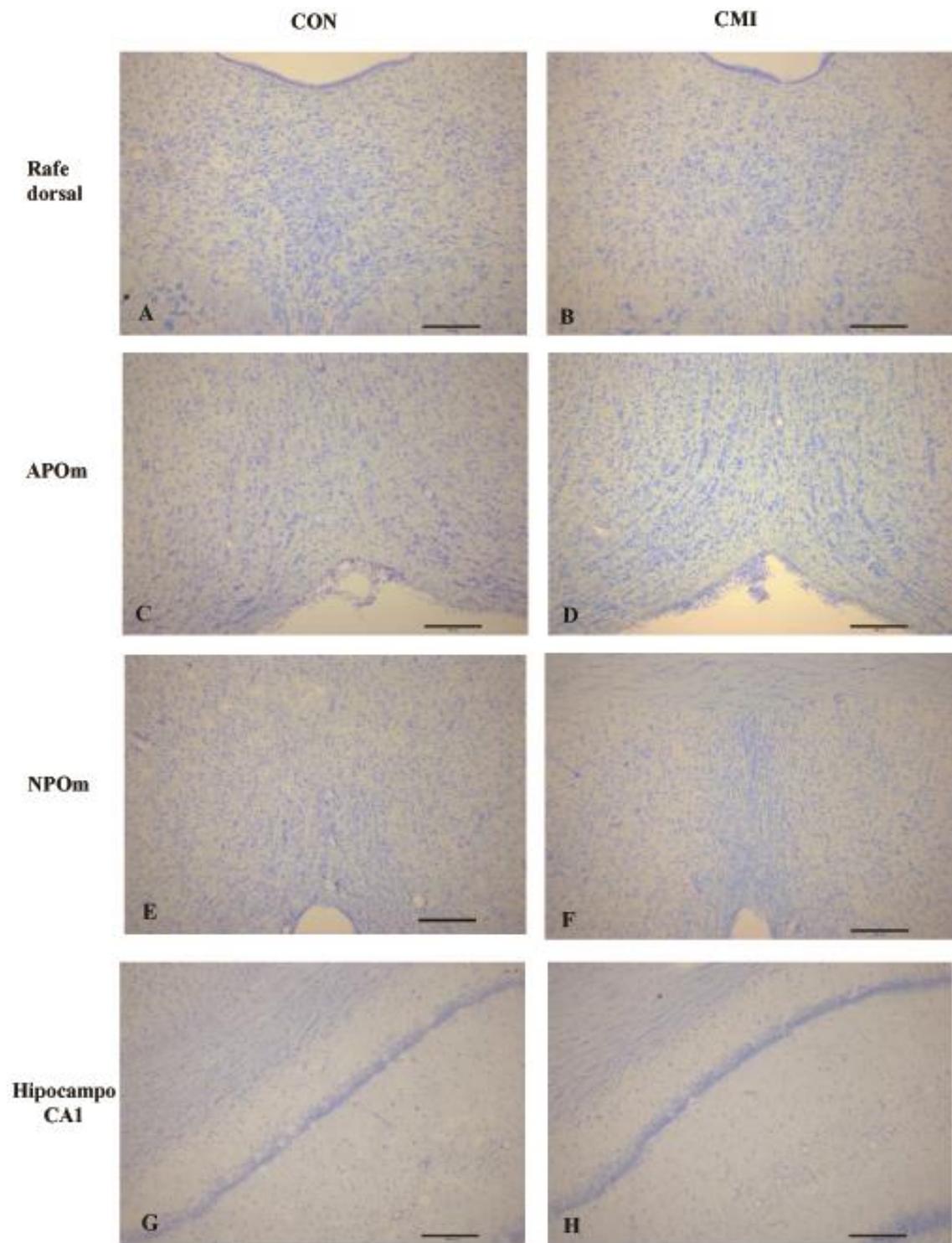


Figura 14. Ver página siguiente. Barra de calibración: 200 µm. Amplificación: 10X.

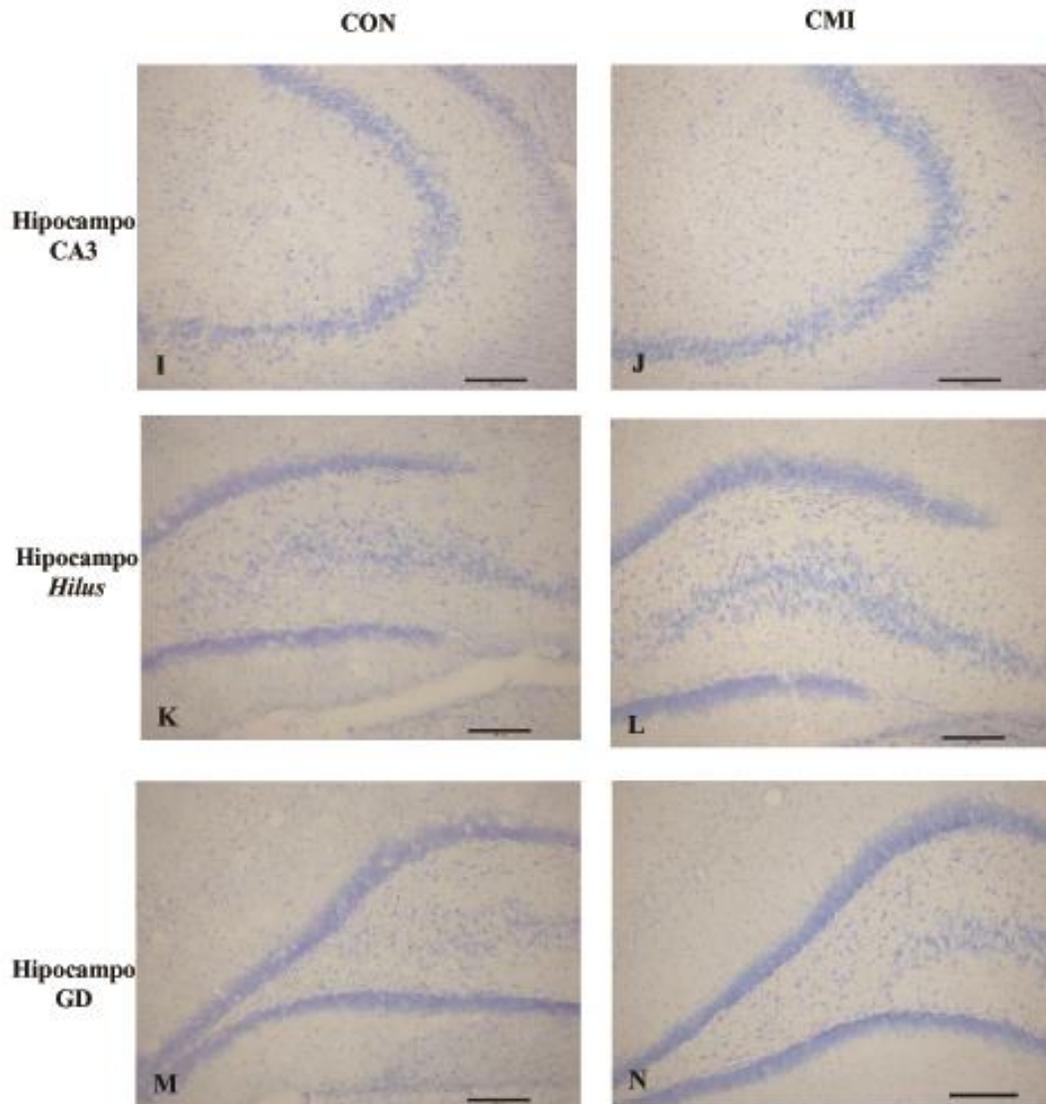


Figura 14. Fotomicrografías de secciones coronales de tejido que muestran la densidad neuronal en las diferentes áreas evaluadas en ratas tratadas con clomipramina (CMI). El tratamiento neonatal con CMI (B, D, F, H, J, L y N) no produce cambios significativos en el número de neuronas totales de las regiones evaluadas con respecto al control (A, C, E, G, I, K y M). Secciones teñidas con técnica de Nissl. Media \pm EEM; t de student; * $p < 0.05$ diferente de grupo CON. Barra de calibración: 200 μ m. Amplificación: 10X. **Abreviaturas:** GD=giro dentado.

B. Evaluación por inmunohistoquímica de la expresión de RE α y RE β

Núcleo del rafé dorsal

El efecto del tratamiento con CMI sobre la expresión de los RE α y RE β en el núcleo del rafé de ratas adultas se observa en la Tabla 5 y la Figura 15. La administración neonatal de CMI indujo una disminución en la expresión del RE β medido a través de la D.O, así como una disminución en el número de células que expresan dicho receptor ($p < 0.05$).

Tabla 5. Análisis de la expresión de los receptores RE α y RE β en el núcleo del rafé dorsal de ratas tratadas con clomipramina (CMI). El tratamiento con CMI provocó la disminución en la expresión de RE β así como un decremento el número de neuronas que lo expresan. Media \pm EEM; t de student; * $p < 0.05$ diferente del grupo CON.

	REα		REβ	
	<i>D.O</i> <i>Unidades arbitrarias</i>	<i>Densidad celular</i> <i>(10 000 μm^2)</i>	<i>D.O.</i> <i>Unidades arbitrarias</i>	<i>Densidad celular</i> <i>(10 000 μm^2)</i>
CON	0.0595 \pm 0.0045	5.25 \pm 0.38	0.0363 \pm 0.008	13.70 \pm 0.31
CMI	0.0575 \pm 0.0083	4.09 \pm 0.74	0.0296 \pm 0.0088*	10.05 \pm 0.56*

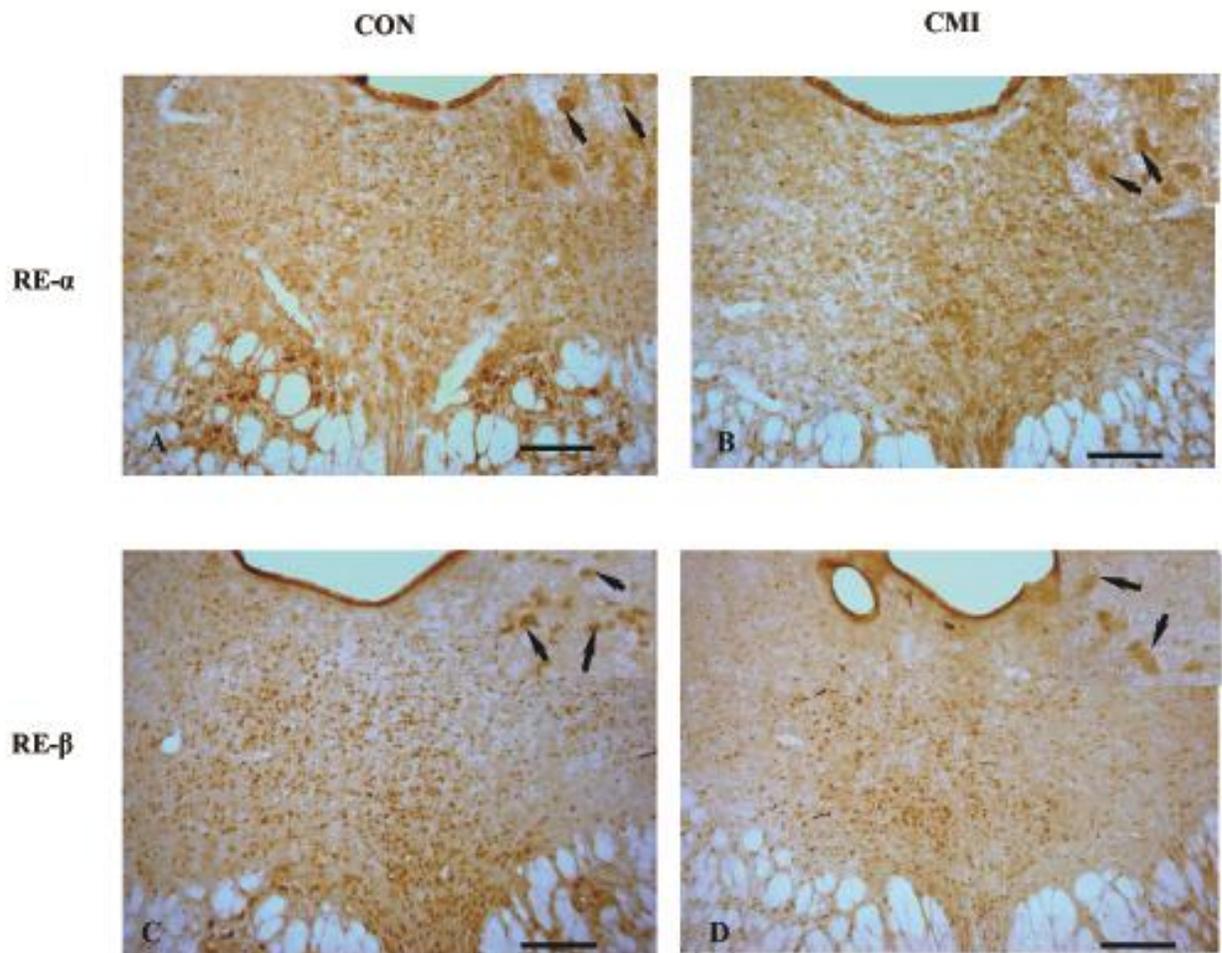


Figura 15. Inmunoreactividad a RE α y RE β en secciones coronales del núcleo del rafé dorsal de ratas tratadas neonatalmente con clomipramina (CMI). La administración neonatal de CMI produce en la edad adulta una disminución de la expresión del receptor RE β en núcleo del rafé (C y D), sin que se observen cambios significativos en la expresión del RE α (A y B). Media \pm EEM; t de student; * $p < 0.05$ diferente de grupo CON. Amplificación: 10X. Barra de calibración: 200 μ m. Los insertos muestran inmunoreactividad (marcada con flechas) a un aumento de 40X.

Área preóptica media (APOm) y núcleo preóptico medio (NPOm)

La expresión de RE α y RE β por inmunohistoquímica en el área preóptica media (APOm) y el núcleo preóptico medio (NPOm) se observa en la Tabla 6 y Fig. 16. En cuanto al APOm se observa que la administración de CMI no modifica de manera significativa la expresión de RE α y RE β (Fig. 16A). Sin embargo, en el NPOm el tratamiento neonatal con CMI provoca un incremento significativo en la expresión de

RE α y RE β , así como en el número de neuronas que expresan estos receptores ($p < 0.05$; Tabla 4 y figura 16B).

Tabla 6. Inmunorreactividad a RE α y RE β en el preóptica media (APOm) y el núcleo preóptico medio (NPOm) de ratas neonatalmente tratadas con clomipramina (CMI). El tratamiento con CMI no produce cambios significativos en la expresión de los RE α y RE β ni en el número de neuronas que expresan ambos receptores. Sin embargo, la administración de CMI produce incremento en la expresión de RE α y RE β en NPOm. Media \pm EEM; t de student; * $p < 0.05$ diferente de grupo CON.

		REα		REβ	
		<i>D.O</i> <i>Unidades</i> <i>arbitrarias</i>	<i>Densidad</i> <i>celular (10 000</i> <i>μm^2)</i>	<i>D.O</i> <i>Unidades</i> <i>arbitrarias</i>	<i>Densidad</i> <i>celular (10 000</i> <i>μm^2)</i>
APOm	CON	0.0376 \pm 0.0079	1.89 \pm 0.52	0.0949 \pm 0.014	5.00 \pm 0.3
	CMI	0.0437 \pm 0.0145	1.76 \pm 0.37	0.0936 \pm 0.0245	5.65 \pm 0.4
NPOm	CON	0.0198 \pm 0.0023	1.46 \pm 0.32	0.0348 \pm 0.0077	2.60 \pm 0.2
	CMI	0.0633 \pm 0.0011*	2.89 \pm 0.4*	0.0541 \pm 0.0045*	5.17 \pm 0.6*

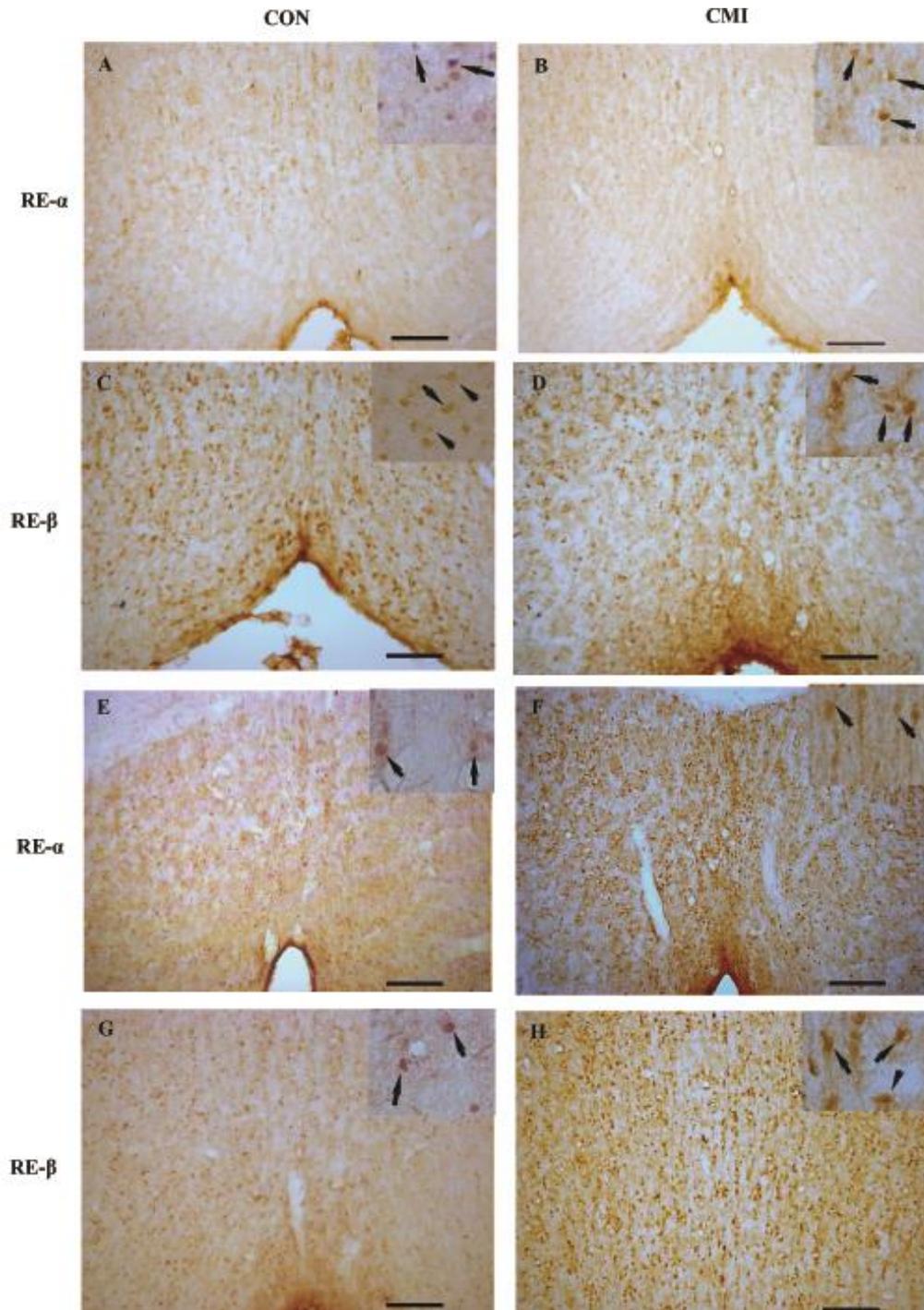


Figura 16. Inmunorreactividad a receptor a estrógenos α (RE α) y receptor a estrógenos β (RE β) en secciones coronales del preóptica media (APOm) y el núcleo preóptico medio (NPOm) de ratas tratadas neonatalmente con clomipramina (CMI). La administración de CMI no altera significativamente la expresión REs APOm (A, B, C y D). El tratamiento neonatal con CMI induce un incremento en la expresión de RE α (E y F) y RE β (G y H) en el NPOm. Media \pm EEM; t de student; * $p < 0.05$ diferente de grupo CON. Amplificación: 10X. Barra de calibración: 200 μ m. Los insertos muestran inmunorreactividad (marcada con flechas) a un aumento de 40X.

Hipocampo

La tabla 7 y las figuras 17 y 18 muestran la expresión de RE α y RE β en diferentes regiones del hipocampo (CA1, CA3, GD e Hilus del giro dentado) de ratas tratada con CMI. El tratamiento neonatal provoca una disminución de los RE β en la región CA3 ($p < 0.05$) únicamente, tanto la expresión de RE α y RE β en otras áreas no se vio alterado por el tratamiento con CMI.

Tabla 7. Inmunorreactividad a RE α y RE β en NPOM de ratas neonatalmente tratadas con clomipramina (CMI). La administración de CMI no produce cambios en la expresión de RE α en ninguna de las regiones evaluadas. El tratamiento neonatal provoca una disminución de los RE β en la región CA3 sin que se afecte significativamente la expresión de este receptor en otras regiones del hipocampo. Media \pm EEM; t de student; * $p < 0.05$ diferente de grupo CON.

	REα		REβ	
	CA1			
	<i>D.O</i> <i>Unidades</i> <i>arbitrarias</i>	<i>Densidad celular</i> <i>(10 000 μm^2)</i>	<i>D.O</i> <i>Unidades</i> <i>arbitrarias</i>	<i>Densidad celular</i> <i>(10 000 μm^2)</i>
CON	0.0903 \pm 0.0083	25.3 \pm 0.3	0.0463 \pm 0.0059	24.04 \pm 0.61
CMI	0.0854 \pm 0.0094	24.8 \pm 0.1	0.0474 \pm 0.0011	23.51 \pm 0.31
	CA3			
CON	0.0953 \pm 0.011	16.2 \pm 0.2	0.0654 0.004	15.02 \pm 0.9
CMI	0.0834 \pm 0.048	15.9 \pm 0.35	0.04 \pm 0.002*	10.28 \pm 0.44*
	Hilus			
CON	0.0853 \pm 0.067	9.5 \pm 0.5	0.0518 \pm 0.004	14.5 \pm 0.99
CMI	0.0855 \pm 0.0015	9.9 \pm 0.4	0.042 \pm 0.006	12.24 \pm 0.89
	GD			
CON	0.081 \pm 0.0076	33.8 \pm 0.1	0.0622 \pm 0.006	37.31 \pm 0.7
CMI	0.0908 0.0068	34.3 \pm 0.8	0.0584 \pm 0.006	35.39 \pm 0.68

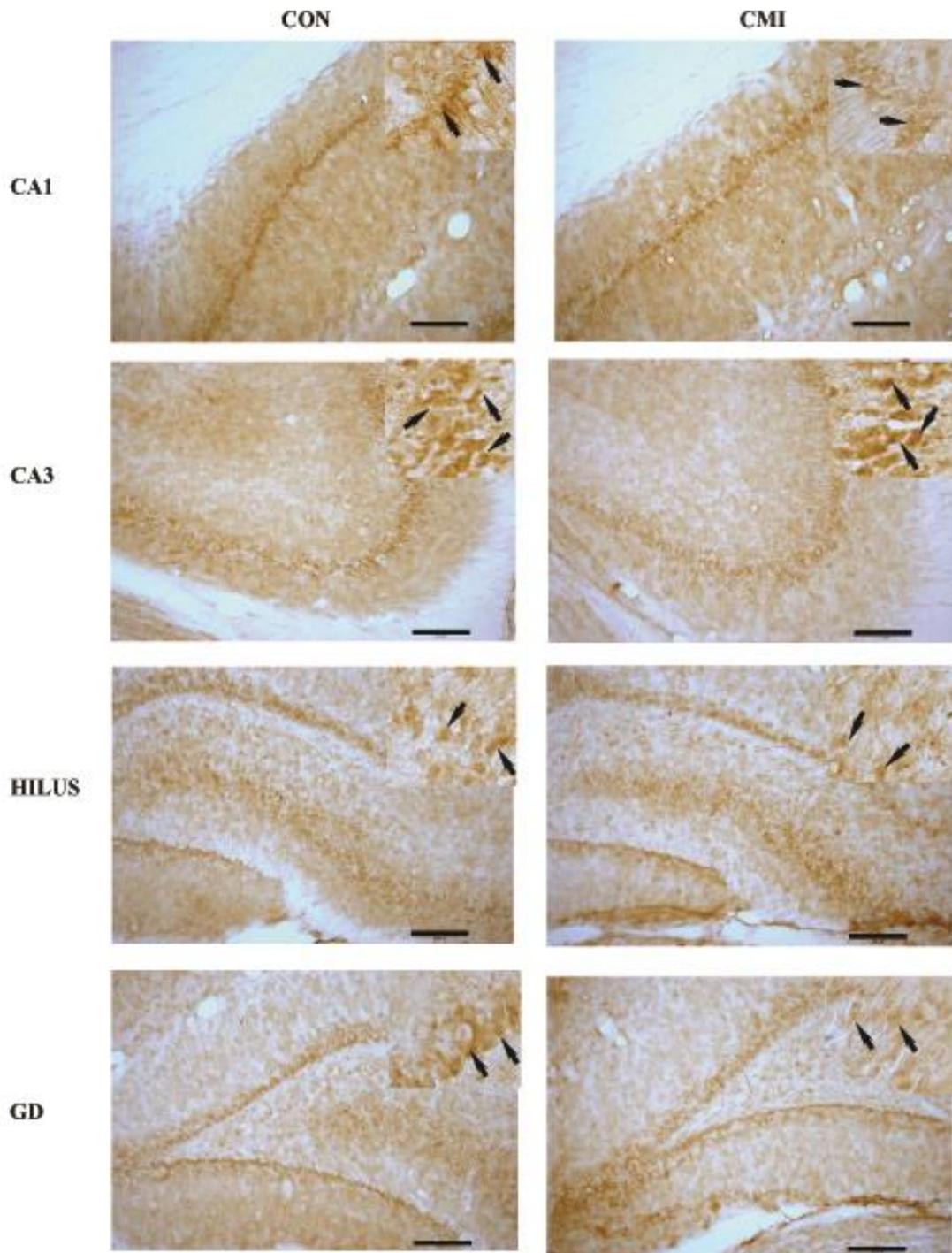


Figura 17. Fotomicrografías de secciones coronales de diferentes regiones del hipocampo de ratas tratadas neonatalmente con clomipramina (CMI), donde se observa la inmunorreactividad a receptor a estrógenos α (RE α). El tratamiento neonatal no provocó cambios significativos en la expresión del receptor en ninguna de las regiones hipocampales analizadas. Media \pm EEM; t de student; * $p < 0.05$ diferente de grupo CON. Barra de calibración: 200 μ m. Amplificación: 10X. Los insertos muestran inmunorreactividad (marcada con flechas) a un aumento de 40X.

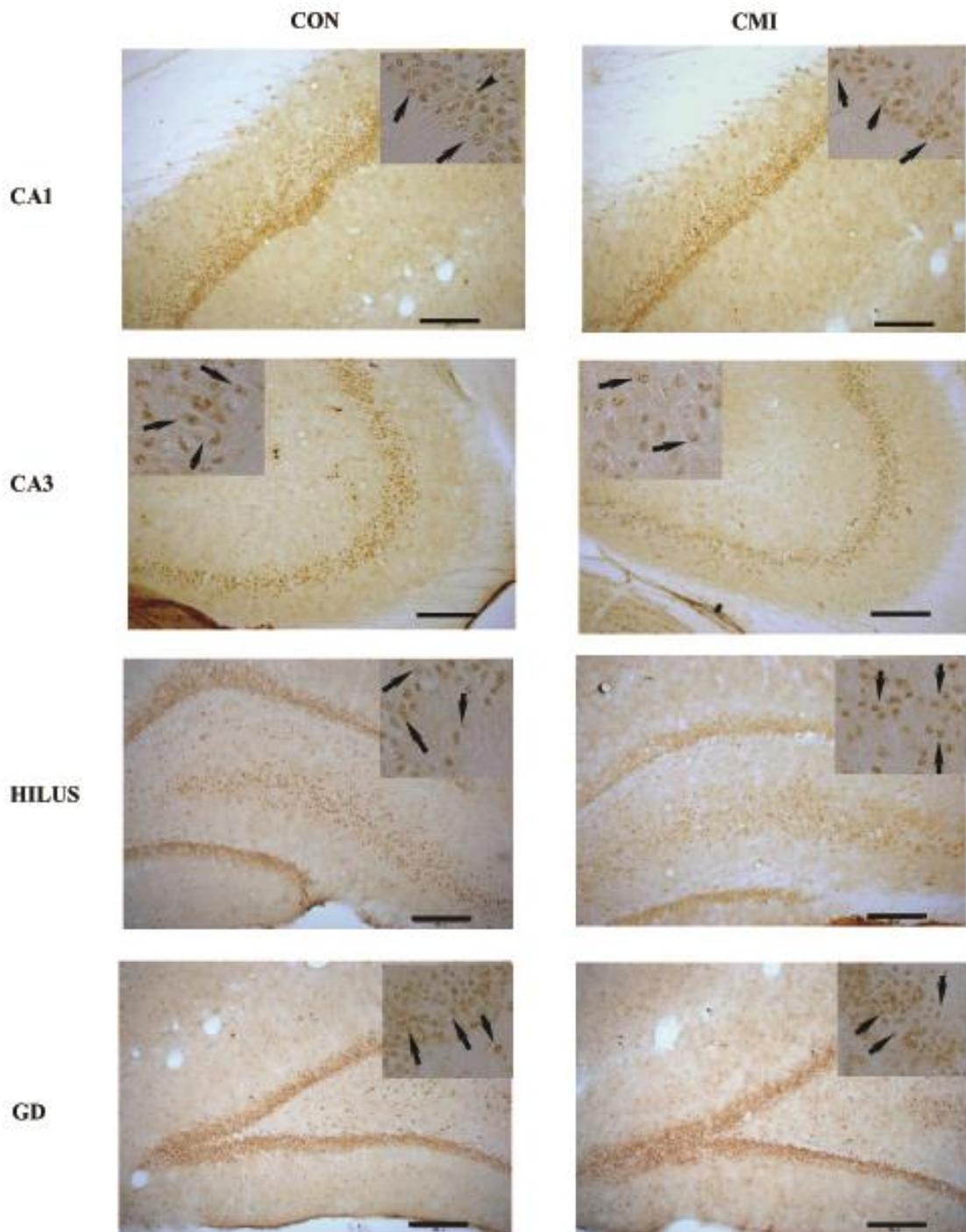


Figura 18. Inmunoreactividad a receptor a estrógenos β (RE β) en secciones coronales de diferentes regiones del hipocampo de ratas tratadas neonatalmente con clomipramina (CMI). El tratamiento neonatal con CMI provoca una disminución en los RE β en CA3 comparado con el grupo CON. Media \pm EEM; t de student; * $p < 0.05$ diferente de grupo CON. Amplificación: 10X. Barra de calibración: 200 μ m. Amplificación: 10X. Los insertos muestran inmunoreactividad (marcada con flechas) a un aumento de 40X.

8. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo muestran que el efecto antidepresivo de 8-OH-DPAT no se altera por el bloqueo de la síntesis de 5-HT por medio de la administración de PCPA. Por otro lado el tratamiento neonatal con CMI afecta el despliegue conductual en la PNF, incrementando la inmovilidad y disminuyendo la conducta de nado, alteraciones que se ven revertidas por la administración de E₂. Así también la administración de CMI provoca una disminución en la motivación sexual, la cual se ve revertida por la administración de E₂ + DHT. Por otro lado, el tratamiento neonatal con CMI no produce cambios en las concentraciones séricas de T y E₂. Así también, el tratamiento con CMI induce una disminución en la expresión de los RE β en núcleo del rafe dorsal y región CA3 del hipocampo que se acompaña de un aumento en la expresión de RE α y RE β en NPOM.

8.1. Modelo de depresión inducido neonatalmente por CMI

El modelo de depresión inducida neonatalmente por CMI muestra diferentes alteraciones conductuales que semejan signos de la depresión, entre las que se encuentran disminución en la búsqueda de conductas recompensantes como decremento en la ingesta de alimento (Neill, 1990; Vogel et al., 1990c) y de la conducta sexual masculina (Neill, 1990; Vogel et al., 1996; Bonilla-Jaime et al., 1998; Bonilla-Jaime et al., 2003b), así también, presentan un incremento de la conducta de inmovilidad en la PNF, la cual se acompaña de una disminución de las conductas activas principalmente la conducta de nado (Velázquez-Moctezuma y Díaz-Ruiz, 1992; Bonilla-Jaime et al., 1998; Vázquez-Palacios et al., 2005; Limón-Morales et al., 2014), como se muestra en nuestros resultados. En este sentido, las alteraciones en el despliegue de las conductas en la PNF nos ofrecen indicios de qué sistemas de neurotransmisión podrían ser afectados por el tratamiento neonatal con CMI. Un incremento en la inmovilidad y disminución de la conducta de nado (patrón de respuesta observado en ratas CMI) se ha relacionado con una disminución en la actividad del sistema serotoninérgico (Vázquez-Palacios et al., 2005). Diferentes

evidencias muestran que en la PNF, diferentes clases de antidepresivos administrados a ratas adultas inducen una disminución de la inmovilidad y la evaluación de esta conducta se acompaña de la evaluación de las conductas activas: nado y escalamiento. Dichas conductas activas se modifican en respuesta a diferentes tipos de fármacos antidepresivos (Detke et al., 1995). Estas modificaciones conductuales observadas en la PNF, en respuesta a diferentes clases de antidepresivos, permiten suponer el posible mecanismo por el cual podrían estar ejerciendo su efecto. Así, fármacos que incrementan la actividad del sistema serotoninérgico, como los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (fluoxetina y sertralina), disminuyen la conducta de inmovilidad incrementando selectivamente la conducta de nado; mientras que fármacos inhibidores de la recaptura de NA incrementan la conducta de escalamiento. Por lo cual se puede deducir que el tratamiento neonatal con CMI provoca las diferentes alteraciones conductuales a través de alterar al sistema serotoninérgico.

En este sentido diferentes estudios muestran que las ratas tratadas neonatalmente con CMI presentan una disminución en los niveles de 5-HT en áreas como: corteza, hipotálamo, septum e hipocampo (Feenstra et al., 1996; Vijayakumar y Meti, 1999) y un incremento en el metabolismo de la 5-HT en el tallo cerebral (Hilakivi et al., 1995). Al mismo tiempo se ha reportado una disminución en la expresión del transportador de la 5-HT en el núcleo del rafé dorsal (Hansen y Mikkelsen, 1998) y una disminución de la tasa de disparo neuronal en este núcleo (Yavari et al., 1993), recientes estudios en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento neonatal con CMI provoca una disminución en el ARNm del receptor 5-HT_{1A} en núcleo del rafé y un incremento en hipotálamo e hipocampo (Limón-Morales et al., 2014a). Dicha evidencia sustenta el hecho de que el tratamiento neonatal con CMI afecta principalmente al sistema serotoninérgico.

La 5-HT está implicada en la regulación y adecuado despliegue de conductas como ingesta de alimento, saciedad, conducta sexual, ciclos sueño-vigilia, estado de ánimo y agresión entre otras (Curzon, 1988). En ratas, las neuronas serotoninérgicas del tallo cerebral son las primeras neuronas en diferenciarse y juegan un papel clave

en la regulación de la neurogénesis (Azmitia, 2001). Los cuerpos celulares del rafé se proyectan con amplitud a lo largo del sistema nervioso central. La 5-HT además de actuar sobre las neuronas adyacentes también es capaz de pasar por difusión a través de los tejidos y viajar por la circulación participando como neuromodulador en el desarrollo. En el SNC la 5-HT puede regular la diferenciación de progenitores neurales, alterar el desarrollo cerebral, perfeccionar la formación de circuitos neuronales, promover la sobrevivencia neuronal, estimular a astrocitos a secretar factores tróficos como el S100 β , modular la dirección de axones y actuar como un neuromodulador de sinapsis y circuitos (Lauder, 1990; Trakhtenberg y Goldberg, 2012) y actuar como una señal en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Azmitia, 2001). Cuando se han formado las neuronas serotoninérgicas, estas se proyectan hacia regiones como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal. Esto se lleva a cabo entre el día embrionario (E) 14.5 y posnatal (P) 0. Desde E14 al E15 el transportador de 5-HT también se expresa transitoriamente en neuronas tálamo-corticales y en las áreas sensoriales. Esta expresión transitoria, que puede servir para dirigir procesos de desarrollo, desaparece dos semanas después del nacimiento en roedores (Yavarone et al., 1993).

En el presente trabajo, la administración de CMI, un inhibidor de la recaptura de 5-HT en el periodo crítico de desarrollo (del día P12 al P20), parece alterar la maduración del sistema serotoninérgico, por consiguiente afectara su función en el neurodesarrollo, dando como resultado las diferentes alteraciones fisiológicas y conductuales observadas en la edad adulta en el modelo de depresión (Vogel et al. 1990c), viéndose afectado el despliegue conductual en el patrón copulatorio (Feng y Vogel, 2001) y de la PNF (Velázquez-Moctezuma y Díaz-Ruiz, 1992; Vázquez-Palacios, et al. 2005) entre otras. Se ha observado que durante el desarrollo, los niveles de 5-HT y del ARNm de la TPH se incrementan hasta 35 veces en el núcleo de rafé dorsal entre los días P18 y P22. En el caso del transportador de 5-HT, como de diferentes receptores serotoninérgicos, se observan un incremento en sus niveles desde etapas perinatales hasta alcanzar los niveles de un individuo adulto aproximadamente durante la tercera semana de vida posnatal, periodo que se ha

relacionado fuertemente con la aparición de la sinaptogénesis (Igvy-May et al., 1994; Jacobs y Azmitia, 1992). Se ha propuesto que los receptores 5-HT_{1A} ubicados en la glía influyen sobre el neurodesarrollo por estimulación de la liberación del factor neurotrófico S-100 β , una proteína que modula la diferenciación de neuronas neocorticales y serotoninérgicas (Whitaker-Azmitia, 1991). Así, se ha observado que manipulaciones de este sistema de neurotransmisión en la etapa neonatal provoca deficiencias en el crecimiento neuronal, la sinaptogénesis, la maduración de otros sistemas de neurotransmisión y finalmente sobre la conducta de la rata adulta (Whitaker-Azmitia y Azmitia, 1986; Whitaker-Azmitia, 1991). En este contexto, la administración de pargilina (inhibidor no específico de la MAO) sobre un cultivo de neuronas serotoninérgicas a los días P14-P18 de vida posnatal, inhibe el crecimiento de dichas neuronas (Whitaker-Azmitia y Azmitia, 1986), además la inhibición en la producción de 5-HT en roedores durante la etapa neonatal por medio de la administración de PCPA induce una disminución permanente en la densidad de espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo (Yan et al., 1997), generando una disminución en la sinaptogénesis lo que provoca un severo déficit cognitivo en la edad adulta (Mazer et al., 1997). Además, se ha observado que la presencia de 5-HT mejora la sobrevivencia de las neuronas y acelera la diferenciación y mielinización de axones (Jacobs y Azmitia, 1992). La 5-HT también puede ejercer un efecto inhibitorio, limitando el crecimiento de conos sinápticos y la ramificación de axones (Jacobs y Azmitia, 1992). La 5-HT también inhibe su propio crecimiento, pero en este caso a través de una ruta más directa, por la presencia de receptores serotoninérgicos en las terminales (Para revisión ver: Whitaker-Azmitia, 2001). El receptor más probable para desempeñar este papel es la 5-HT_{1B}, sin embargo el mecanismo por el que realiza esta función aún no se conocen.

Dado que como ya se mencionó la 5-HT promueve el crecimiento de las neuritas, la sinaptogénesis, la diferenciación/organización, la neurogénesis dependiente de la región o de la presencia de diferentes receptores serotoninérgicos. Por lo que es concebible que los cambios en los niveles de 5-HT debido a la inhibición

de 5HTT por la administración de ISRS como lo es CMI puedan tener un impacto importante en el neurodesarrollo (Para revisión ver: Kepser y Homberg, 2014).

8.2. Análisis de la función de los receptores 5-HT_{1A} pre y post-sinápticos en la PNF.

Los presentes resultados muestran que de 8-OH-DPAT disminuye la conducta de inmovilidad e incrementa la conducta de nado, efecto que no es bloqueado por el pre-tratamiento con PCPA indicando que el efecto antidepresivo de 8-OH-DPAT es mediado por el receptor 5-HT_{1A} post-sináptico, ya que no se altera por el bloqueo de la síntesis de 5-HT por medio de PCPA. Dichos resultados contrastan con estudios realizados por Cervo y Samanin (1990), quienes mostraron que la administración de PCPA inhibe el efecto antidepresivo de 8-OH-DPAT en la PNF, concluyendo que es el receptor presináptico el responsable de dicho efecto. Las diferencias en los resultados obtenidos podrían deberse a los diferentes esquemas de administración utilizados dado que dicho grupo de trabajo utiliza un esquema de administración crónico para 8-OH-DPAT y uno subagudo para PCPA. A este respecto trabajos de Kinney y cols. (1998) muestran que el efecto antidepresivo de 8-OH-DPAT depende del esquema de administración utilizado y que bajo un esquema crónico el 8-OH-DPAT induce un incremento en la duración de la respuesta antidepresiva de un modo similar a los fármacos antidepresivos (Kinney et al., 1998).

Por otro lado, actualmente es ampliamente aceptado que la administración de diferentes agonistas del receptor 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT, buspirona, indorenato e ipsapirona) a animales intactos induce un marcado efecto antidepresivo en la PNF (Lucki y Wieland, 1990), provocando un efecto muy similar al producido por ISRS al reducir la inmovilidad e incrementar el nado. Aunado a ello reportes previos indican que el agonista selectivo del receptor 5-HT_{1A}, 8-OHDPAT, posee un efecto antidepresivo en algunos modelos animales de depresión como son la prueba de desamparo aprendido y la PNF (Martin et al 1990; Martínez-Mota et al., 2002; Lucki y Wieland, 1990). Sin embargo, fármacos como el 8-OH-DPAT reducen la inmovilidad en un plazo mucho menor y con una magnitud mucho mayor que los ISRS, por lo que

ha sido propuesto como un antidepresivo de acción rápida (De Vry et al., 2004). Previos estudios realizados por nuestro laboratorio revelan que las alteraciones conductuales en la PNF provocadas por el tratamiento neonatal con CMI se logran revertir con la administración de un agonista del receptor 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) el cual disminuye significativamente la inmovilidad e incrementa la conducta de nado (Limón-Morales et al., 2014a), posiblemente a través de desensibilizar el receptor 5-HT_{1A}, lo cual como se mencionó anteriormente desinhibe el disparo neuronal, incrementando la transmisión serotoninérgica (Stahl, 1998).

Existe una controversia acerca del papel de los receptores pre y postsinápticos en el efecto antidepresivo de agonistas del receptor 5-HT_{1A}. Algunos reportes indican que los receptores 5-HT_{1A} presinápticos se desensibilizan ante la activación sostenida por agonistas, sin embargo los receptores postsinápticos permanecen normosensibles (Blier y Montigny, 1990), indicando que podrían ser los receptores presinápticos los responsables del efecto antidepresivo del 8-OH-DPAT cuya acción sobre dichos receptores los desensibiliza, dando como resultado un incremento de la liberación de 5-HT por parte del núcleo del rapé hacia las terminales sinápticas (corteza, hipocampo, hipotálamo, etc.). Sin embargo, existen otros estudios que se contraponen. Datos preclínicos indican que el efecto antidepresivo de los agonistas de los receptores 5-HT_{1A} es mediado por los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos, mientras que el efecto ansiolítico es mediado por los receptores 5-HT_{1A} presinápticos (para revisión ver: De Vry, 1995). Lo cual se deduce de múltiples estudios que utilizan diferentes entre otras metodologías la micro-inyección intracerebral. Estos trabajos apoyan la idea de que se requiere de la integridad de la neurotransmisión serotoninérgica en la presinapsis (núcleo del rapé) para lograr activar a los receptores postsinápticos probables responsables del efecto antidepresivo (Schreiber y De Vry 1993; De Vry et al, 2004).

8.3. Efecto antidepresivo de E₂ en la PNF

Por otro lado, diferentes grupos de investigación han reportado que compuestos estrogénicos como el E₂ y EE₂ poseen efecto antidepresivo en la PNF reduciendo

significativamente la conducta de inmovilidad e incrementando el nado y el escalamiento respectivamente (Estrada-Camarena et al., 2003; Rocha et al., 2005), además al ser co-administrados con diferentes fármacos antidepresivos son capaces de acortar su latencia en hembras ovariectomizadas (Estrada-Camarena et al., 2004) y machos castrados (Martínez-Mota et al., 2008). En este mismo sentido, trabajos previos en nuestro laboratorio indican que el tratamiento crónico (14 días) con 10 µg de benzoato de E₂ reduce la conducta de inmovilidad e incrementa el nado en machos orquidectomizados (Bonilla-Jaime et al., 2010), mientras que la dosis de 5 µg no tiene efecto. Los presentes datos muestran que la administración de E₂ en ratas tratadas con CMI en una dosis fisiológica (5 µg) promueve una disminución de la conducta de inmovilidad y un incremento de la conducta de nado, obteniendo valores similares a los presentados por el grupo CON sham, es decir valores basales. Cuando fue administrada una dosis farmacológica (10 µg) se observó que E₂ presenta efecto antidepresivo descrito como una disminución significativa de la inmovilidad e incremento de la conducta de nado en ambos grupos (CON y CMI) esto comparado con el grupo CON sham. Dichos resultados concuerdan parcialmente con los reportados previamente por Martínez-Mota y cols. (2008) quienes analizaron el efecto de la administración de diferentes dosis de E₂ en machos castrados y mostraron que la administración de 5 µg no provoca cambios en las conductas analizadas en esta prueba, sin embargo, en este estudio no utilizó un grupo control de cirugía (sham), ni se comparan los datos de los machos castrados y las diferentes dosis de E₂ con animales intactos, por lo que la interpretación los resultados es incompleta. En dicho estudio las dosis de 10 y 20 µg muestran efecto antidepresivo en machos castrados apoyando los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo. Estudios realizados por Estrada-Camarena (2003) con hembras ovariectomizadas muestran que E₂ presenta efecto antidepresivo a dosis más bajas que en machos (5 µg), lo cual puede deberse a que los machos poseen una menor sensibilidad a compuestos estrogénicos ya que en condiciones fisiológicas se encuentran expuestos a bajas concentraciones de esta hormona (Martínez-Mota, et al., 2008). Martínez-Mota y cols. (2008) muestran que E₂ presenta efecto antidepresivo en un esquema de administración subagudo (3

días), nuestros resultados muestran que dicha hormona presenta este efecto en un esquema de administración crónico (14 días) que podría enmascarar alteraciones en la sensibilidad a la hormona al ser un efecto sumatorio de los varios días de administración. Tomando estas evidencias en conjunto nuestros resultados indican que el tratamiento neonatal con CMI parece no provocar cambios en la sensibilidad a hormonas estrogénicas en la PNF, sin embargo, se requiere realizar análisis un del efecto de E₂ en la PNF con la finalidad de observar si la respuesta antidepresiva es similar en diferentes puntos temporales. No obstante, dicha sensibilidad puede variar con la edad o en condiciones que alteran las concentraciones de hormonas. Recamier-Carballo y cols. (2012) mencionan que E₂ tiene efecto antidepresivo en la PNF en ratas hembra jóvenes en dosis que van desde los 5 hasta 20 µg, sin embargo, en ratas de 18 meses de edad el efecto antidepresivo de E₂ se da a partir de la dosis de 10 µg. En nuestro caso se usaron ratas de 4 meses las cuales muestran una sensibilidad similar a la presentada por machos en estudios similares con machos adultos jóvenes (3 meses). Aun se requiere investigación al respecto, para analizar cambios en la sensibilidad a hormonas en ratas macho a diferentes edades.

Existen reportes que indican que ratas macho de edad avanzada poseen una mayor sensibilidad al estrés para generar anhedonia (uno de los signos principales en el diagnóstico de depresión) (Herrera-Pérez et al., 2008) y al mismo tiempo una menor sensibilidad a fármacos antidepresivos como citalopram (ISRS) (Herrera-Pérez et al., 2010) lo que podría estar relacionado con la disminución en los niveles de hormonas gonadales que se da con la edad, la cual podría también alterar la integridad de diferentes sistemas de neurotransmisión.

Se sabe que E₂ es capaz de interactuar con diferentes componentes del sistema serotoninérgico. Durante el envejecimiento normal de los mamíferos se presentan importantes cambios en algunos sistemas de neurotransmisión, las cuales se relacionan con una reducción en el número de neuronas y en las concentraciones, síntesis y recambio de neurotransmisores. Sin embargo la literatura provee resultados contradictorios (para revisión ver: Koprowska et al., 2004). La mayoría de las evidencias indican una disminución en las concentraciones de 5-HT relacionada con

el incremento de la edad en áreas límbicas, estriado, tallo y corteza frontal (Brunello et al., 1988; Machado et al., 1986; Miguez et al., 1999; Venero et al., 1991). Mientras que otros autores mencionan un incremento en áreas como hipotálamo, hipocampo y corteza frontal (Moretti et al., 1987; Timiras et al., 1982). En ratas, algunos reportes indican un decremento de 5-HT dependiente de la edad y un incremento de su degradación en hipotálamo, hipocampo, estriado y corteza (Gozlan et al., 1990). De un modo similar la orquidectomía provoca cambios en diferentes sistemas de neurotransmisión. Nuestros resultados muestran que la castración incrementa la inmovilidad y disminuye la conducta de nado en el grupo CON, indicando una posible disminución de la actividad del sistema serotoninérgico. Al respecto se ha observado que bajo condiciones en las que hay una disminución en los niveles de hormonas gonadales como la orquidectomía, se dan alteraciones en diferentes sistemas de neurotransmisión que controlan el estado de ánimo, por ejemplo; se ha reportado que la orquidectomía disminuye los niveles de 5-HT e incrementa los niveles de 5-HIAA, su principal metabolito. Los niveles de ambos se restituyen en el estriado al administrar cantidades fisiológicas de propionato de T, y en hipotálamo e hipocampo se ven restablecidos únicamente al administrar E₂ (Bitar, 1991). También se ha reportado que la castración a largo plazo reduce los niveles de dopamina en el APOm (Putman *et al.*, 2001). Además, de disminuir el contenido de ARNm del receptor 5-HT_{2A} en el núcleo del rafé dorsal y los sitios de unión para este receptor en el núcleo accumbens, corteza frontal, cingulata y primaria olfatoria, restituyéndose el contenido de estos receptores con la administración de propionato de T y E₂, pero no de otros andrógenos como DHT que no pueden ser aromatizados (Summer y Fink, 1998; Kendall et al., 1982). A este respecto, se ha propuesto que el efecto antidepresivo de E₂ se da a través de mejorar la neurotransmisión serotoninérgica. Investigaciones de diferentes grupos de trabajo han mostrado que el E₂ mantiene una fuerte interacción con el sistema serotoninérgico a diferentes niveles. Así también, el tratamiento crónico con E₂ incrementa la expresión de la enzima TPH2 (Sánchez et al., 2005; Hiroi et al., 2006). Además, la administración de E₂ y andrógenos aromatizables como la testosterona incrementan el disparo neuronal en neuronas serotoninérgicas (Robichaud y Debonnel, 2005) y el tratamiento

con E₂ disminuye la expresión del receptor 5-HT_{1A} en rafe dorsal de monos ovariectomizados (Lu y Bethea, 2002). Los estrógenos también pueden regular la degradación de 5-HT ya que; se sabe que la actividad de la enzima MAO, se incrementa en situaciones en las que disminuyen los niveles de hormonas estrogénicas como en la depresión posparto (Sacher et al., 2010) y en ratas hembra de edad avanzada (Kumar et al., 2011). Así también el tratamiento con E₂ es capaz de disminuir la expresión MAO en áreas como el rafe (Gundlah et al., 2002) e hipotálamo (Gundlah et al., 2002; Ortega-Corona et al., 1994) en de ratas y macacos hembra ovariectomizadas, además de revertir el incremento en la actividad de la enzima MAO provocado por la edad (Kumar et al., 2011). Existen evidencias de que neurotransmisores y hormonas gonadales tienen una importante interacción en diferentes procesos, particularmente E₂ y 5-HT intervienen en la regulación del estado de ánimo. Lo que apoya el hecho de que en ratas tratadas con CMI podría existir una deficiencia en la producción de E₂ a nivel central, dado que la administración de E₂ es capaz de revertir las alteraciones causadas por el tratamiento neonatal en las conductas evaluadas en la PNF.

Se ha propuesto que la regulación de E₂ sobre el sistema serotoninérgico está dada por el RE β , ya que los efectos de E₂ sobre el sistema serotoninérgico se encuentran ausentes en ratones KO para el receptor RE β (Gundlah et al., 2005), además la administración de un agonista para RE β ; DPN incrementa la expresión de TPH2 (Donner y Handa, 2009). Así, recientemente se ha reportado que algunos agonistas del RE β como el DPN (Walf et al., 2004) y los moduladores selectivos de RE (SERM) como el raloxifen poseen efecto antidepresivo en la PNF (Walf y Frye, 2010). En este contexto la ausencia del RE β en hembras bloquea el efecto antidepresivo de E₂ (Rocha et al., 2005). En contraste, el 17 α -estradiol (Kuiper et al., 1997), otros compuestos estrogénicos sintéticos como el dietilestilbestrol (DES) (Estrada-Camarena et al., 2003) y agonistas para el RE α como el 4,4',411-(4-Propil [1H]-pirazol-1, 3, 5-tril) trifenol (Walf et al., 2004) no muestran efectos sobre la reducción de la inmovilidad o en las conductas activas evaluadas en la PNF. Lo cual deja en claro que existe una importante participación del RE β en el efecto

antidepresivo de diversos compuestos de naturaleza estrogénica, evidenciando que E₂ interactúa con el REβ para mejorar la neurotransmisión del sistema serotoninérgico y a través de este producir su efecto antidepresivo. En ratas CMI una disminución en la expresión del REβ en núcleo del rafe dorsal, podría ser uno de los puntos en los que la interacción entre el E₂ y del sistema serotoninérgico se encuentre alterada.

Por otra parte, y a pesar del incremento en la investigación sobre el papel de hormonas estrogénicas en el estado de ánimo existen pocos estudios que analicen el efecto antidepresivo de E₂ en modelos animales de depresión. Recientemente se observó en un modelo de estrés crónico moderado que la administración de benzoato y valerato de E₂ son capaces de reducir el tiempo de inmovilidad en la PNF (Romano-Torres y Fernández-Guasti, 2010; Recamier-Carballo et al., 2012). Aunado a ello Cheng y cols (2013) muestran que la administración de 10 µg de E₂ en un modelo de depresión post isquemia en ratas hembra tiene efecto antidepresivo en la PNF y disminuye la anhedonia al incrementar el consumo de sacarosa. Sin embargo no se había analizado el efecto antidepresivo de E₂ en modelos animales de depresión realizadas en machos a pesar de que existen evidencias de que esta hormona tiene un papel importante en la regulación del sistema serotoninérgico, en machos y hembras (Kendall *et al.*, 1982; Summer y Fink, 1998). Por lo que el presente trabajo destaca la importancia de la investigación acerca de posibles alteraciones endocrinas (en particular en torno a hormonas sexuales) relacionadas al trastorno depresivo en el sexo masculino.

8.4. Análisis de la motivación sexual en ratas tratadas neonatalmente con CMI

Por otro lado, los estrógenos además de estar implicados en la regulación del estado de ánimo también se han relacionado con la regulación de la CSM y en ambos casos esta regulación se da de manera conjunta con otros componentes entre los que se encuentran diferentes sistemas de neurotransmisión (Morali, 1998; Arteaga-Silva et al., 2002).

Nuestros datos muestran que el tratamiento neonatal con CMI disminuye el porcentaje de individuos que despliegan intromisiones y eyaculaciones, sin alterar significativamente el porcentaje de individuos que montan, corroborando lo reportado por la literatura (Neill et al., 1990; Vogel et al., 1996; Bonilla-Jaime et al., 1998; Bonilla-Jaime et al., 2003b) y trabajos previos de nuestro laboratorio (Limón- Morales et al., 2014b). En este sentido, dichas modificaciones conductuales pueden ser resultado de cambios a largo plazo en los sistemas de neurotransmisión (principalmente 5-HT) y en las interacciones entre estos provocados por alteraciones en la maduración cerebral (Simpkins et al., 1977) debidas a la administración neonatal de CMI. Se ha propuesto que el déficit copulatorio provocado por la administración neonatal de citalopram (ISRS) es debido a la estimulación del receptor 5-HT_{1B} más que a la del receptor 5-HT_{1A}, ya que al administrar neonatalmente agonistas selectivos tanto del receptor 5-HT_{1A} como del 5-HT_{1A} únicamente el agonista del receptor 5-HT_{1B} (CGB12066B) fue capaz de producir alteraciones sobre la CSM de manera similar a otros ISRS (Maciag et al., 2006), indicando el posible mecanismo de acción de la CMI neonatal para producir las alteraciones sobre la CSM.

Dentro de las alteraciones en la CSM reportadas por trabajos previos en nuestro laboratorio se encuentran un incremento en las latencias de monta e intromisión. Anteriormente se consideraba que la duración de la conducta precopulatoria medida a través de los parámetros copulatorios de latencia de monta y de intromisión (González-Pimentel and Hernández-González, 2002) podía ser un indicativo de la motivación sexual de los individuos, mostrando que una disminución en la latencia de intromisión podía indicar una mayor motivación sexual, y por el contrario un aumento de las latencias de monta e intromisión indica que existe poca motivación sexual, como podría especularse en el caso de las ratas tratadas con CMI. Sin embargo, esta es una medida indirecta que podría no reflejar con certeza la magnitud de la motivación sexual de los individuos. En el presente trabajo analizaron los efectos de la administración neonatal de CMI sobre la motivación sexual por medio de la prueba de MSI, una prueba que es capaz de medir la motivación sexual en sí, separándola de otros elementos como la preferencia por un lugar o la competencia con estímulos de tipo aversivo como

en otras pruebas para medir motivación, exponiendo a la rata estímulos sociales y sexuales para poder discriminar el acercamiento a una rata hembra del interés en una interacción únicamente social (Agmo, 2010). Estos resultados muestran que el tratamiento con CMI provoca disminución de la motivación sexual, mismo que se refleja en los parámetros copulatorios de la CSM. Dicha reducción se manifiesta en que las ratas CMI exploran ambas zonas asociadas a los incentivos, tanto la social como la sexual de manera indiscriminada, sugiriendo una reducción en la motivación sexual, validando una disminución del aspecto motivacional de la CSM en estas ratas, de manera similar a lo que se ha observado en los humanos como, disminución de la libido. Existen pocos reportes del efecto de antidepresivos en la etapa neonatal sobre la motivación sexual. Sin embargo, se sabe que el tratamiento crónico con fluoxetina durante la gestación y en la lactancia (Gouvêa et al, 2008) o en ratas adultas (Vega-Matuszczyk et al., 1998) induce un efecto similar al de CMI en la prueba de MSI; en la que disminuye el tiempo que el macho pasa en la cercanía del incentivo sexual. En el caso de los humanos, el tratamiento crónico con antidepresivos ISRS como la fluoxetina reduce la libido como un efecto adverso clásico de dichos fármacos (Gregorian et al., 2002; Clayton et al., 2006). Estos resultados sugieren que el tratamiento crónico con CMI o fluoxetina durante el neurodesarrollo induce modificaciones de larga duración en la motivación sexual, dichas alteraciones pueden ser resultado de perturbaciones a largo plazo en los sistemas de neurotransmisión y en las interacciones entre estos o con otros elementos como hormonas, induciendo modificaciones en la maduración cerebral provocadas por la manipulación del sistema serotoninérgico en la etapa neonatal. Diversos estudios muestran que el tratamiento neonatal con CMI induce alteraciones en los niveles de 5-HT y NA en estructuras como el hipotálamo (Hilakivi et al. 1995), una estructura de suma importancia en el control de múltiples conductas incluyendo la CSM.

Estas alteraciones en sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos podrían estar participando en las alteraciones de la CSM provocada por la administración de CMI, tanto en su aspecto motivacional como ejecutorio. Por ejemplo, se sabe que el sistema serotoninérgico tiene un papel inhibitorio sobre el despliegue de la CSM

(Ahlenius y Larsson, 1997; Phillips-Farfán y Fernández-Guasti, 2009), ya que un incremento en los niveles cerebrales de 5-HT disminuye el número de montas e intromisiones e incrementa la latencia de eyaculación (McIntosh y Barfield, 1984; Hull et al., 2006; Hull y Domínguez, 2007), además la administración de 8-OH-DPAT (agonista del receptor 5-HT_{1A}) disminuye el número de intromisiones y facilita la eyaculación (probablemente debido a la desensibilización del receptor) (Fernández-Guasti et al., 1992; Phillips-Farfán y Fernández-Guasti, 2009). En ratas tratadas neonatalmente con CMI, se sabe que la administración sistémica de 8-OH-DPAT ejerce un efecto estimulador sobre la conducta copulatoria, revirtiendo las alteraciones sobre la conducta sexual en este modelo, al disminuir tanto las latencias de intromisión y eyaculación, el número de montas e intromisiones como el incremento en la frecuencia de eyaculación (Bonilla-Jaime et al., 1998), sugiriendo que este receptor es funcional en las áreas implicadas en el control de la CSM. El receptor 5-HT₂ también parece estar mediando las alteraciones en el aspecto motivacional de la conducta sexual, ya que se ha observado que el tratamiento neonatal con agonistas del receptor 5-HT₂ disminuye la motivación sexual (González et al., 1996). Un efecto similar se observa cuando se administra en ratones adultos antagonistas del receptor 5-HT_{2A} (ketanserina o ciproheptadina), los cuales disminuyen el tiempo que pasan en la zona del incentivo sexual en la prueba de MSI (Popova y Amstislavskaya, 2002). Esta reducción en la motivación sexual en ratas tratadas neonatalmente con CMI podría deberse a una posible reducción de los receptores serotoninérgico 5-HT₂ durante el neurodesarrollo, efecto que se observa en el hipotálamo de ratas expuestas prenatalmente a fluoxetina (Cabrera y Battaglia, 1994) y en la corteza frontal en ratas prepuberes después de la exposición prenatal a CMI (De Ceballos et al., 1985).

Por el contrario el sistema noradrenérgico tiene un papel facilitador sobre la CSM, la inhibición de la síntesis de NA inhibe diferentes aspectos de la conducta sexual (Fernández-Guasti et al., 1986), mientras que la administración de antagonistas adrenérgicos α_1 y β , en el APOm, disminuye la conducta copulatoria. En contraste, el bloqueo de los receptores α_2 -adrenérgicos por yohimbina facilita varios aspectos de la CSM particularmente aspectos motivacionales, como por ejemplo disminución de la

latencia de eyaculación y de los intervalos posteyaculatorio e interintromitorio; además incrementa el número de montas e intromisiones (Hull, et al., 2006; Phillips-Farfán y Fernández-Guasti, 2009). En relación a las ratas tratadas neonatalmente con CMI se ha demostrado que la administración de yohimbina (antagonista del receptor α_2) en este modelo de depresión no ejerce su efecto facilitatorio sobre la CSM, al no modificar ninguno de los parámetros conductuales evaluados, por lo que se piensa que el tratamiento neonatal con CMI podría estar alterando al sistema noradrenérgico de forma permanente (Bonilla-Jaime et al., 1998), sugiriendo que el tratamiento neonatal con CMI además de provocar cambios en la maduración del sistema serotoninérgico posiblemente también lo haga en el sistema noradrenérgico afectando de este modo diferentes componentes que regulan la CSM.

Se sabe que la motivación sexual parece ser influida por la experiencia sexual previa ya que machos inexpertos no muestran preferencia por los olores de una hembra receptiva (Lydell y Doty, 1972). La conducta de monta por sí misma es suficiente para que los machos muestren preferencia por una hembra receptiva, mostrando que la ejecución de los actos copulatorios es necesaria para que la hembra adquiera propiedades incentivas mostrando que la ejecución de reflejos sexuales promueven el aprendizaje actuando como un reforzador (Stern, 1970). Por el contrario, un macho expuesto con una hembra receptiva sin la oportunidad de copular, no muestra un incremento en la preferencia por la hembra. Nuestros resultados muestran que en ratas CON (tratadas neonatalmente con solución salina), se registra un incremento en la motivación sexual incentiva en machos sexualmente expertos con respecto a machos inexpertos como un reflejo de la previa interacción sexual; mientras que las ratas tratadas con CMI presentan una disminución en el tiempo que pasan con el incentivo sexual independientemente de la experiencia, como un reflejo de la reducción en la interacción sexual durante la cópula. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos realizados por Agmo (2003) muestran que ratas macho que han copulado previamente a la prueba de motivación sexual muestran un incremento de la misma, sin embargo, este aumento parece no mantenerse a largo plazo (Agmo, 2003).

Existen evidencias de que las claves innatas del inicio de la interacción sexual se encuentran en el sistema dopaminérgico, en este sentido estudios muestran que los receptores dopaminérgicos D1 en el APOm se activan en la cercanía de una hembra receptiva únicamente en machos que han tenido experiencia sexual de manera crónica o aguda, y que estos son los responsables de facilitar las copulas subsecuentes (McHenry et al., 2012). Así también, se ha observado que un incremento en la neurotransmisión dopaminérgica facilita la iniciación de la conducta sexual en machos sin experiencia, pero tiene poco efecto en machos experimentados (Agmo y Picker, 1990). En el caso de las ratas tratadas con CMI no se ha analizado si la manipulación del sistema serotoninérgico en la etapa neonatal podría estar impactando en la integridad de la neurotransmisión dopaminérgica u otros neurotransmisores y de este modo alterar por ejemplo el inicio de la interacción sexual así como la motivación. El sistema serotoninérgico también media las alteraciones en la prueba de MSI, ya que la administración de antagonistas del receptor 5-HT_{2A} (ketanserina o ciproheptadina) disminuye el tiempo que pasan en la zona del incentivo sexual en la prueba de MSI (Popova y Amstislavskaya, 2002), posiblemente en áreas implicadas tanto en la ejecución como en la motivación como el APOm, el núcleo accumbens o la corteza prefrontal, que reciben inervación tanto dopaminérgica (Watanabe y Nakai, 1987; Hernández-González y Guevara-Pérez, 2010) como serotoninérgica (Para revisión ver: Jacobs y Azmitia, 2001).

8.5. Efecto la administración de E₂, E₂+DHT, DHT y T en la motivación sexual en ratas CMI y efecto del tratamiento con CMI sobre las concentraciones séricas de T y E₂.

Dentro de los factores endocrinos que regulan la copula la T es el principal andrógeno con un papel primordial sobre el mantenimiento de la CSM, esta hormona se metaboliza principalmente a E₂ y DHT. El E₂ ha sido propuesto como la hormona clave en la activación de la CSM a nivel central, capaz de reducir la latencia de monta en animales castrados sexualmente expertos desde los 35 minutos posteriores a la administración (Roselli et al., 2003) y facilitar ciertos aspectos de la conducta sexual

en la rata macho (Gorzalka et al., 1975; Paup et al., 1975; Sodersten, 1973). Sin embargo son inefectivos en restablecer todos los parámetros de la cópula (McGinnis y Dreifuss, 1989). Además, algunas investigaciones muestran que la conducta sexual se ve disminuida, pero no totalmente eliminada en ratones KO para receptores a estrógenos (Rissman et al., 1997; Hull et al., 2006). Se ha postulado que el papel primario de los E₂ es estimular la actividad neural en los tejidos que controlan la monta y la intromisión por lo que se puede pensar que esta hormona estimula la motivación más que la ejecución (Baum y Vreeburg, 1973; Seredynski et al., 2013), mientras que la DHT, andrógeno no aromatizable que posee una mayor afinidad por los receptores a andrógenos que la T, ejerce un potente efecto sobre órganos sexuales periféricos, y es inefectiva para restituir la copula por si sola (Ver para revisión: Hull et al., 2006). En trabajos previos en nuestro laboratorio la administración de hormonas gonadales fue capaz de revertir las alteraciones de la CSM; donde la administración de E₂ disminuyo las latencias de monta e intromisión sin afectar otros parámetros, mientras que la administración de un tratamiento combinado con E₂+DHT normaliza las latencias de monta e intromisión, incrementa el porcentaje de individuos que eyaculan e incrementa el número de eyaculaciones en machos tratados con CMI, mientras que el tratamiento con T mejora los parámetros conductuales alterados por la administración de CMI sin embargo, no logra restablecerlos a niveles del CON SHAM. Por lo que se podría pensar que la administración de E₂ revierte las alteraciones causadas por el tratamiento neonatal con CMI en la motivación sexual de forma similar a lo que ocurrió en trabajos previos, donde la administración de E₂+DHT restaura la ejecución. Sin embargo, actualmente existen pocos estudios que analicen el papel de las diferentes hormonas gonadales en la fase motivacional de la CSM. En el presente trabajo se analizó el efecto de estas hormonas sobre la motivación sexual alterada en ratas tratadas con CMI, los resultados muestran que tanto el tratamiento con dosis altas de E₂ (10 µg) como la administración de ambas dosis de E₂ combinadas con DHT incrementan la motivación sexual de ratas CMI, en el caso de los machos CMI tratados con T se incrementa dicha motivación aunque no a niveles de los machos CON sham (Limón-Morales et al., 2014b). En este contexto Attila y cols. (2010) mostraron que

tanto E₂ como DHT por si solos no logran reestablecer la motivación sexual en machos castrados, únicamente la combinación de ambos y la administración de T la reestablecen en su totalidad. En este mismo estudio la administración de fadrozole (inhibidor de la aromatasa) es capaz de inhibir el efecto de la T sobre la motivación sexual incentiva, sugiriendo que los estrógenos son fundamentales en la regulación del aspecto motivacional en la CSM. Sin embargo, también se requiere de la presencia de hormonas androgénicas.

Algunos reportes en la rata macho muestran bajos niveles de E₂ y T circulantes por inactivación de la aromatasa (Honda et al., 1998, Taziaux et al., 2007), por efecto del estrés (McCormick et al., 2013) o por el bloqueo de la acción de los estrógenos a través de la administración intracerebroventricular con antagonistas de receptores de estrógenos (Seredynski et al., 2013) induciendo un déficit de la CSM. En este sentido, se ha reportado que la aromatasa posee una alta expresión en áreas implicadas en conductas reproductivas, tales como: amígdala, núcleo del lecho de la estría terminal, hipotálamo y APOm, esta última se ha vinculado fuertemente con la expresión tanto de aspectos motivacionales, como consumatorios (Balthazard et al., 2004). En este contexto, se ha reportado que ratas macho aparentemente normales, denominadas no copuladoras, fallan para iniciar la copula presentando disminución de la motivación sexual (Portillo y Paredes, 2003; 2009), lo cual se ha correlacionado con una baja actividad de la aromatasa cerebral en el NPOm (Portillo et al., 2007).

De acuerdo con lo anterior, las ratas CMI presentan niveles circulantes de T similares a las ratas CON, esto ha sido reportado previamente en este modelo animal (Hilakivi-Clarke y Goldberg., 1993; Bonilla-Jaime et al., 2003b), Sin embargo en el presente trabajo se analizó además la producción de E₂ uno de los metabolitos de T en suero, el cual tampoco se ve afectado por la administración de CMI, lo que sugiere que las alteraciones de la CSM parecen no depender de las concentraciones circulantes de T o E₂. No obstante, los niveles séricos de hormonas podrían no revelar las alteraciones en la aromatización a nivel local ya que la administración de T parece no restablecer por completo la conducta sexual ni la motivación en machos CMI, lo cual podría deberse a alteraciones en la función de la aromatasa a nivel cerebral. En

este sentido, se ha demostrado la presencia de aromatasa en axones y botones sinápticos, sugiriendo que el estradiol formado localmente puede actuar a nivel sináptico (Naftolin et al., 1996; Azcoitia et al., 2011). En este sentido, Konkle y McCarthy (2011) reportaron que las concentraciones de hormonas sexuales en diferentes áreas cerebrales no guardan relación directa con las concentraciones circulantes de dichas hormonas, dado que en el cerebro estas se producen localmente y de hecho los niveles de estas hormonas pueden variar dependiendo del área cerebral.

Actualmente se sabe que ambos componentes, tanto endocrinos como neuroquímicos interaccionan tanto en la etapa adulta como en el neurodesarrollo y diferenciación sexual del cerebro. Así, tenemos que en las etapas tanto prenatal como neonatal el principal esteroide masculinizante en el cerebro es el E₂ (McEwen y Alves, 1999). Los dimorfismos sexuales dependientes de hormonas esteroides en estructuras cerebrales incluyen diferencias en el volumen de núcleos específicos, variando el grado de arborización dendrítica y de densidad de sinapsis. Estos dimorfismos resultan de la diferenciación sexual de neuronas, de la sobrevivencia y/o plasticidad neuronal (Simerly, 2002). La diferenciación sexual de los sistemas de neurotransmisión están asociados con el desarrollo del dimorfismo sexual en el cerebro y la acción de las hormonas en el mismo (McCarthy et al., 2002; McCarthy, 2008). Se sabe que existen tres tipos de aromatasa cerebral las cuales tienen picos de actividad en diferentes periodos, el primero alrededor del día E13, el segundo del día E18 al P2 y la tercera alrededor del día P14 (Zhao et al., 2007). Esta última, coincide con la etapa de maduración del sistema serotoninérgico (Jacobs y Azmitia, 1992).

Diferentes estudios muestran que E₂ y 5-HT interaccionan en la diferenciación sexual del cerebro. Por ejemplo, 5-HT antagoniza los efectos masculinizantes neonatales de la T (Wilson et al., 1992; Wilson et al., 1998) y por ende se ha señalado que la 5-HT participa en la diferenciación sexual. En la rata durante la segunda semana de vida las concentraciones de 5-HT en hipotálamo son más altas en hembras que en machos y esta diferencia depende de la testosterona. En este periodo la inhibición de la producción de 5-HT por la administración de PCPA, exagera los efectos de la testosterona, mientras que la administración de 5-HT exógena a estas mismas ratas

lo normaliza. La 5-HT ejerce un control inhibitorio de la acción neonatal de la T sobre la exploración, locomoción y conducta sexual en la edad adulta (Wilson et al., 1992). Así también la administración de un agonista del receptor 5-HT₂ en machos durante la segunda semana de vida posnatal puede llevar a un patrón de secreción de hormona luteinizante de hembras (Wilson et al., 1998). En este sentido, el tratamiento con un antagonista 5-HT₂ tiene efecto sobre el tamaño de núcleos sexualmente dimórficos, tales como el periventricular y el área preóptica (Gorski et al., 1978; Murray et al., 2004). Estudios realizados en roedores han reportado que la inyección intraventricular de 5-HT a neonatos en el periodo crítico de diferenciación sexual disminuye las concentraciones plasmáticas de estradiol en hembras, sin alterar las de T en machos (González y Leret, 1992). Por lo que se podría pensar que las manipulaciones realizadas sobre el sistema serotoninérgico mediante la administración neonatal de CMI también podrían estar afectando la correcta secreción de hormonas esteroides en este modelo animal de depresión, pero es necesario un estudio de la síntesis de T y E₂ a nivel cerebral para confirmar dicha idea.

8.6. Análisis de la población neuronal y expresión de los receptores a estrógenos α y β en núcleo del rafe dorsal, hipotálamo e hipocampo de ratas tratadas con CMI

Nuestros resultados muestran que el tratamiento neonatal produce una disminución en la expresión de los RE β en núcleo del rafe dorsal y región CA3 del hipocampo que se acompaña de un aumento en la expresión de RE α y RE β en NPOm. Las acciones de E₂ se dan a través de la interacción de esta hormona y RE α y RE β . En el caso de la participación de los receptores a estrógenos, estudios realizados en ratones KO para el RE α , (ER α KO) muestran que dicho receptor es crítico para la correcta expresión de las conductas copulatorias, ya que se ha observado que estos ratones no copulan hasta eyacular y pocos individuos despliegan montas e intromisiones, además de presentar latencias de monta e intromisión elevadas (Rissman et al., 1999). Por otro lado, ratones KO para el RE β (β ERKO) no muestran déficit copulatorio comparado con sus controles (Ogawa et al., 1999). Esto se puede explicar debido a que RE α se expresa en mayor medida en regiones implicadas en el control de conductas

reproductivas como: núcleo del lecho de la estría terminal, amígdala, APOm, núcleo arcuato y tubérculo olfatorio. En contraste, el RE β se expresa en mayor cantidad en áreas implicadas en procesos cognitivos o que participan en la regulación del estado de ánimo como el hipocampo o el núcleo del rafé (Shughrue et al., 1997).

El tratamiento neonatal con CMI provoca una disminución de la expresión de RE β en núcleo del rafé dorsal, dicho receptor ha sido implicado en la regulación del sistema serotoninérgico (Gundlah et al., 2005), por lo que se podría pensar que las alteraciones en la expresión de este receptor en uno de los principales núcleos productores de 5-HT están relacionadas con la disminución en la función serotoninérgica presente en este modelo de depresión. De un modo similar, han sido reportadas alteraciones en la expresión de RE en diferentes áreas cerebrales relacionadas con el trastorno depresivo. Aunado a ello existe una disminución en la expresión del ARNm del RE β en tallo cerebral de pacientes depresivos víctimas de suicidio (Ostlund et al., 2003).

Así también, el tratamiento neonatal con CMI provoca una disminución de la expresión de RE β en la región CA3 hipocampal. El hipocampo se ha relacionado con los déficits de memoria que se presentan en la depresión. En particular CA3 envía proyecciones a células de CA1 que son de gran importancia en el procesamiento de la información espacial (O'Reilly et al., 2014). Actualmente existe poca información que relacione trastornos depresivos con alteraciones en la expresión de REs. Se ha reportado que en pacientes depresivos se observa un incremento de la expresión del RE α en la corteza prefrontal e hipocampo (Perlman et al., 2005), lo cual podría estar relacionado con el déficit cognitivo que se presenta en la depresión. En relación con lo anterior, se ha observado que en mujeres con niveles bajos de E₂ como en la menopausia hay una disminución de las funciones cognitivas que se revierte con terapia hormonal de reemplazo (Sherwin, 2009). Estudios en roedores muestran que la administración de E₂ a ratas ovariectomizadas mejora la memoria espacial (Foster et al., 2003). En ratas tratadas neonatalmente con CMI, Bhagya y cols. (2008) muestran que existe un deterioro en el aprendizaje en la tarea de laberinto radial. Nuestros resultados apoyan el hecho de que alteraciones en la expresión de REs en

ratas tratadas con CMI podrían estar relacionadas con las alteraciones de la función cognitiva que se presentan en este modelo y abren la puerta para futuras investigaciones en torno al papel de los REs en el trastorno depresivo.

Aunado a esto, los presentes resultados muestran que el tratamiento neonatal con CMI provoca un aumento en la expresión de RE α y RE β en NPOM, esta área junto con otras como el núcleo del lecho de la estría terminal y NAM forma parte del circuito cerebral que procesa claves quimiosensoriales y controla la expresión de la CSM (Portillo et al., 2007). Y todas ellas presentan altos niveles de expresión de REs y de aromatasa (Roselli et al., 1985; Horst, 2010). No hay datos que analicen la expresión de REs en áreas relacionadas con la copula en modelos animales de depresión, sin embargo; en ratas que presentan alteraciones copulatorias como las denominadas no copuladoras, se presenta una disminución de la motivación y la ejecución sexual (Portillo y Paredes, 2003; 2009) que se ha asociado a una disminución de la actividad aromatasa cerebral en el NPOM (Portillo et al., 2007) y disminución del número de células inmunorreactivas para RE α en APOm (Portillo et al., 2006). En ratas tratadas con CMI un incremento de la expresión de RE α y RE β en NPOM podría implicar un efecto compensatorio de alteraciones en la producción local de E₂, dado que se ha observado que una disminución en las concentraciones de E₂ dada por ejemplo, por la castración provoca un incremento en la expresión de RE α (Rudolph y Sengelaub, 2013). Sin embargo, se requieren estudios sobre la producción de E₂ en áreas cerebrales que controlan la CSM en ratas CMI. Por otro lado, en áreas como núcleo del lecho de la estría terminal, APOm y rafé dorsal la mayoría de las células expresan ambos receptores funcionando así como heterodímeros (Ver para revisión Nomura et al., 2003). Por lo que un cambio en la expresión de cualquiera de los dos REs en estas áreas podría provocar un cambio en la función que cumple el heterodímero en dicha región. Lo cual podría explicar las diversas alteraciones conductuales en el modelo.

Ambos receptores pueden ser regulados por los niveles de E₂, sin embargo, en el caso de RE β puede ser también regulado por la expresión de RE α de una manera específica para cada región (Nomura et al., 2003). Así, se ha reportado que en ratones KO para RE α se han encontrado altos niveles de expresión de RE β APOm, hipocampo,

núcleo paraventricular y núcleo supraóptico (Couse et al., 1997; Shughrue, 1998). La disminución en la expresión de RE β podría ser resultado de la regulación transcripcional ya sea por metilación o por la regulación de genes de factores de transcripción específicos que se unen al promotor de RE β (Nojima et al., 2001). Más aún se sabe que una de las variantes de splicing de RE β , RE β 2 induce un incremento de la degradación proteolítica de RE α (Matthews et al., 2006).

Diversas evidencias indican que la expresión y la cantidad de los RE α no solo parecen depender de la concentración de su ligando en el cerebro masculino, sino que es regulado por factores que interactúan para controlar la expresión de los RE α en el cerebro, sugiriendo que el gen del receptor de estrógenos contiene múltiples promotores que impulsan su expresión (Wilson et al., 2008). Al respecto, se ha observado que la expresión del RE α es regulada por el sistema colinérgico, esto a través de la administración de atropina, un antagonista de los receptores muscarínicos bloquea la expresión del RE α (Arteaga-López et al., 2005). Acorde a lo anterior, existen evidencias que las ratas tratadas con CMI presentan alteraciones en la sensibilidad del sistema colinérgico (Bonilla-Jaime et al., 1998) por lo que es posible que dichas modificaciones en este sistema repercutan en los cambios dinámicos que se dan en la expresión del RE α durante el desarrollo (Simerly et al, 1990), con altos niveles de unión de estradiol en regiones no hipotalámicas como en la corteza y el hipocampo durante las dos primeras semanas de vida (Shughrue et al., 1990), mismas que disminuyen conforme se acerca la pubertad. Cambios en el neurodesarrollo por efecto del tratamiento crónico con diferentes SSRI como la CMI han sido observados, por lo que no se descarta que también tengan impacto en los factores que regulan la expresión del RE.

Si bien los estrógenos están implicados en modular los síntomas de la depresión, síntomas que fluctúan a lo largo del ciclo menstrual (Freeman et al., 2002) y en hombres con hipogonadismo (Connor et al., 2002), pocos estudios buscan una conexión directa entre los E₂, la expresión del RE α en la disminución de la libido. Uno de los modelos animales de depresión, la línea sensible de ratas Flinders (FSL) presentan una disminución en los niveles de expresión de RE α (Osterlund et al., 1999),

aunado a las alteraciones en la CSM (Ferreira-Nuño et al., 2002). Por otro lado, se sabe que en pacientes depresivos víctimas de suicidio el RE β se encuentra disminuido en el locus coeruleus (Ostlund et al., 2003). En otros padecimientos como el autismo, un padecimiento que podría estar relacionado con hiper-serotoninemia durante el desarrollo (Whitaker-Azmitia, 2005); se han observado diferentes alteraciones como una disminución de la expresión de aromatasa cerebral y disminución en la expresión de RE β en el giro medio frontal (Crider et al., 2014).

Además, se ha propuesto que el E₂ podría estar actuando por mecanismos no genómicos, ya que se han encontrado sitios de unión de E₂ en membranas de células neurales (Ramírez y Zheng, 1996). Los receptores membranales GPR30, RE α 66, RE α 46 y RE α 36 podrían ser candidatos a ser evaluados en un futuro ya que podrían también intervenir en la regulación de la expresión de REs clásicos o del sistema serotoninérgico, dado que esta regulación aun es poco entendida.

Nuestros resultados también muestran que el tratamiento neonatal con CMI no provoca cambios en el número de neuronas totales en rafe dorsal, APOm, NPOm o hipocampo. Múltiples autores reportan cambios en la densidad celular de diferentes áreas cerebrales relacionado con el trastorno depresivo. Underwood y cols. (1999) muestran que víctimas de suicidio presentan un incremento en el número de células del rafe dorsal, mientras que, Baumann y cols. (2002) muestran una disminución del 31% en neuronas del rafe dorsal y algunos otros autores no reportan cambios morfológicos o variación en el número de neuronas (Stockmeier et al., 1998; Hendricksen et al., 2004). En hipocampo numerosos estudios muestran que hay una reducción del volumen hipocampal a partir de la aparición del primer episodio depresivo mayor (Sheline et al., 1999; MacQueen et al., 2003; Videbech y Ravnkilde, 2004). Así también se presenta una marcada asimetría en el volumen hipocampal (MacQueen et al., 2003), en este caso una análisis para observar la simetría hipocampal podría ser necesario en ratas CMI, ya que, los presentes datos no analizan diferencias entre el hipocampo derecho e izquierdo sino que se tomaron los datos en conjunto.

9. CONCLUSIONES

El efecto antidepresivo de 8-OH-DPAT en la PNF es mediado por los receptores 5-HT_{1A} post-sinápticos, ya que no se ve alterado por el bloqueo de la síntesis de 5-HT por medio de PCPA.

La administración de E₂ en ratas tratadas con CMI revierte los efectos del tratamiento neonatal con CMI en las conductas evaluadas en la PNF tanto en dosis fisiológicas como farmacológicas, indicando una posible alteración en la producción de E₂ en áreas límbicas que afecte su interacción con el sistema serotoninérgico.

El tratamiento neonatal con CMI provoca disminución de la motivación sexual en la prueba de MSI, esta disminución de la motivación se ve revertida por la administración de dosis altas de E₂ y la combinación de E₂+DHT, indicando que las alteraciones en producción de E₂ podrían encontrarse también en áreas que controlan la copula.

El tratamiento con CMI no altera las concentraciones séricas de E₂ y T, sin embargo; estos resultados podrían no reflejar los niveles de esta hormona en cerebro por lo que son necesarios más análisis a este respecto.

El tratamiento neonatal produce una disminución en la expresión de los RE β en núcleo del rafe dorsal y región CA3 del hipocampo que se acompaña de un aumento en la expresión de RE α y RE β en NPOm lo que podría indicar que el tratamiento con CMI provoca cambios en la regulación de estos receptores o en la expresión de sus coactivadores. Sin embargo, se requiere más investigación al respecto ya que la regulación de estos receptores esta aun poco entendida.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la expresión de la proteína para el receptor 5-HT_{1A} en las ratas tratadas neonatalmente con CMI.
- Evaluar la interacción de E₂ y el receptor 5-HT_{1A} en la prueba de nado forzado en ratas tratadas neonatalmente con CMI.
- Evaluar si se modifica la acción del E₂ sobre la expresión del receptor 5-HT_{1A} en el núcleo del rafe, hipotálamo e hipocampo en las ratas tratadas neonatalmente con CMI.
- Evaluar la expresión del receptor 5-HT_{1A} en otras áreas importantes en la regulación del estado de ánimo como corteza prefrontal y amígdala.
- Analizar el efecto del tratamiento neonatal con CMI sobre otros receptores involucrados en el trastorno depresivo como el 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}.
- Evaluar si existen déficits cognitivos en las ratas tratadas neonatalmente con CMI.

11. REFERENCIAS

- Acconcia, F., Totta, P., Ogawa, S., Cardillo, I., Inoue, S., Leone, S., Trentalance, A., Muramatsu, M., Marino, M.J. 2005. Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling. *Cell. Physiol.* 203(1): 193-201.
- Ágmo, A. 2003. Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 117: 3–14.
- Agmo, A. 2010. La conducta sexual desde el punto de vista epicúreo: Reforzamiento, recompensa e incentivos sexuales. En: Aproximaciones al estudio de la motivación y ejecución sexual. Guevara-Pérez, M.A., Hernández-González, M., Chacón- Gutiérrez, L., y Barradas-Bribiesca, J.A. (Eds). Universidad de Guanajuato y Grupo Bioseñales México. pp. 15-61.
- Agmo, A., Ellingsen, E. 2003. Relevance of non-human animal studies to the understanding of human sexuality. *Scand. J. Psychol.* 44(3): 293-301.
- Agmo, A., Picker, Z. 1990. Catecholamines and the initiation of sexual behavior in male rats without sexual experience. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 35(2): 327-334.
- Ágmo, A., Turi, A.L., Ellingsen, E., Kaspersen, H. (2004). Preclinical models of sexual desire: conceptual and behavioral analyses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78: 379–404.
- Ahlenius, S., Larsson, K. 1997. Specific involvement of central 5-HT1A receptors in the mediation of male rat ejaculatory behavior. *Neurochem. Res.* 22: 1065–1070.
- Akiskal, H.S. 1995. Mood disorders: introduction and overview. En: Kaplan, H., Sadok, B.J. (Eds). *Comprehensive textbook of psychiatry*. 6th ed. Baltimore, MD: Lippincott, Williams & Wilkins. pp. 1079.
- Alberdi-Sudupe, J., Taboada, O., Castro-Dono, C., Vázquez- Ventosos, C. 2006. Depresión. *Guías Clínicas.*; 6(11): 1-6.
- Albert, P.R. 2012. Transcriptional regulation of the 5-HT1A receptor: implications for mental illness. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367(1601): 2402-2415.
- Almeida, M., Han, L., O'Brien, C.A., Kousteni, S., Manolagas, S.C. 2006. Classical genotropic versus kinase-initiated regulation of gene transcription by the estrogen receptor alpha. *Endocrinology.* 147: 1986–1996.
- American Psychiatric Association. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales-Texto revisado (DSM_IV_TR). 2003. Tomo II Ed. Masson Doyma, México, D.F. pp. 699.
- Ansorge, M.S., Hen, R., Gingrich, J.A. 2007. Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7: 8 –17.

- Arteaga-López, P.R., Domínguez, R., Cerbón, M.A., Mendoza-Rodríguez, C.A., Cruz, M.E. 2005. Effects of cholinergic system blockade on the mRNA expression of GnRH in both sides of the preoptic and anterior hypothalamic area of cyclic female rats. 38th Annual Meeting of the Society-for-the-Studyof-Reproduction Location: Ctr Rech Biol Reproduct, Quebec City, CANADA. pp. JUL 24-27, SI Pages: 225-225.
- Arteaga, M., Motte-Lara, J., Velázquez-Moctezuma, J. 2002. Effects of yohimbine and apomorphine on the male sexual behaviour pattern of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Eur. Neuropsychopharmacol.* 12(1): 39-45.
- Attila, M., Oksala, R., Agmo, A. 2010. Sexual incentive motivation in male rat requires both androgens and estrogens. *Horm. Behav.* 58: 341-51.
- Azcoitia, I., Yague, J.G., Garcia-Segura, L.M. 2011. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience.* 19(1): 139-147.
- Azmitia, E.C. 2001. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain. Res. Bull.* 56(5): 413-424.
- Bach-Mizrachi, H., Underwood, M.D., Kassir, S.A., Bakalian, M.J., Sibille, E., Tamir, H., Mann, J.J., Arango, V. 2006. Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacol.* 31(4): 814-824.
- Balthazart, J., Baillien, M., Cornil, C.A., Ball, G. 2004. Preoptic aromatase modulates male sexual behavior: slow and fast mechanisms of action. *Physiol. Behav.* 83: 247-270.
- Banerjee, S., Chambliss, K.L., Mineo, C., Shaul, P.W. 2014. Recent insights into non-nuclear actions of estrogen receptor alpha. *Steroids.* 81: 64-69.
- Baum, M.J., Vreeburg, J.T. 1973. Copulation in castrated male rats following combined treatment with estradiol and dihydrotestosterone. *Science.* 19: 182 (4109): 283-285.
- Baumann, B., Bielau, H., Krell, D., Agelink, M.W., Diekmann, S., Wurthmann, C., Trübner, K., Bernstein, H.G., Danos, P., Bogerts, B. 2002. Circumscribed numerical deficit of dorsal raphe neurons in mood disorders. *Psychol. Med.* 32(1): 93-103.
- Bear, M.F., Connors, B., Paradiso, M. 2008. Neuronas serotoninérgicas. En: *Neurociencia: la exploración del cerebro.* 3ª ed. Barcelona, España. Lippincott, Williams & Wilkins. pp. 146.
- Belló, M., Puentes-Rosas, E., Medina-Mora, M.E., Lozano, R. 2005. Prevalencia y diagnóstico de depresión en población adulta en México. *Salud Pública.* 47: 4-11.

- Benjet, C., Borges, G., Medina-Mora, M.E., Fleiz-Bautista, C., Zambrano-Ruiz, J. 2004. La depresión con inicio temprano: prevalencia curso natural y latencia para buscar tratamiento. *Salud Pública*. 46: 417-424.
- Bhagya, V., Srikumar, B.N., Raju, T.R., Shankaranarayana-Rao, B.S. 2008. Neonatal clomipramine induced endogenous depression in rats is associated with learning impairment in adulthood. *Behav. Brain. Res.* 187(1):190-4.
- Bitar, M.S., Ota, M., Linnoila, M., Shapiro, B.H. 1991. Modification of gonadectomy-induced increases in brain monoamine metabolism by steroid hormones in male and female rats. *Psychoneuroendocrinol.* 16 (6): 547-557.
- Blake, C., Fabick, K.M., Setchell, K.D., Lund, T.D., Lephart, E.D. 2011. Neuromodulation by soy diets or equol: anti-depressive & anti-obesity-like influences, age- & hormone-dependent effects. *BMC. Neurosci.* 16: 12-28.
- Blaustein, J.D. 1992. Cytoplasmic estrogen receptors in the rat brain: immunocytochemical evidence using three antibodies with distinct epitopes. *Endocrinology.* 131: 1336-1342.
- Blier, P., Montigny, C. 1990. Differential effect of gepirone on presynaptic and postsynaptic serotonin receptors: single cell recording studies. *J. Clin. Psychopharmacol.* 10(3): 13-20.
- Blier, P., Ward, N. 2003. Is there a role for 5-HT_{1A} receptor agonist in treatment of depression? *Biol Psychiatry.* 53: 193-203.
- Boldrini, M., Underwood, M.D., Mann, J.J., Arango, V. 2005. More tryptophan hydroxylase in the brainstem dorsal raphe nucleus in depressed suicides. *Brain. Res.* 1041(1): 19-28.
- Bonilla-Jaime H., Limón-Morales O, Arteaga-Silva, M., Hernández-González, M., Guadarrama-Cruz, G., Alarcón-Aguilar, F., Vázquez-Palacios, G. 2010. Orchiectomy modifies the antidepressant-like response of nicotine in the forced swimming test. *Physiol. Behav.* 101(4): 456-461.
- Bonilla-Jaime, H., Retana-Márquez, S., Vázquez-Palacios, G., Velázquez-Moctezuma, J. 2003a. Corticosterone and testosterone levels after chronic stress in an animal model of depression. *Neuropsychobiology.* 48: 55-58.
- Bonilla-Jaime, H., Retana-Márquez, S., Vázquez-Palacios, G., Velázquez-Moctezuma, J. 2003b. Plasma levels of corticosterone and testosterone after sexual activity in male rats treated neonatally with clomipramine. *Behavioural. Pharmacology.* 14 (4): 357-361.
- Bonilla-Jaime, H., Retana-Márquez, S., Velázquez-Moctezuma, J. (1998). Pharmacological features of masculine sexual behavior in an animal model of depression. *Pharmacology. Biochem. Behav.* 60: 39-45.

- Bonilla-Jaime, H., Retana-Márquez, S., Velázquez-Moctezuma, J. 1998. Pharmacological features of masculine sexual behavior in an animal model of depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60: 39-45.
- Boulware, M.I., Kordasiewicz, H., Mermelstein, P.G. 2007. Caveolin proteins are essential for distinct effects of membrane estrogen receptors in neurons. *J. Neurosci.* 27(37): 9941-9950.
- Bouma, E. M. 2010. *The Sensitive Sex: Depressive Symptoms in Adolescents; the Role of Gender, Polymorphic Genes and Psycho-Physiological Stress Responses.* Thesis, University Groningen, pp. 3–129.
- Brunello, N., Riva, M., Rovescalli, A.C., Galimberti, R., Racagni, G. 1988. Age-related changes in rat serotonergic and adrenergic systems and in receptor responsiveness to subchronic desipramine treatment. *Pharmacol. Toxicol.* 63(3): 150-155.
- Bunney, W.E., Bunney, B.G. 2000. Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacol.* 22 (4): 335-345.
- Carlson, N.R. 2006. *Fisiología de la conducta.* 8ª ed. Ed. Pearson-Adison Wesley. pp. 131.
- Carretti, N., Florio, P., Bertolin, A., Costa, C.V.L., Allegri, G., Zilli, G. 2005. Serum fluctuations of total and free tryptophan levels during the menstrual cycle are related to gonadotrophins and reflect brain serotonin utilization. *Hum. Repr.* 20(6): 1548-1553.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R. 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science.* 301: 386–389
- Catena-Dell'Osso, M., Rotella, F., Dell'Osso, A., Fagiolini, A., Marazziti, D. 2013. Inflammation, serotonin and major depression. *Curr. Drug. Targets.* 14(5): 571-577.
- Cervo, L., Samanin, R. 1991. Effect of chronic treatment with 8-OH-DPAT in the forced swimming test requires the integrity of presynaptic serotonergic mechanisms. *Psychopharmacol.* 103(4): 524-528.
- Chen, C.J., Nguyen, T., Shively, J.E. 2010. Role of calpain-9 and PKC-delta in the apoptotic mechanism of lumen formation in CEACAM1 transfected breast epithelial cells. *Exp. Cell. Res.* 316: 638–648.
- Cheng, Y., Su, Q., Shao, B., Cheng, J., Wang, H., Wang, L., Lin, Z., Ruan, L., ZhuGe, Q., Jin, K. 2013. 17β-Estradiol attenuates poststroke depression and increases neurogenesis in female ovariectomized rats. *Biomed. Res. Int.* 392434. doi: 10.1155/2013/392434.

- Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C., Andò, S., Maggiolini, M., Carreau, S., Pezzi, V. 2010. 17 betaestradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. *Mol. Cell. Endocrinol.* 320: 136–144.
- Clayton, A.H., Montejo, A.L. 2006. Major depressive disorder, antidepressants, and sexual dysfunction. *J. Clin. Psychiatry.* 67 (6): 33-37.
- Cohen, L.S., Soares, C.N., Poitras, J.R., Prouty, J., Alexander, A.B., Shifren, J.L. 2003. Short-term use of estradiol for depression in perimenopausal and postmenopausal women: a preliminary report. *Am. J. Psychiatry.* 160: 1519–1522.
- Connor, D.B. O., Archer, J., Hair, W.M., Wu, F.C. 2002. Exogenous testosterone aggression, and mood in eugonadal and hypogonadal men. *Physiol. Behav.* 75: 557–566
- Contreras, C.M., Saavedra-Vélez, M., Rodríguez-Landa, J.F., Bernal-Morales, B., Gutiérrez-García, A.G. 2002. Neuroquímica de la motivación y la emoción. En: Hernández-González ed. *Motivación animal y humana.* 1a ed. Manual moderno. pp. 39-64.
- Cook, S.C., Wellman, C.L. 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J. Neurobiol.* 60: 236-248.
- Costagliola, C., Parmeggiani, F., Semeraro, F., Sebastiani, A. 2008. Selective serotonin reuptake inhibitors: a review of its effects on intraocular pressure. *Curr. Neuropharmacol.* 6(4): 293-310.
- Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A., Korach, K.S. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptoralpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse, *Endocrinol.* 138: 4613–4621.
- Cowen, P.J. 2008. Serotonin and depression: pathophysiological mechanism or marketing myth? *Trends. Pharmacol. Sci.* 29: 433-436.
- Cowley, S.M., Parker, M.G. 1999. A comparison of transcriptional activation by ER α and ER β . *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 69(1-6): 165-175.
- Crider, A., Thakkar, R., Ahmed, A.O., Pillai, A. 2014. Dysregulation of estrogen receptor beta (ER β), aromatase (CYP19A1), and ER co-activators in the middle frontal gyrus of autism spectrum disorder subjects. *Mol. Autism.* 5(1): 46.
- Cryan, J., Leonard, B. 2000. 5-HT_{1A} and beyond: the role of serotonin and its receptors in depression and the antidepressant response. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 15: 113-135.

- Cryan, J.F., Markou, A., Lucki, I. 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends. Pharmacol. Sci.* 23 (5): 238–245.
- Curzon, G. 1988. Serotonergic mechanism of depression. *Clin. Neuropharmacol.* 11(2): 11-20.
- De Ceballos, M.L., Benedi, A., Urdin, C., Del Rio, J. 1985. Prenatal exposure of rats to antidepressant drugs down-regulates beta-adrenoceptors and 5-HT₂ receptors in cerebral cortex. Lack of correlation between 5-HT₂ receptors and serotonin-mediated behaviour. *Neuropharmacology*, 24(10): 947-952.
- De Vry, J. 1995. 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacol.* 121(1): 1-26.
- De Vry, J., Schreiber, R., Melon, C., Dalmus, M., Jentsch, K.R. 2004. 5-HT_{1A} receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat. *Eur. Neuropsych.* 14: 487-495.
- Demyttenaere, K., Bruffaerts, R., Posada-Villa, J., Gasquet, I., Kovess, V., Lepine, J.P., Angermeyer, M.C., Bernert, S., de Girolamo, G., Morosini, P., Polidori, G., Kikkawa, T., Kawakami, N., Ono, Y., Takeshima, T., Uda, H., Karam, E.G., Fayyad, J.A., Karam, A.N., Mneimneh, Z.N., Medina-Mora, M.E., Borges, G., Lara, C., de Graaf, R., Ormel, J., Gureje, O., Shen, Y., Huang, Y., Zhang, M., Alonso, J., Haro, J.M., Vilagut, G., Bromet, E.J., Gluzman, S., Webb, C., Kessler, R.C., Merikangas, K.R., Anthony, J.C., Von Korff, M.R., Wang, P.S., Brugha, T.S., Aguilar-Gaxiola, S., Lee, S., Heeringa, S., Pennell, B.E., Zaslavsky, A.M., Ustun, T.B., Chatterji, S.; WHO World Mental Health Survey Consortium. 2004. WHO World Mental Health Survey Consortium. Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *JAMA.* 291(21): 2581-2590.
- Detke, M.J., Rickels, M., Lucki, I. 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacol.* 121: 66-72.
- Donner, N., Handa, R.J. 2009. Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan-hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei. *Neurosc.* 163(2):705-718.
- Dranovsky, A., Hen, R. 2006. Hippocampal Neurogenesis: Regulation by Stress and Antidepressants. *Biol. Psychiatry.* 59(12): 1136–1143

- Duman, C.H. 2010. Models of depression. En: Vitamins and Hormones, Hormones of the Limbic system. Ed. Elsevier Inc. Vol. 81, pp 1-21.
- Duman, R.S., Malberg, J., Nakagawa, S. 2001. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299(2): 401-407.
- Estrada-Camarena, E., Fernandez-Guasti, A., Lopez-Rubalcava, C. 2004. Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacol.* 173: 139-45.
- Estrada-Camarena, E., Fernandez-Guasti, A., López-Ruvalcaba, C. 2003. Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in forced swimming test. *Neuropsychopharmacol.* 28: 830-838.
- Estrada-Camarena, E., Fernandez-Guasti, A., López-Ruvalcaba, C. 2004. Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test. *Psychopharmacol.* 173: 139-145
- Estrada-Camarena, E., Fernandez-Guasti, A., López-Ruvalcaba, C. 2006a. Participation of the 5-HT1A receptor in the. Antidepressant-like effect of estrogens in forced swimming test. *Neuropsychopharmacol.* 31: 247-255.
- Estrada-Camarena, E., Lopez-Rubalcava, C., Fernandez-Guasti, A. 2006b. Facilitating antidepressant-like actions of estrogens are mediated by 5-HT1A and estrogen receptors in the rat swimming test. *Psychoneuroendocrinol.* 31: 905-914.
- Estrada-Camarena, E., Rivera, N.M., Berlanga, C., Fernandez-Guasti, A. 2008. Reduction in the latency of action of antidepressants by 17 beta-estradiol in the forced swimming test. *Psychopharmacol.* 201: 351-360.
- Feenstra, M.G., Van Galen, H., Te Riele, J.M., Botterblom, M.H., Mirmiran, M. 1996. Decreased hypothalamic serotonin levels in adult rats treated neonatally with clomipramine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55: 647-652.
- Feldman, R.S., Meyer, J.S., Quenzer, L.F. 1997. Principles of Neuropsychopharmacology. Sinauer Associates, Inc., Publishers. pp 345-389.
- Feng, P.M., Vogel, G.W. 2001. The critical window of brain development from susceptible to insusceptive. Effects of clomipramine neonatal treatment on sexual behavior. *Dev. Brain. Res.* 129 (1): 107-110.
- Fernández-Guasti, A., Hansen, S., Archer, T., Jonsson, G. 1986. Noradrenaline-serotonin interactions in the control of sexual behavior in the male rat: DSP4-induced noradrenaline depletion antagonizes the facilitatory effect of serotonin agonist, 5-MeODMT and lisuride. *Brain. Res.* 377: 112-118.

- Ferreira-Nuño, A., Overstreet, D.H., Morales-Otal, A., Velázquez-Moctezuma, J. 2002. Masculine sexual behavior features in the Flinders sensitive and resistant line rats. *Behav. Brain. Res.* 128(2): 113-119.
- Forster, E., Zhao, S., Frotscher, M. 2006. Laminating the hippocampus. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 259-267.
- Foster, T.C., Sharrow, K.M., Kumar, A., Masse J. 2003. Interaction of age and chronic estradiol replacement on memory and markers of brain aging. *Neurobiol. Aging.* 24(6):839–52.
- Frackiewicz, E.J., Sramek, J.J., Cutler, N.R. 2000. Gender differences in depression and antidepressant pharmacokinetics and adverse events. *Ann. Pharmacother.* 34: 80–88.
- Freeman, M.P., Smith, K.W., Freeman, S.A., McElroy, S.L., Kmetz, G.E., Wright, R., Keck, P.E. Jr. 2002. The impact of reproductive events on the course of bipolar disorder in women. *J. Clin. Psychiatry.* 63: 284–287
- González, M.I., Albonetti, E., Siddiqui, A., Farabollini, F., Wilson, C.A. 1996. Neonatal organizational effects of the 5-HT₂ and 5-HT_{1A} subsystems on adult behavior in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54(1): 195-203.
- González, M.I., Leret, M.L. 1992. Role of monoamines in the male differentiation of the brain induced by androgen aromatization. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41(4): 733-737.
- González-Pimentel, R., y Hernández-González, M. 2002. Aspectos motivacionales de la conducta sexual. En: Hernández-González ed. *Motivación animal y humana.* 1a ed. Manual moderno. pp. 127-151.
- Goodwin, G.M., De Souza, R.J., Green, A.R. 1986. The effects of a 5-HT₁ receptor ligand isapirone (TVX Q 7821) on 5-HT synthesis and the behavioural effects of 5-HT agonists in mice and rats. *Psychopharmacol.* 89(3): 382-387.
- Goodwin, G.M., De Souza, R.J., Green, A.R., Heal, D.J. 1987. The pharmacology of the behavioural and hypothermic responses of rats to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT). *Psychopharmacol.* 91(4): 506-511.
- Gorski, R.A., Gordon, J.H., Shryne, J.E., Southam, A.M. 1978. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain. Res.* 148(2): 333-346.
- Gorzalka, B.B., Rezek, D.L., Whalen, R.E. 1975. Adrenal mediation of estrogen-induced ejaculatory behavior in the male rat. *Physiol. Behav.* 14(3): 373-376.
- Gouin, J.P., Connors, J., Kiecolt-Glaser, J.K., Glaser, R., Malarkey, W.B., Atkinson, C., Beversdorf, D., Quan, N. 2010. Altered expression of circadian rhythm genes among individuals with a history of depression. *J. Affect. Disord.* 126: 161-166.

- Gozlan, H., Daval, G., Verge, D., Spampinato, U., Fattaccini, C.M., Gallissot, M.C., el Mestikawy, S., Hamon, M. 1990. Aging associated changes in serotonergic and dopaminergic pre- and postsynaptic neurochemical markers in the rat brain. *Neurobiol. Aging*. 11(4): 437-449.
- Gregorian, R.S., Golden, K.A., Bahce, A. 2002. Goodman, C., Kwong, W.J., Khan, Z.M. 2002. Antidepressant-induced sexual dysfunction. *Ann. Pharmacother.* 36(10): 1577-1589.
- Grigoriadis, S., Robinson, G.E. 2007. Gender issues in depression. *Ann. Clin. Psychiatry*. 19: 247-255.
- Guevara-Pérez, M.A. y Hernández-González, M. 2006. Registro y análisis automatizado de señales bioeléctricas cerebrales durante la ejecución sexual. Universidad de Guadalajara. pp. 17-19.
- Gundlah, C., Alves, S.E., Clark, J.A., Pai, L.Y., Schaeffer, J.M., Rohrer, S.P. 2005. Estrogen receptor-beta regulates tryptophan hydroxylase-1 expression in the murine midbrain raphe. *Biol. Psychiatry*. 57: 938–942.
- Gundlah, C., Lu, N.Z., Bethea, C.L. 2002. Ovarian steroid regulation of monoamine oxidase-A and -B mRNAs in the macaque dorsal raphe and hypothalamic nuclei, *Psychopharmacol.* 160: 271–282.
- Halbreich, U., Kahn, L.S. 2001. Role of estrogen in the aetiology and treatment of mood disorders. *CNS. Drugs*. 15: 797–817.
- Hansen, H.H., Mikkelsen, J.D. 1998. Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic neonatal exposure to a serotonin reuptake inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 352: 307-315.
- Hart, S.A., Snyder, M.A., Smejkalova, T., Woolley, C.S. 2007. Estrogen mobilizes a subset of estrogen receptor-alpha-immunoreactive vesicles in inhibitory presynaptic boutons in hippocampal CA1. *J. Neurosci.* 27: 2102–2111.
- Hendricksen, M., Thomas, A.J., Ferrier, I.N., Ince, P., O'Brien, J.T. 2004. Neuropathological study of the dorsal raphe nuclei in late-life depression and Alzheimer's disease with and without depression. *Am. J. Psychiatry*. 161(6): 1096-1102.
- Hensler, J.G., Kovachich, G.B., Frazer, A. 1991. A quantitative autoradiographic study of serotonin1A receptor regulation. Effect of 5, 7-dihydroxytryptamine and antidepressant treatments. *Neuropsychopharmacol.* 4(2): 131-144.
- Hernández-González, M., y Guevara-Perez, M.A. 2010. Actividad eléctrica cerebral durante la motivación sexual e interacción copulatoria. In: Guevara-Perez MA, Hernandez-

Gonzalez M, Chacon-Gutierrez L, Barradas-Bribiesca JA. (Eds). Aproximaciones al estudio de la motivación. México, Universidad de Guanajuato. pp. 197-222.

- Hernández-González, M., y Prieto-Beracochea, C.A. 2002. Un acercamiento a la motivación. En: Hernández-González ed. Motivación animal y humana. 1a ed. Manual moderno. pp. 3-17.
- Herrera-Pérez, J.J., Martínez-Mota, L., Fernández-Guasti, A. 2008. Aging increases the susceptibility to develop anhedonia in male rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 32(8): 1798-1803.
- Herrera-Pérez, J.J., Martínez-Mota, L., Fernández-Guasti, A. 2010. Aging impairs the antidepressant-like response to citalopram in male rats. *Eur. J. Pharmacol.* 633(1-3): 39-43.
- Hilakivi, I., Ahtee, L., Rinne, J.O., Tiara, T., Attila, L.M.J., Marjam-Aki, P. 1995. Effects of monoamine uptake inhibitors given early postnatally on monoamines in the brain stem, caudate/putamen and cortex, and on D1 and D2 receptors in the caudate/putamen. *J. Neural. Transm.* 102: 139-148.
- Hilakivi-Clarke, L.A., Goldberg, R. 1993. Effects of tryptophan and serotonin uptake inhibitors on behavior in male transgenic transforming growth factor alpha mice. *Eur. J. Pharmacol.* 237(1): 101-108.
- Hiroi, R., McDevitt, R.A., Neumaier, J.F. 2006. Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field, *Biol. Psychiatry.* 60: 288–295.
- Honda, S., Harada, N., Ito, S., Takagi, Y., Maeda, S. 1998. Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp19* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252: 445–449.
- Horst, G.J. 2010. Estrogen in the limbic system. *Vitam. Horm.* 82: 319-338.
- Hull, E.M., Dominguez, J.M. 2007. Sexual behavior in male rodents. *Horm. Behav.* 52(1): 45-55.
- Hull, E.M., Meisel, R.L., Sachs, B.D. 2002. Male sexual behavior. En: D.W. Pfaff, D.W., A.P. Arnold, A.P., A.M. Arnold, A.M., A.M. Etgen, A.M., S.E. Fahrbach, S.E., and R.T. Rubin, R.T. (Eds). *Hormones, Brain and Behavior.* San Diego CA: Academic Press. pp: 3-137.
- Hull, E.M., Wood, R.I., McKenna, K.E. 2006. Neurobiology of male sexual behavior. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* pp. 1729-1797.

- Igvy-May, N., Tamir, H., Gershon, M.D. 1994. Synaptic properties of serotonergic growth cones in developing rat brain. *J. Neurosci.* 14: 1101-1029.
- Irsik, D.L., Carmines, P.K., Lane, P.H. 2013. Classical estrogen receptors and ER α splice variants in the mouse. *PLoS One*; 8(8):e70926. doi: 10.1371/journal.pone.0070926.
- Jacobs, B.L., Azmitia, E. C. 1992. Structure and function of the brain serotonergic system. *Physiol. Rev.*72: 165-229.
- Jacobson, L., Sapolsky, R. 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.* 12: 118-134.
- Jans, L.A., Riedel, W.J., Markus, C.R., Blokland, A. 2006. Serotonergic vulnerability and depression: assumptions experimental evidence and implications. *Mol. Psychiatry.* 12(6), 522-543.
- Kageyama, A. S., Sakakibara, H., Zhou, W., Yoshioka, M., Ohsumi, M., Shimoi, K., Yokogoshi, H. 2010. Genistein regulated serotonergic activity in the hippocampus of ovariectomized rats under forced swimming stress. *Biosci Biotechnol BiochemBiosci. Biotechnol. Biochem.* 74(10): 2005-2010.
- Kandel, R.E., Schwartz, H.J. 1991. Principles of neural science. 2a ed. Elseiver Science Publisshing Co. pp720-724.
- Katz, R.J. 1982. Animal model of depression: pharmacological sensibility of a hedonic deficit. *Pharma. Biochem. Behav.* 16: 965-968.
- Kaufman, K.R., Kelly, M.J., Roselli, C.E. 2013. Rapid effects of 17 β -estradiol on male copulatory behaviors are not elicited by the novel membrane active estrogenic compound STX. *Behav. Neurosci.* 127(4): 598-605.
- Kendall, D.A., Stancel, G.M., Enna, S.J. 1982. The influence of sex hormones on antidepressant-induced alterations in neurotransmitter receptor binding. *J. Neurosci.* 2: 354-360.
- Kepser, L.J., Homberg, J.R. 2014. The neurodevelopmental effects of serotonin: A behavioural perspective. *Behav. Brain. Res.* S0166-4328(14)00323-4. doi: 10.1016/j.bbr.2014.05.022.
- Kessler, R. C. 2003. Epidemiology of women and depression. *J. Affect. Disord.* 74: 5–13.
- Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K.R., Rush, A.J., Walters, E.E., Wang, P.S.; National Comorbidity Survey Replication. 2003. National Comorbidity Survey Replication. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA.* 289(23): 3095-3105.

- Kessler, R.C., McGonagle, K.A., Swartz, M., Blazer, D.G., Nelson, C.B. 1993. Sex and depression in the National Comorbidity Survey. I. Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. *J. Affect. Disord.* 29: 85–96.
- Kinney, G.G., Vogel, G.W., Feng, P. 1997. Deceased dorsal raphe nucleus neuronal activity in adult chloral hydrate anesthetized rats following neonatal clomipramine treatment: implications for endogenous depression. *Brain. Research.* 756: 68-75.
- Konkle, A.T., McCarthy, M.M. 2011. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology.* 152(1): 223-235.
- Koprowska, M., Krotewicz, M., Romaniuk, A., Strzelczuk, M. 2004. Age-related changes in fear behavior and regional brain monoamines distribution in rats. *Acta. Neurobiol. Exp.* 64(2):131-142.
- Krey, L.C., McGinnis, M.Y. 1990. Time-courses of the appearance/disappearance of nuclear androgen+ receptor complexes in the brain and adenohypophysis following testosterone/withdrawal to castrated male rats: Relationships with gonadotropin secretion. *J. Steroid. Biochem.* 35: 403-408.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol.* 138: 863-870.
- Kuiper, G.G.J.M., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.Å. 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, pp. 5925–5930.
- Kumar, P., Taha, A., Kale, R.K., Cowsik, S.M., Baquer, N.Z. 2011. Physiological and biochemical effects of 17 β estradiol in aging female rat brain. *Exp. Gerontol.* 46(7): 597-605
- Laflamme, N., Nappi, R.E., Drolet, G, Labrie, C., Rivest, S. 1998. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and ER β) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J. Neurobiol.* 36: 357-378.
- Lauder, J.M. 1990. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J. Comp. Neurol.* 155: 469-481.
- Le Poul, E., Laaris, N., Hamon, M., Lanfumey, L. 1997. Fluoxetine-induced desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors is independent of glucocorticoid(s). *Synapse.* 27(4): 303-312.

- Lemini-Guzman, C., Jimenez-Orozco, A., Canchola-Martinez, E. 2008. En: Mendoza-Patiño N. Farmacología Médica. Ed Medica panamericana, México. 409-418.
- Lesch, K.P., Mayer, S., Disselkamp-Tietze, J., Hoh, A., Wiesmann, M., Osterheider, M., Schulte, H.M. 1990. 5-HT_{1A} receptor responsivity in unipolar depression. Evaluation of ipsapirone-induced ACTH and cortisol secretion in patients and controls. *Biol. Psychiatry*. 28(7): 620-628.
- Li, Q., Muma, A., Van de Kar, L. 1996. Chronic fluoxetine induces a gradual desensitization of 5-HT_{1A} receptors: reductions in hypothalamic and midbrain Gi and G₀ proteins and in neuroendocrine responses to 5-HT_{1A} agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 1035-1042.
- Li, W., Li, Q.J., An, S.C. 2010. Preventive effect of estrogen on depression-like behavior induced by chronic restraint stress. *Neurosci. Bull.* 2:140-146.
- Limón-Morales, O., Soria-Fregozo, C., Arteaga-Silva, M., Hernández-González, M., Vázquez-Palacios, G., Bonilla-Jaime, H. 2014b. Hormone replacement with 17 β -estradiol plus dihydrotestosterone restores male sexual behavior in rats treated neonatally with clomipramine. Aceptado en *Hormones and Behavior*.
- Limón-Morales, O., Soria-Fregozo, C., Arteaga-Silva, M., Vázquez-Palacios, G., Bonilla-Jaime, H. 2014a. Altered expression of 5-HT_{1A} receptors in adult rats induced by neonatal treatment with clomipramine. *Physiol. Behav.* 124:37-44.
- López-Figueroa, A.L., Norton, C.S., López-Figueroa, M.O., Armellini-Dodel, D., Burke, S., Akil, H., López, J.L., Watson, S.J. 2004. Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} Receptor mRNA Expression in Subjects with Major Depression, Bipolar, Disorder, and Schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 55: 225-233.
- Lopez-Rubalcava, C., Lucki, I. 2000. Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacol.* 22:191–199.
- Lu, N.Z., Bethea, C.L. 2002. Ovarian steroid regulation of 5-HT_{1A} receptor binding and G protein activation in female monkeys. *Neuropsychopharmacol.* 27: 12–24.
- Lu, N.Z., Eshleman, A.J., Janowsky, A., Bethea, C.L. 2003. Ovarian steroid regulation of serotonin reuptake transporter (SERT) binding, distribution, and function in female macaques. *Mol. Psychiatry*. 8(3): 353-360.
- Lucio, R.A., Tlachi-López, J.L. 2008. Análisis de la cópula y el eyaculado en la rata albina (*Rattus norvegicus*): Manual de laboratorio. Tlaxcala, México: Universidad Autónoma de Tlaxcala. pp. 11-25.
- Lucki, I., 1997. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav. Pharmacol.* 8: 432-.523.

- Lucki, I., Singh, A., Kreiss, D. 1994. Behavioral studies of serotonin receptor agonist as antidepressant drugs. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 85-95.
- Lucki, I., Wieland, S. 1990. 5-Hydroxytryptamine_{1A} receptors and behavioral responses. *Neuropsychopharmacology*. 3(5-6): 481-493.
- Lydell, K., Doty, R.L. 1972. Male rat of odor preferences for female urine as a function of sexual experience, urine age, and urine source. *Horm. Behav.* 3(3): 205-312.
- Machado, A., Cano, J., Santiago, M. 1986. The change with age in biogenic amines and their metabolites in the striatum of the rat. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 5(4): 333-342.
- Maciag, D., Coppinger, D., Paul, I.A. 2006. Evidence that the deficit in sexual behavior in adult rats neonatally exposed to citalopram is a consequence of 5-HT₁ receptor stimulation during development. *Brain. Res.* 1125(1): 171-175.
- MacQueen, G.M., Campbell, S., McEwen, B.S., Macdonald, K., Amano, S., Joffe, R.T., Nahmias, C., Young, L.T. 2003. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100: 1387-1392.
- Maes, M., Leonard, B.E., Myint, A.M., Kubera, M., Verkerk, R. 2011. The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 35(3):702-721.
- Maes, M., Meltzer, H.Y. 1995. The serotonin hypothesis of major depression. Selected chapters on mood disorders. Edn: Bloom F, Kupfer D, editors. *Psychopharmacology, the fourth generation of progress.* Raven Press. pp. 933–944.
- Malberg, J.E., Schechter, L.E., 2005. Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs, *Curr. Pharm. Des.* 11: 145-155.
- Manji, H.K., Drevets, W.C., Charney, D.S. 2001. The cellular neurobiology of depression. *Nature Medicine.* 7(5): 541-547.
- Marino, M., Galluzzo, P., Ascenzi, P. 2006. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr. Genomics.* 7(8):497-508.
- Martin, P., Beninger, R., Hamon, M., Puech, A. 1990. Antidepressant like action of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A} agonist, in the learned helplessness paradigm: evidence for a postsynaptic mechanism. *Behav. Brain. Res.* 38: 135-144.

- Martínez-Mota, L., Cruz-Martínez, J.J., Márquez-Baltazar, S., Fernández-Guasti, A. 2008. Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88(3): 332-340.
- Martínez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., Lopez-Rubalcava, C. 2002. Indorenate produces antidepressant-like actions in the rat forced swimming test via 5-HT1A receptors. *Psychopharmacol.* 165: 60-66.
- Martínez-Mota, L., Fernández-Guasti, A. 2004. Testosterone-dependent antidepressant-like effect of noradrenergic but not of serotonergic drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78(4): 711-718.
- Mathers, C.D., Iburg, K.M., Salomon, J.A., Tandon, A., Chatterji, S., Ustun, B. and Murray, C.J. 2004. Global patterns of healthy life expectancy in the year 2002. *BMC. Public. Health.* 4: 66.
- Matthews, J., Wihlen, B., Tujague, M., Wan, J., Strom, A., Gustafsson, J.Å.: 2006. Estrogen receptor (ER) beta modulates ER-alpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Mol. Endocrinol.* 20:534–543.
- Mayorga, A.J., Dalvi, A., Page, M.E., Zimov-Levinson, S., Hen, R., Lucki, I. 2001. Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-hydroxytryptamine(1B) receptor mutant mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298(3):1101-1107.
- Mazer, C., Muneyyirci, J., Taheny, K., Raio, N., Borella, A., Whitaker-Azmitia, P. 1997. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain. Res.* 760: 68-73.
- Mazza, J.J., Fleming, C.B., Abbott, R.D., Haggerty, K.P., Catalano, R.F. 2010. Identifying trajectories of adolescents' depressive phenomena: an examination of early risk factors. *J. Youth. Adolesc.* 39(6):579-93.
- Mc Laren, L. 2004. *Cómo Entender y Aliviar la Depresión.* Grupo Editorial Tomo. México. pp 15-21.
- McCarthy, M.M. 2008. Estradiol and the developing brain. *Physiol. Rev* 2008.; 88: 91–124.
- McCarthy, M.M., Auger, A.P., Perrot-Sinal, T.S. 2002. Getting excited about GABA and sex differences in the brain. *Trends. Neurosci.* 25: 307-312.

- McCormick, C.M., Green, M.R., Cameron, N.M., Nixon, F., Levy, M.J., Clark, R.A. 2013. Deficits in male sexual behavior in adulthood after social instability stress in adolescence in rats. *Horm. Behav.* 63(1):5-12.
- McEwen, B.S. 1991. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Tips Reviews* 12: 141-147.
- McEwen, B.S. 2001. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 933:265-77.
- McEwen, B.S., Alves, S.E. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr. Rev.* 20(3): 279-307.
- McGinnis, M.Y., Dreifuss, R.M. 1989. Evidence for a role of testosterone-androgen receptor interactions in mediating masculine sexual behavior in male rats. *Endocrinol.* 124(2):618-626.
- McHenry, J.A., Bell, G.A., Parrish, B.P., Hull, E.M. 2012. Dopamine D1 receptors and phosphorylation of dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein-32 in the medial preoptic area are involved in experience-induced enhancement of male sexual behavior in rats. *Behav. Neurosci.* 126(4):523-529.
- McIntosh, T.K., Barfield, R.J. 1984. Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. I. Serotonin and the postejaculatory refractory period. *Behav. Brain. Res.* 12: 255-256.
- Meisenzahl, E.M., Seifert, D., Bottlender, R., Teipel, S., Zetsche, T., Jäger, M., Koutsouleris, N., Schmitt, G., Scheuerecker, J., Burgermeister, B., Hampel, H., Rupprecht, T., Born, C., Reiser, M., Möller, H.J., Frodl, T. 2010. Differences in hippocampal volume between major depression and schizophrenia: a comparative neuroimaging study. *Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci.* 260(2): 127-137
- Meltzer, H.Y., Martin, T.L. 1987. The serotonin hypothesis of depression. En: Herbert y Meltzer HY. *Psychopharmacology: The third generation of progress.* Ed. Raven Press pp. 513-525.
- Michelsen, K.A., Prickaerts, J., Steinbusch, H.W. 2008. The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Prog. Brain. Res.* 172:233-64. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00912-6.
- Míguez, J.M., Aldegunde, M., Paz-Valiñas, L., Recio, J., Sánchez-Barceló, E. 1999. Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. *J. Neural. Transm.* 106(11-12):1089-1098.

- Milner, T.A., Ayoola, K., Drake, C.T., Herrick, S.P., Tabori, N.E., McEwen, B.S., Warriar, S., Alves, S.E. 2005. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 491(2):81-95.
- Mirmiran, M., Van de Poll, N.E., Comer, H.G., Van Oyen, H., Boer, G. 1981. Supresion of active sleep by chronic treatment with clomipramine during early postnatal development: effect on adult sleep and behavior in rat. *Brain. Res.* 204: 129-146.
- Mize, A., Poisner, A., Alper, R. 2001. Estrogens act in rat hippocampus and frontal cortex to produce rapid, receptor mediated decreases in serotonin 5-HT1A receptor function. *Neuroendocrinology* 73: 166-174.
- Mizuta, T., Segawa, T. 1988. Chronic effects of imipramine and lithium on postsynaptic 5-HT1A and 5-HT1B sites and on presynaptic 5-HT3 sites in rat brain. *Jpn. J. Pharmacol.* 47(2):107-113.
- Morali, G. 1998. Regulación hormonal de la conducta sexual masculina. En: Velázquez-Moctezuma J. *Biología de la reproducción* pp. 399-417.
- Morali, G., Larsson, K., Beyer, C. 1977. Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by aromatase blockers. *Horm. Behav.* 9(3):203-213.
- Moretti, J.L., Cinotti, L., Cesaro, P., Defer, G., Joulin, Y., Sergent, A., Vigneron, N., Rapin, J.R., Raynaud, C. 1987. Amines for brain tomoscintigraphy. *Nucl Med Commun.* 8(7):581-595.
- Mufson, E.J., Lavine, N., Jaffar, S., Kordower, J.H., Quirion, R., Saragovi, H.U. 1997. Reduction in p140-TrkA receptor protein within the nucleus basalis and cortex in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 146(1):91-103.
- Murray, J.F., Dakin, C.L., Siddiqui, A., Pellatt, L.J., Ormerod, L.J.A., Swan, A.V., Davies, D.C., Wilson, C.A. 2004. Neonatal 5HT activity antagonizes the masculinizing effect of testosterone on the luteinizing hormone release response to gonadal steroids and on brain structures in rats. *Eur. J. Neurosci.* 19: 387–395.
- Naftolin, F., Horvath, T.L., Jakab, R.L., Leranth, C., Harada, N., Balthazart, J. 1996. Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate brain: an immunocytochemical study on quail, rat, monkey and human tissues. *Neuroendocrinol.* 63: 149-155.
- Neill, D., Vogel, G., Hagler, M., Kors, D., Hennessey, A. 1990. Diminished sexual activity in a new model of endogenous depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14: 73-76.
- Nilsson, S., Gustafsson, J.Å. 2011. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89(1): 44-55.

- Nojima, D., Li, L.C., Dharia, A., Perinchery, G., Ribeiro-Filho, L., Yen, T.S., Dahiya, R.: 2001. CpG hypermethylation of the promoter region inactivates the estrogen receptor-beta gene in patients with prostate carcinoma. *Cancer* 92(8):2076–2083.
- Nomura, M., Korach, K.S., Pfaff, D.W., Ogawa, S. 2003. Estrogen receptor beta (ERbeta) protein levels in neurons depend on estrogen receptor alpha (ERalpha) gene expression and on its ligand in a brain region-specific manner. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 110(1): 7-14.
- Noriega-Reyes, M.Y., Langlely-McCarron, E. 2008. Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología.*, 3:29-40.
- Ogawa, S., Chan, J., Chester, A.E., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., Pfaff, D.W. 1999. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor β gene-deficient (β ERKO) male and female mice. *PNAS.* 96(22): 12887-12892.
- Ohno, Y. 2010. New insight into the therapeutic role of 5-HT1A receptors in central nervous system disorders. *Cent. Nerv. Syst. Agents. Med. Chem.* 10(2):148-57.
- OMS. World Health Organization: WHO. 2008. The global burden of disease: 2004 update. Part 4: 43-48.
- O'Reilly, K.C., Alarcon, J.M., Ferbinteanu, J. 2014. Relative contributions of CA3 and medial entorhinal cortex to memory in rats. *Front. Behav. Neurosci.* 28(8): 292.
- Organización Mundial de la Salud: OMS. (2006), "Informe de salud en el mundo", en *Salud Mental: Nuevos conocimientos, nuevas esperanzas.*, Ginebra. 29-30.
- Organización Mundial de la Salud: OMS. CIE 10. 1992. CIE 10: Décima Revisión de la Clasificación Internacional de Las Enfermedades. *Trastornos Mentales y del Comportamiento: Descripciones Clínicas y pautas para el Diagnóstico.* Madrid: Meditor.; 1992.
- Ormel, J., Petukhova, M., Chatterji, S., Aguilar-Gaxiola, S., Alonso, J., Angermeyer, M.C., Bromet, E.J., Burger, H., Demyttenaere, K., de Girolamo, G., Haro, J.M., Hwang, I., Karam, E., Kawakami, N., Lépine, J.P., Medina-Mora, M.E., Posada-Villa, J., Sampson, N., Scott, K., Ustün, T.B., Von Korff, M., Williams, D.R., Zhang, M., Kessler, R.C. 2008. Disability and treatment of specific mental and physical disorders across the world. *Br. J. Psychiatry* 192(5):368-375.
- Ortega-Corona, B.G., Valencia-Sanchez, A., Kubli-Garfias, C., Anton-Tay, F., Salazar, L.A., Villarreal, J.E., Ponce-Monter, H. et al. 1994. Hypothalamic monoamine oxidase activity in ovariectomized rats after sexual behavior restoration., *Arch. Med. Res.* 25: 337–340.

- Osterlund, M., Overstreet, D., Hurd, Y. 1999. The flinders sensitive line rats, a genetic model of depression, show abnormal serotonin receptor mRNA expression in the brain that is reversed by 17 β -estradiol. *Mol. Brain. Res.* 74: 154- 166.
- Ostlund, H., Keller, E., Hurd, Y.L. 2003. Estrogen receptor gene expression in relation to neuropsychiatric disorders. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1007: 54-63.
- Ostlund, H., Keller, E., Hurd, Y.L. 2003. Estrogen receptor gene expression in relation to neuropsychiatric disorders. *Ann. N Y. Acad. Sci.*1007:54-63.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J., Scanlan, T.S. 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science.* 277(5331):1508-1510.
- Pan, A., Sun, Q., Okereke, O.I., Rexrode, K.M., Hu, F.B. 2011. Depression and risk of stroke morbidity and mortality: a meta-analysis and systematic review. *JAMA.* 306(11):1241-1249.
- Parks, C. L., Robinson, P. S., Sibille, E., Shenk, T. Toth, M. 1998. Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(10): 734 –739.
- Paup, D.C., Mennin, S.P., Gorski, R.A. 1975. Androgen- and estrogen-induced copulatory behavior and inhibition of luteinizing hormone (LH) secretion in the male rat. *Horm. Behav.* 6(1):35-46.
- Paxinos, G., Watson, C. 2005. *The rat brain in stereotaxic coordinates: the new coronal set-161 diagrams.* San Diego: Academic Press.
- Payne, J.L. 2003. The role of estrogen in mood disorders in women. *Int. Rev. Psychiatry.* 15: 280–290.
- Pérez, S.E., Chen, E.Y., Mufson, E.J. 2003. Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 145(1):117-139.
- Perlman, W.R., Tomaskovic-Crook, E., Montague, D.M., Webster, M.J., Rubinow, D.R., Kleinman, J.E., Weickert, C.S. 2005. Alteration in estrogen receptor alpha mRNA levels in frontal cortex and hippocampus of patients with major mental illness. *Biol. Psychiatry.* 58(10):812-824.
- Phillips-Farfán, B.V., Fernández-Guasti, A. 2009. Endocrine, neural and pharmacological aspects of sexual satiety in male rats. *Neurosc. Behav. Res.* 33: 442-455.
- Polter, A.M., Li, X. 2010. 5-HT1A receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cell. Signal.* 22(10): 1406-1412.

- Popova, N.K., Amstislavskaya, T.G. 2002. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonin receptors differentially modulate mouse sexual arousal and the hypothalamo-pituitary-testicular response to the presence of a female. *Neuroendocrinology*. 76(1):28-34.
- Portillo, W., Castillo, C.G., Retana-Márquez, S., Roselli, C.E., Paredes, R.G. 2007. Neuronal activity of aromatase enzyme in non-copulating male rats. *J. Neuroendocrinol.* 19(2):139-141.
- Portillo, W., Diaz, N.F., Cabrera, E.A., Fernandez-Guasti, A., Paredes, R.G. 2006. Comparative analysis of immunoreactive cells for androgen and oestrogen receptor alpha in copulating and non-copulating male rats. *J. Neuroendocrinol.* 18:168–176.
- Portillo, W., Paredes, R.G. 2003. Sexual and olfactory preference in noncopulating male rats. *Physiol. Behav.* 80(1):155-162.
- Portillo, W., Paredes, R.G. 2009. Conditioned place preference induced by morphine in non-copulating male rats. *Behav. Brain. Res.* 203(2):308-311.
- Prossnitz, E.R.1, Oprea, T.I., Sklar, L.A., Arterburn, J.B. 2008. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 109(3-5):350-353.
- Purba, J.S., Hoogendijk, W.J., Hofman, M.A., Swaab, D.F.1996. Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch. Gen. Psychiatry.* 53: 137-143.
- Putman, S.K., Sato, S., Hull, E.M. 2003. Hormonal maintenance of copulation in castrates: association with extracellular dopamine in MPOA. *Horm. Behav.* 44: 419-426.
- Raadsheer, F.C., Hoogendijk, W.J., Stam, F.C., Tilders, F.J., Swaab, D.F. 1994. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinol.* 60(4):436-444.
- Ramirez, V.D., Zheng, J., Siddique, K.M. 1996. Membrane receptors for estrogen, progesterone, and testosterone in the rat brain: fantasy or reality. *Cell. Mol. Neurobiol.* 16(2):175-198.
- Rapport, M.M., Green, A.A., Page, I.H. 1948. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 176(3):1243-1251.
- Rausch, J.L., Stahl, S.M., Hauger, R.L. 1990. Cortisol and growth hormone responses to the 5-HT_{1A} agonist gepirone in depressed patients. *Biol. Psychiatry.* 28(1):73-78.
- Récamier-Carballo, S., Estrada-Camarena, E., Reyes, R., Fernández-Guasti, A. 2012. Synergistic effect of estradiol and fluoxetine in young adult and middle-aged female rats in two models of experimental depression. *Behav. Brain. Res.* 233(2): 351-358.

- Richardson-Jones, J. W., Craige, C.P., Nguyen, T.H., Kung, H.F., Gardier, A.M., Dranovsky, A., David, D.J., Guiard, B.P., Beck, S.G., Hen, R., Leonardo, E.D. 2011. Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J. Neurosci.* 31, 6008–6018.
- Rissman, E.F., Wersinger, S.R., Fugger, H.N., Foster, T.C. 1999. Sex with knock out models: behavioral studies of estrogen receptor α . *Brain. Res.* 835: 80-90.
- Robichaud, M., Debonnel, G. 2005. Oestrogen and testosterone modulate the firing activity of dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in both male and female rats. *J. Neuroendocrinol* 17: 179–185.
- Robinson, M., Edwards, S.E., Iyengar, S., Bymaster, F., Clark, M., Katon, W. 2009. Depression and pain. *Front. Biosci. Frontiers in Bioscience* 14: 5034-5051.
- Rocha, B.A., Fleischer, R., Schaeffer, J.M., Rohrer, S.P., Hickey, G.J. 2005. 17 beta estradiol-induced antidepressant-like effect in the forced swim test is absent in estrogen receptor-beta knockout (B ERKO) mice. *Psychopharmacol.* 179:637-643.
- Rochira, V., Granata, A.R.M., Madeo, B., Zirilli, L., Rossi, G., Carani, C. 2005. Estrogens in male: what have we learned in the last 10 years? *Asian. J. Androl.* 7 (1): 3-20.
- Romano-Torres, M., Fernandez-Guasti, A. 2010. Estradiol valerate elicits antidepressant-like effects in middle-aged female rats under chronic mild stress. *Behav. Pharmacol* 21:104–111.
- Roselli, C.E., Cross, E., Poonyagariyagorn, H.K., Stadelman, H.L. 2003. Role of aromatization in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in male rats. *Horm. Behav.* 44: 146-151.
- Roselli, C.E., Horton, L.E., Resko, J.A. 1985. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinol*, 117: 2471–2477.
- Rudolph, L.M., Sengelaub, D.R. 2013. Castration-induced upregulation of muscle ER α supports estrogen sensitivity of motoneuron dendrites in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Dev. Neurobiol.* 73(12):921-35.
- Rush, A.J., Trivedi, M.H., Wisniewski, S.R., Nierenberg, A.A., Stewart, J.W., Warden, D., Niederehe, G., Thase, M.E., Lavori, P.W., Lebowitz, B.D., McGrath, P.J., Rosenbaum, J.F., Sackeim, H.A., Kupfer, D.J., Luther, J., Fava, M. 2006. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am. J. Psychiatry* 163:1905-1917.

- Sacher, J., Wilson, A.A., Houle, S., Rusjan, P., Hassan, S., Bloomfield, P.M., Stewart, D.E., Meyer, J.H. 2010. Elevated brain monoamine oxidase A binding in the early postpartum period. *Arch. Gen. Psychiatry*. 67(5):468-474.
- Sacher, J., Wilson, A.A., Houle, S., Rusjan, P., Hassan, S., Bloomfield, P.M., Stewart, D.E., Meyer, J.H. 2010. Elevated brain monoamine oxidase A binding in the early postpartum period. *Arch. Gen. Psychiatry* 67(5): 468-474.
- Sanchez, R.L., Reddy, A.P., Centeno, M.L., Henderson, J.A., Bethea, C.L. 2005. A second tryptophan hydroxylase isoform, TPH-2 mRNA, is increased by ovarian steroids in the raphe region of macaques. *Brain. Res. Mol. Brain. Res* 135; 194–203.
- Sandanger, I., Nygard, J.F., Ingebrigsten, G., Sorensen, T., Dalgard, O.S. 1999. Prevalence, incidence and age at onset of psychiatric disorders in Norway. *Soc. Psychiatry. Psychiatr. Epidemiol.* 34: 570-579.
- Savitz, J., Lucki, I., Drevets, W.C. 2009. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog. Neurobiol.* 88(1):17-31.
- Schildkraut, J.J., Gordon, E.K., Durell, J. 1965. Catecholamine metabolism in affective disorders. I. Normetanephrine and VMA excretion in depressed patients treated with imipramine. *J. Psychiatr. Res.* 3(4): 213-228.
- Schneider L, Small G, Hamilton S, Bystrisky A, Nemeroff C, Meyers B. Estrogen replacement and response to fluoxetine in surgically menopauseal women. *Am J Geriatr Psychiatr.* 1997; 5: 97–106.
- Schneider, L., Small, G., Hamilton, S., Bystrisky, A., Nemerof, C., Meyers, B. 1997. Estrogen replacement and response to fluoxetine in surgically menopauseal women. *Am. J. Geriatr. Psychiatr.* 5: 97-106.
- Schreiber, R., De Vry, J. 1993. Neuroanatomical basis for the antidepressant-like effects of the 5-HT(1A) receptor agonists 8-OH-DPAT and ipsapirone in the rat forced swimming test. *Behav. Pharmacol.* 4(6): 625-636.
- Schweiger, U., Deuschle, M., Weber, B., Körner, A., Lammers, C.H., Schmider, J., Gotthardt, U., Heuser, I. 1999. Testosterone, gonadotropin, and cortisol secretion in male patients with major depression. *Psychosom. Med.* 61(3): 292-296.
- Sell, S.L., Craft, R.M., Seitz, P.K., Stutz, S.J., Cunningham, K.A., Thomas, M.L. 2008. Estradiol-sertraline synergy in ovariectomized rats. *Psychoneuroendocrinol.* 33:1051–1060.
- Seredynski, A.L., Balthazart, J., Christophe, V.J., Ball, G.F., Cornil, C.A. 2013. Neuroestrogens rapidly regulate sexual motivation but not performance. *J Neurosci* 2; 33(1):164-174.

- Sharp, T., Cowen, P.J. 2011. 5-HT and depression: is the glass half-full? *Curr. Opin. Pharmacol.* 11(1):45-51.
- Sheline, Y.I., Sanghavi, M., Mintun, M.A., Gado, M.H. 1999. Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J. Neurosci.* 19: 5034-5043.
- Sherwin, B.B. 2009. Estrogen therapy: is time of initiation critical for neuroprotection? *Nat. Rev. Endocrinol.* 5(11):620–27.
- Shors, T.J., Leuner, B. 2003. Estrogen-mediated effects on depression and memory formation in females. *J. Affect. Disord.* 74 (1):85-96.
- Shughrue, P.J. 1998. Estrogen action in the estrogen receptor alpha-knockout mouse: is this due to ER-beta? *Mol Psychiatry.* 3(4):299-302.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., Merchenthaler, I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388: 507–525.
- Shughrue, P.J., Stumpf, W.E., MacLusky, N.J., Zielinski, J.E., Hochberg, R.B. 1990. Developmental changes in estrogen receptors in mouse cerebral cortex between birth and postweaning: studied by autoradiography with 11 beta-methoxy-16 alpha-[125I]iodoestradiol. *Endocrinol.* 126: 1112–1124.
- Shupnik, M. A. 2002. Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamic-pituitary axis. *J. Neuroendocrinol.* 14: 85–94.
- Simerly, R.B. 2002. Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Ann. Rev. Neurosci.* 25: 507-536.
- Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L.W. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat bra: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294; 76–95.
- Simoncini, T., Genazzani, A.R. 2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur. J. Endocrinol.* 148: 281-292.
- Simpkins, J.W., Mueller, F.P., Huang, H.H., Meites, J.J. 1977. Evidence for depressed catecholamine and enhanced serotonin metabolism in aging male rats: possible relation to gonadotropin secretion. *Endocrinol.* 100: 1672-1678.
- Simpson, E.R. 2003. Sources of estrogen and their importance. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 86, 225–230.

- Sleight, A.J., Marsden, C.A., Palfreyman, M.G., Mir, A.K., Lovenberg, W. 1988. Chronic MAO A and MAO B inhibition decreases the 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 154(3): 255-261.
- Soares, C.N., Almeida, O.P., Joffe, H., Cohen, L.S. 2001. Efficacy of estradiol for the treatment of depressive disorders in perimenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arch. Gen.* 58: 529–534.
- Spiteri, T., Ágmo, A. 2006. Modèles précliniques du désir sexuel. *Sexologies.* 15: 241–249.
- Stahl, S. 1998. Basic psychopharmacology of antidepressants. Part 2: estrogen as an adjunct to antidepressant treatment. *J. Clin. Psychiat.* 59: 15-24.
- Stahl, S.M. 2002. Psicofarmacología esencial de la depresión y trastorno bipolar. Ed. Ciencias médicas. pp 192.
- Stahl, S.M., Lee-Zimmerman, C., Cartwright, S., Morrisette, D.A. 2013. Serotonergic drugs for depression and beyond. *Curr. Drug. Targets.* 14(5): 578-585.
- Steckelbroeck, S., Watzka, M., Stoffel-Wagner, B., Hans, V.H., Redel, L., Clusmann, H., Elger, C.E., Bidlingmaier, F., Klingmüller, D. 2001. Expression of the 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 mRNA in the human brain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171(1-2):165-8.
- Stern, J.J. 1970. Responses of male rats to sex odors. *Physiol. Behav.* 5: 519–524.
- Stockmeier, C.A., Shapiro, L.A., Dilley, G.E., Kolli, T.N., Friedman, L., Rajkowska, G. 1998. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *The Journal of Neuroscience* 18 (18): 7394-7401.
- Summer, B.E. Fink, G. 1998. Testosterone as well estrogen increases serotonin 2A receptor mRNA and binding site densities in the male rat brain. *Mol. Brain. Res.* 59: 205-214.
- Székely-Pardo, M. 2008. 1a Encuesta Nacional Exclusión, Intolerancia y Violencia en Escuelas Públicas de Educación Media Superior. Secretaria de Educación Pública. México.
- Taziaux, M., Keller, M., Bakker, J., Balthazart, J. 2007. Sexual behavior activity tracks rapid changes in brain estrogen concentrations. *J. Neurosci.* 27(24): 6563-6572.
- Timiras, P.S., Choy, V.J., Hudson, D.B. 1982. Neuroendocrine pacemaker for growth, development and ageing. *Age. Ageing.* 11(2): 73-88.
- Trakhtenberg, E.F., Goldberg, J.L. 2012. The role of serotonin in axon and dendrite growth. *Int. Rev. Neurobiol.* 106,105-26.

- Trucco, M. 2002. Stress and mental disorders: neurobiological and psychosocial aspects. *Rev. Chil. Neuro-psiquiatr.* 40(2): 4-19. Versión en línea: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071792272002000600002&script=sci_arttext&tlng=e
- Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., Nestler, E.J. 2007. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8(5):355-367.
- Underwood, M.D., Khaibulina, A.A., Ellis, S.P., Moran, A., Rice, P.M., Mann, J.J., Arango, V. 1999. Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. *Biol. Psychiatry.* 46: 473-483.
- Usall, J., Coromina, M., Araya, S., Ochoa, S. 2011. Effect of raloxifene (a Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM)) as coadjuvant to antidepressant treatment: A case report. *Actas. Esp. Psiquiatr.* 39(5): 334-336.
- Vagell, M.E., McGinnis, M.Y. 1997. The role of aromatization in the restoration of male rat reproductive behavior. *J. Neuroendocrinol.* 9: 415-421.
- Van de Kar, L.D. 1989. Neuroendocrine aspects of the serotonergic hypothesis of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 13: 237-246.
- Van der Does, A.J. 2001. The effects of tryptophan depletion on mood and psychiatric symptoms. *J. Affect. Disord.* 64(2-3):107-119.
- Vázquez-Palacios, G., Bonilla-Jaime, H., Velázquez-Moctezuma, J. 2005. Antidepressant effects of nicotine and fluoxetine in an animal model of depression induced by neonatal treatment with clomipramine. *Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 29: 39-46.
- Vega- Matuszczyk, J., Larsson, K., Eriksson, E. 1998. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sexual motivation in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60(2): 527-532.
- Velazquez-Moctezuma, J., Díaz, R.O. 1992. Neonatal treatment with clomipramine increased immobility in the forced swimming test: An attribute of animal models of depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42: 737.
- Venero, J.L., Machado, A., Cano, J. 1991. Turnover of dopamine and serotonin and their metabolites in the striatum of aged rats. *J. Neurochem.* 56(6): 1940-1948.
- Videbech, P., Ravnkilde, B. 2004. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am. J. Psychiatry.* 161(11): 1957-1966.
- Vijayakumar, M., Meti, B.L. 1999. Alterations in the levels of monoamines in discrete brain regions of clomipramine induced animal model of endogenous depression. *Neurochem. Res.* 24: 345-349.

- Vogel W, Klaiber EL, Broverman DM. 1985. A comparison of the antidepressant effects of a synthetic androgen (mesterolone) and amitriptyline in depressed men. *J Clin. Psychiatry.* 46(1): 6-8.
- Vogel, G., Hagler, M., Hennessey, A., Richard, C. 1996. Dose-dependent decrements in adult male rat sexual behavior after neonatal clorimipramine treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54(3): 605-609.
- Vogel, G., Neill, D., Hagler, M., Kors, D. 1990b. A new animal model of endogenous depression: A summary of present findings. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14: 85-91.
- Vogel, G., Neill, D., Hagler, M., Kors, D., Hartley, P. 1990c. Decreased intracranial self-stimulation in a new animal model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14: 65-68.
- Vogel, G., Neill, D., Kors, D., Hartley, P. 1990d. REM sleep abnormalities in a new animal model of endogenous depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14: 77-83.
- Vogel, G., Vogel, F.A. 1982. A new animal model of human endogenous depression. *Sleep. Res.* 11: 222.
- Vogel, G.W., Buffenstein, A., Minter, K., Hennessey, A. 1990a. Drugs effects on REM sleep and endogenous depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14: 49-63.
- Vogel, G.W., Thurmond, A., Gibbons, P., Sloan, K., Boyd, M., Walker, M. 1975. REM sleep reduction effects on depression syndromes. *Arch. Gen. Psychiatry.* 32: 765-777.
- Wagner GJ, Rabkin JG, Rabkin R. A comparative analysis of standard and alternative antidepressants in the treatment of human immunodeficiency virus patients. *Compr. Psychiatry.* 37:402-408.
- Walf, A.A., Frye, C.A. 2010. Raloxifene and/or estradiol decrease anxiety-like and depressive-like behavior, whereas only estradiol increases carcinogen induced tumorigenesis and uterine proliferation among ovariectomized rats. *Behav. Pharmacol.* 21: 231-240.
- Walf, A.A., Rhodes, M.E., Frye, C.A. 2004. Antidepressant effects of ER betas selective estrogen receptor modulators in the forced swim test. *Pharmacol Biochem. Behav.* 78: 523-529.
- Wang, S., Zhang, Z., Guo, Y., Teng, G., Chen, B. 2009. Decreased expression of serotonin 1A receptor in dentate gyrus in association with chronic mild stress: A rat model of post-stroke depression. *Psychiatry. Res.* 170: 245-251.
- Watanabe, T., Nakai, Y. 1987. Electron microscopic cytochemistry of catecholaminergic innervation of LHRH neurons in the medial preoptic area of the rat. *Arch. Histol. Jpn.* 50(1): 103-112.

- Weiser, M.J., Foradori, C.D., Handa, R.J. 2008. Estrogen receptor beta in the brain, from form to function. *Brain. Res. Rev.* 57: 309–320.
- Weissman, M.M., Olfson, M. 1995. Depression in women, implications for health care research. *Science.* 269: 799–801.
- Whitaker-Azmitia, P.M. 1991. Role of serotonin and other neurotransmitter receptor in brain development: basis of developmental pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 553-561.
- Whitaker-Azmitia, P.M. 2005. Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *Int J Dev Neurosci.* 23(1):75-83.
- Whitaker-Azmitia, P.M., Azmitia, E.C. 1986. Autorregulation of fetal serotonergic neuronal development: Role of high affinity serotonin receptors. *Neurosc. Let.* 67: 307-312.
- Wilson, C.A., Gonzalez, I., Farabollini, F. 1992. Behavioral effects in adulthood of neonatal manipulation of brain serotonin levels in normal and androgenized females. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41(1): 91-98.
- Wilson, C.A., Gonzalez, M.I., Albonetti, M.E., Farabollini, F. 1998. En: Ellis, L. Ebertz, L. (Eds.). *The Involvement of Neonatal 5-HT Receptor-Mediated Effects on Sexual Dimorphism of Adult Behavior in the Rat. Males, females and behavior.* Praeger, Westport, USA, pp. 109-127.
- Wilson, M.E., Westberry, J.M., Prewitt, A.K. 2008. Dynamic regulation of estrogen receptor alpha gene expression in the brain: a role for promoter methylation? *Front. Neuroendocrinol.* 29:375–385.
- Yan, W., Wilson, C.C., Haring, J.H. 1997. 5-HT_{1A} receptors mediate the neurotrophic effect of serotonin on developing dentate granule cells. *Develop. Brain. Res.* 98 (2): 185-190.
- Yang, F.Z., Wu, Y., Zhang, W.G., Cai, Y.Y., Shi, S.X. 2010. Influence of estradiol on tryptophan hydroxylase and 5-hydroxytryptamine content in raphe nuclei of rats under forced swimming stress. *Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi.* 90(27): 1929-1932.
- Yau, J.L.W., Olsson, T., Noble, J., Seckl, J.R. 1999. Serotonin receptor subtype gene expression in the hippocampus of aged rats following chronic amitriptyline treatment. *Mol. Brain. Res.* 70: 282-287.
- Yavari, P., Vogel, G.W., Neill, D.B. 1993. Decreased raphe unit activity in a rat model of endogenous depression. *Brain. Res.* 611: 31-36.
- Yavarone, M.S., Shuey, D.L., Tamir, H., Sadler, T.W., Lauder. J.M. 1993. Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology.* 47: 573–584.

- Zhang, J.Q., Cai, W.Q., Zhou, D.S., Su, B.Y. 2002. Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats. *Brain Res.* 935(1-2): 73-80.
- Zhao, C., Fujinaga, R., Tanaka, M., Yanai, A., Nakahama, K., Shinoda, K. 2007. Region-specific expression and sex-steroidal regulation on aromatase and its mRNA in the male rat brain: immunohistochemical and in situ hybridization analyses. *J. Comp. Neurol.* 500(3): 557-573.

ANEXO I

Los animales utilizados para los tratamientos hormonales fueron castrados bajo anestesia con un coctel integrado por: xylazina [2.5 mg/kg], y ketamina [22 mg/kg] vía intraperitoneal. La rata fue rasurada en el área ventral, posteriormente se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm tanto en la piel como en el músculo. Los testículos fueron extraídos y removidos incluyendo el epidídimo y se ligaron los conductos espermáticos y vasos sanguíneos. Se verificó la orquidectomía contando los testículos después de cada cirugía. Se suturó el músculo y la piel a las ratas y se les colocó en una caja limpia para su recuperación (Ver Figura 17).

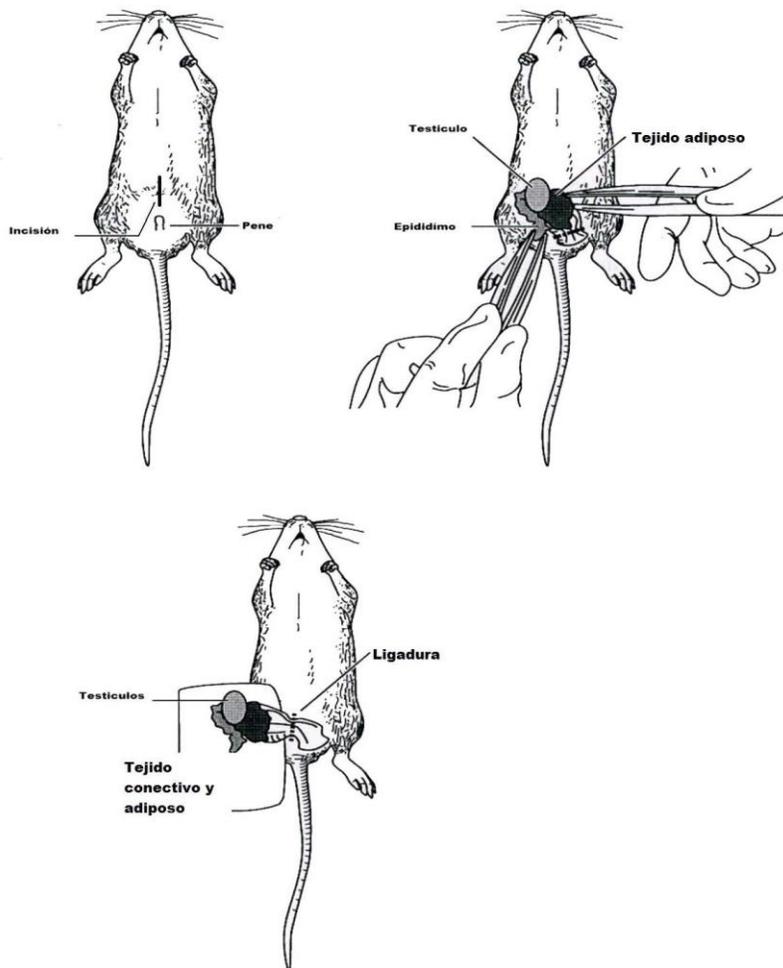


Figura 17. Procedimiento de orquidectomía. **A.** Se realiza una incisión de 1cm en el área ventral. **B.** Los testículos y la grasa asociada son extraídos con pinzas. **C.** Se realiza una ligadura alrededor de los conductos deferentes y la arteria testicular y se cortan los testículos y el tejido adiposo adyacente y posteriormente se suturan los tejidos.

ANEXO II

SOLUCIONES PARA PERFUSIÓN DE TEJIDOS E INMUNOHISTOQUIMICA

1.- Preparación de PBS 0.2 M (Buffer Fosfato Salino): 1.1 litros para soluciones 2, 3 y 4.

Disolver por separado:

- A) 6.05 gramos de Fosfato Monobásico de Potasio (KH_2PO_4) en 220 mililitros.
- B) 25.4 gramos de Fosfato Dibásico de Sodio (Na_2HPO_4) en 900 mililitros.

Tomar 209 ml de la solución A y 891 ml de la solución B.

Ajustar el pH a 7.4, Esta solución puede ser almacenada a temperatura ambiente.

* En caso de requerir solamente 1 litro o una fracción equivalente de PBS 0.2 M, preparar considerando las siguientes cantidades y calcular sus porcentajes; disolver por separado:

- A) 5.5 gramos de Fosfato Monobásico de Potasio (KH_2PO_4) en 200 mililitros.
- B) 25.4 gramos de Fosfato Dibásico de Sodio (Na_2HPO_4) en 900 mililitros.

Tomar 190 ml de la solución A y 810 ml de la solución B.

Ajustar el pH a 7.4, Esta solución puede ser almacenada a temperatura ambiente.

2.- Solución de Lavado Vascular para Perfusión, 1 Litro.

Disolver en agitación en 950 mililitros de agua destilada:

- A) 0.50 gramos de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3).
- B) 0.25 gramos de Cloruro de Potasio (KCl).
- C) 8.50 gramos de Cloruro de Sodio (NaCl).

Adicionar 50 mililitros de PBS 0.2 M.

Ajustar el pH a 7.4, conservar en refrigeración.

3.- Preparación de Paraformaldehído al 4%, 1 Litro.

Calentar 500 mililitros de agua destilada a 50-60°C y conservar la temperatura, agregar 40 gramos de Paraformaldehído más unas 8 gotas de Hidróxido de Sodio (NaOH), con

el propósito de facilitar la disolución, agitar durante 10 a 20 minutos, hasta que se transparente la solución, en caso de ser necesario agregan más gotas de NaOH.

Se enfría a 15°C y se agregan 500 mililitros de PBS 0.2 M.

Ajustar el pH a 7.4 y refrigerar a 4°C.

4.- Preparación de PBS 0.1 M (Buffer de Fosfatos en Solución Salina): 1 Litro**.

Disolver 8.5 gramos de Cloruro de Sodio (NaCl) en 500 mililitros de agua destilada.

Agregar posteriormente 500 mililitros de PBS 0.2 M.

Ajustar el pH a 7.4 y almacenar a 4°C.

5.- Peróxido de Hidrogeno al 3%

Diluir 300 µL de peróxido de Hidrogeno en 10 mL de agua destilada.

6.- Twin 20 al 0.1%

Diluir 100 µL de Twin 20 en 100 mL de PBS.

7.- BSA al 5%

10 mL de PBS-Twin 20 al 0.01% + 0.5 gr de BSA.

8.- Medio de montaje con gelatina para cortes en congelación

Mezclar 500 mL de agua destilada y 500 mL de etanol al 80% y calentarlos a 55 °C.

Posteriormente agregar 1 gramo de gelatina y mezclar con agitación continua. Enfriar a 4 °C.

ANEXO III



Altered expression of 5-HT1A receptors in adult rats induced by neonatal treatment with clomipramine



Ofelia Limón-Morales^a, Cesar Soria-Fregozo^b, Marcela Arteaga-Silva^c,
Gonzalo Vázquez-Palacios^d, Herlinda Bonilla-Jaime^{c,*}

^a Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa Apartado, Postal 55 535, C.P 09340 D.F. México, Mexico

^b Laboratorio de Psicobiología, Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara, Mexico

^c Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa Apartado, Postal 55 535, C.P 09340 D.F. México, Mexico

^d Colegio de Ciencia y Tecnología, Universidad Autónoma de la Ciudad de México-San Lorenzo Tezonco, Av. Prolongación San Isidro 151, Col. San Lorenzo Tezonco, Deleg. Iztapalapa CP 09790, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2012

Received in revised form 14 December 2012

Accepted 22 October 2013

Keywords:

5-HT1A receptor

Clomipramine

Depression

Forced swimming test

8-OH-DPAT

PCPA

RT-PCR

ABSTRACT

Chronic administration of clomipramine (CMI) to neonatal rats produces behaviors that resemble a depressive state in adulthood. Dysfunctions in the activity of the central nervous system's serotonergic function are important in understanding the pathophysiology of depression. The serotonin system is implicated in major depression and suicide and is negatively regulated by somatodendritic 5-HT1A autoreceptors. Desensitization of 5-HT1A autoreceptors is implicated in the long latency of some antidepressant treatments. Alterations in 5-HT1A receptor levels are reported in depression and suicide. In this study, we analyzed the effect of neonatal administration of CMI on the activity of 5-HT1A receptors, both pre- and post-synaptically, by administering an agonist of 5-HT1A receptors, 8-OH-DPAT, and then subjecting the rats to the forced swimming test (FST) a common procedure used to detect signs of depression in rats. Also measured were levels of the mRNA expression of 5-HT1A receptors in the dorsal raphe (DR), the hypothalamus and the hippocampus. Wistar rats were injected twice daily with CMI at doses of 15 mg kg⁻¹ or saline as vehicle (CON) via s.c. from postnatal day 8 for 14 days. At 3–4 months of age, one set of rats from each group (CON, CMI) was evaluated for the effect of a selective agonist to the 5-HT1A receptor subtype, 8-OH-DPAT, by testing in the FST. Also determined was the participation of the pre- or post-synaptic 5-HT1A receptor in the antidepressant-like action of 8-OH-DPAT. This involved administering an inhibitor of tryptophan hydroxylase, parachlorophenylalanine (PCPA), and pretreatment with 8-OH-DPAT before the FST test and to evaluate the rectal temperature and locomotor activity. The expression of the mRNA of the 5-HT1A receptors was examined in the dorsal raphe nucleus, the hypothalamus and the hippocampus using the semi-quantitative RT-PCR method. The results from this study corroborate that neonatal treatment with clomipramine induces a pronounced immobility in the FST when animals reach adulthood, manifested by a significant decrease in swimming behavior, though counts of climbing behavior were not modified. This effect was similar in magnitude when 8-OH-DPAT was administered to CON group. Furthermore, the administration of 8-OH-DPAT induces a significant and similar increase in rectal temperature and locomotor activity in both the CON as in the CMI group. Neonatal treatment with CMI resulted in a significant decrease in the expression of the mRNA of the 5-HT1A receptors in the DR (% more than vehicle) in adulthood. In the case of the postsynaptic receptors located in the hypothalamus and hippocampus, neonatal treatment with CMI induced a significant increase in the mRNA expression of the 5-HT1A receptors. These data suggest that neonatal treatment with CMI induces a downregulation of the mRNA of the 5-HT1A autoreceptors in the DR, and an increment in the expression of the postsynaptic 5-HT1A receptors. The results after the administration of PCPA and 8-OH-DPAT on FST, rectal temperature and locomotor activity for both groups suggest that the function of postsynaptic receptors remains unchanged. All together these data show that the depressive behavior observed in adulthood in this animal model may be associated with long-term alterations in the expression of the mRNA of the 5-HT1A receptors.

Crown Copyright © 2013 Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

It is currently estimated that 1 in 5 people will develop a major depressive episode at least once in their lifetime, making this one of the most recurrent and disabling diseases worldwide [1]. The occurrence

* Corresponding author at: Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, C.P. 09340 Iztapalapa, D.F. Mexico, Mexico. Tel.: +52 55 5804 4701; fax: +52 55 5804 4930.
E-mail address: bjh@xanum.uam.mx (H. Bonilla-Jaime).

of this condition has been strongly linked to changes in the function of the serotonergic system [2]. Especially, alterations in the 5-HT_{1A} receptor functions and levels have been implicated in mood disorders. In particular, 5-HT_{1A} receptors negatively regulate the activity of 5-HT neurons, and are expressed as both a presynaptic autoreceptor on raphe neurons and as a major postsynaptic receptor in the hippocampal, cortical and hypothalamic regions involved in mood, emotion and stress responses [3,4]. A general hypothesis regarding 5-HT in depression suggests that 5-HT_{1A} receptors may be downregulated, which can lead to a negligible occupation of the receptor by 5-HT to produce an appropriate physiological response [2,5,6]. It has also been shown that desensitization participates in the antidepressant effect of selective inhibitors of serotonin reuptake (SSRIs), such as fluoxetine [5,6]. In addition, it has been determined that both the number and expression of mRNA for 5-HT_{1A} receptors are altered in the ventrolateral nucleus of the hypothalamus [7], the dorsal raphe nuclei [8,9], the frontal cortex, and the amygdala [3,10–12] of suicide victims, as well as in animal models of depression using Flinders rats [10,13].

One method commonly used to produce rats with behavioral changes consistent with human depression is the neonatal administration of clomipramine (CMI), a monoamine re-uptake inhibitor [14]. Upon reaching adulthood, rats that received this treatment exhibit behavioral abnormalities that resemble endogenous depression [14], including reduced aggressiveness [15], decreased pleasure-seeking behaviors [16], diminished sexual activity [17,18], shorter REM sleep onset, and more REM sleep periods [19,16]. Some of the behavioral abnormalities in these rats (sexual, aggressive and motor) begin to normalize after treatment with antidepressants, such as imipramine, or after REM sleep deprivation [14]. It has been reported that neonatal CMI treatment results in a pronounced immobility in the FST, compared to controls that receive only saline neonatal treatment [17,20]. In addition, it has been reported that CMI-treated rats show neurochemical alterations in the serotonergic system [21–23], such as a decrease in the concentration of 5-HT in the frontal cortex, hippocampus, brainstem, hypothalamus and septum [15], as well as a decrease in neuronal firing rates in the dorsal raphe (DR) [24], all of which could suggest alterations in the expression or activity of the 5-HT_{1A} receptors in the structures involved in depression. The FST is an extensively used model in which a behavioral change is induced by acute stress [25,26]. As a model, it has shown predictive validity [25,28], pharmacological selectivity [27], and construct- [28] and face-validity [25,26]. In this test, rats are placed in water such that they are forced to swim. After a single pretest session, most of the subjects showed increased immobility when retested for swimming 24 h later; i.e., they showed despair reflected as immobility, which was defined as floating without struggling while making only those movements necessary to keep the head above water. Increases or decreases in immobility time are interpreted as antidepressive or depression-like actions, respectively [25]. In addition to immobility, rats may show active behaviors that reflect their interest in attempting to avoid this adverse condition. Those behaviors have been divided into two categories: swimming and climbing (vide infra). The modified version of this model [29] makes it possible to infer the participation of different neurotransmitters in the effects of antidepressant drugs. Thus, a decrease in immobility accompanied by an increase in swimming denotes activation of the serotonergic system, while an increase in climbing indicates activation of the catecholaminergic systems [30]. On another point, 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT), a selective agonist 5-HT_{1A} receptor, has been shown to exercise antidepressant-like activity in animal models of depression such as the FST. The effect of chronic treatment with 8-OH-DPAT on rats' behavior in the FST has been studied in animals injected intracerebroventricularly with 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) or parachlorophenylalanine (PCPA), showing that integrity of the serotonergic system is required [31–33], as some findings indicate that the microinjection of 8-OH-DPAT directly into the DR may produce antidepressant effects [31]. Moreover, the destruction of serotonergic neurons in the DR cancels the antidepressant effect while also

blocking serotonin synthesis (5-HT) [32]. PCPA, meanwhile, blocks the antidepressant effect of 8-OH-DPAT in the FST [33].

The aim of this study was to investigate whether potential changes in the function and levels of the 5-HT_{1A} receptors are implicated in the behavioral alterations induced by neonatal treatment with CMI by administering an agonist of 5-HT_{1A} receptors [34,35], 8-OH-DPAT, before evaluating performance of the FST [25,31], ascertaining motor activity and rectal temperature [36], and also measuring levels of the expression of the mRNA of 5-HT_{1A} receptors in the DR, hypothalamus and hippocampus. An alteration in the function and levels of the 5-HT_{1A} receptor has been implicated in mood disorders. In addition, it has been observed that the expression of mRNA for pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors is altered in suicide victims. We hypothesized that neonatal treatment with CMI would downregulate the 5-HT_{1A} receptor of the DR nucleus and induce an alteration in the function of the 5-HT_{1A} receptor.

2. Materials and methods

2.1. Neonatal treatment

The rats used were obtained from our own vivarium. All experiments were carried out in strict accordance with the National Institute of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023) [37]. A group of 21 pregnant Wistar rats was used to obtain the different litters. On postnatal day 3, the male pups were randomly cross-fostered to maintain a uniform number of pups in each litter ($n = 6$ pups/mother). The female pups were eliminated from this study. The animals were housed according to treatment (control or experimental), but all were kept on a 12-h light-dark cycle (lights on at 9:00, off at 21:00 h) with ad libitum access to food and water. From neonatal days 8 to 21, the experimental group (CMI) received subcutaneous injections of clomipramine (15 mg/kg body weight, in 0.1 ml saline solution), while the male control pups (CON) received subcutaneous injections of the vehicle only (0.1 ml of saline solution). Pups were injected twice a day (9:00 am, 18:00 pm) while still with the mother rats. At 23 days of age, the pups were weaned, housed in groups of 10, and maintained under standard conditions for the ensuing 3 months. At the age of 3 months, independent groups of both the CMI-treated and CON rats were subjected to the following experiments: A) Determination of the RT-PCR of the 5-HT_{1A} receptor (2 groups: neonatal CON and neonatal CMI) and; B) Pharmacological studies to evaluate the function of the 5-HT_{1A} receptor using the FST, rectal temperature and motor activity.

2.2. Pharmacological studies

The first part of the experiment was designed to evaluate the effect of a selective agonist to the 5-HT_{1A} receptor subtype, 8-OH-DPAT. Independent groups ($n = 7$) of CON and CMI rats were administered one of the following doses of 8-OH-DPAT: saline, 0.25 or 0.5 mg/kg. 8-OH-DPAT was administered 48 h, 24 h, and 30 min before the 5-min FST test session. The second part of the experiment sought to determine the participation of the pre- or post-synaptic 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like action of 8-OH-DPAT (0.5 mg/kg). In order to test this, an inhibitor of tryptophan hydroxylase, parachlorophenylalanine (PCPA), was administered to both groups of animals (CON and CMI). PCPA was given at a dose of 100 mg/kg following a sub-chronic treatment schedule at 72, 48 and 24 h before the 5-min FST test session. The onset of administration of 8-OH-DPAT was on the second day of treatment with PCPA (48 h). The 8-OH-DPAT was administered 30 min after the PCPA. The animals received three injections of 8-OH-DPAT following the 48 h, 24 h, and 30 min schedule, before the 5-min FST test session. All experiments were conducted using an independent group design. In another experiment, two groups of animals (CON, CMI) were administered a dose of 8-OH-DPAT (0.25 or 0.5 mg/kg) or saline as controls

($n = 5$ per group). Five minutes after administration of 8-OH-DPAT, locomotor activity was evaluated. Temperature was evaluated 15 min after and 15 min before administration of 8-OH-DPAT.

2.2.1. Forced swimming test (FST)

The forced swimming test was performed using the procedure described by Detke [29]. The rats were placed individually in a glass cylinder (46 cm high \times 20 cm in diameter) containing a column of water 30 cm deep at a temperature of 24 ± 1 °C. This method has been described previously and has been shown to be valid for detecting the antidepressant effects of various drugs [29].

There were two test sessions: one with duration of 15 min, the second 24 h later, but with duration of just 5 min. The second session was performed to measure the effect of the treatments. In the second test, the following behaviors were evaluated following Lucki [30]: a rat was judged to be immobile when it simply floated on the water, making only those movements necessary to keep its head above water. Swimming was identified when a rat made active swimming motions beyond those necessary to maintain its head above water (e.g., moving around the cylinder), while climbing was determined when a rat made movements with its front paws out of the water, usually on the wall of the cylinder. All scoring was conducted by a single evaluator, who was kept blind to the different treatment groups. All sessions were videotaped for later evaluation.

2.2.2. Locomotor activity test

In order to analyze whether the variations in immobility behavior were associated with changes in motor activity, a measurement of locomotor activity was also performed, as described by Porsolt and cols. (1977) [25]. In this case, naive rats were placed on an open-field apparatus. The open-field area was made of acrylic transparent walls with a black floor (60 cm \times 60 cm \times 50 cm), divided into nine squares of equal area. The open-field test was used to evaluate the animal's exploratory activity [38]. The parameter observed was the number of squares that a rat crossed with all four paws during a session. The animals received the same drugs and dosages used to evaluate the FST. For open field observations, each rat was individually placed in the same square of the outer area, facing the center 5 min after receiving one of the treatments, and its behavioral parameters were recorded during test sessions of 5 min. The open-field apparatus was washed in a detergent solution before each behavioral test to eliminate possible odor clues left by previous subjects.

2.3. Molecular biological studies

2.3.1. RNA extraction and quantification

The animals were killed by decapitation at the beginning of the light phase, between 9 and 10 am. Three brain regions (raphe nucleus, hippocampus, hypothalamus) were then dissected at 4 °C. The extraction and quantification of total RNA from different regions were carried out according to the method described by Chomczynsky and Sacchi [39]. Briefly, brain tissue was homogenized in the presence of trizol, chloroform was added, the aqueous phase was obtained, and the RNA was precipitated using isopropanol at 4 °C overnight. The concentration and purity of the total RNA were determined by optical density at 260/280 nm and ethidium bromide fluorescence of RNA separated electrophoretically on 1% formaldehyde containing agarose gels. Analyses of the 5-HT1A receptor were performed by RT-PCR following a methodology described previously [40].

2.3.2. Analysis of the 5-HT1A receptors using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

We standardized a semi-quantitative RT-PCR method based on the co-amplification of the target gene to 5-HT1A receptors. The primer sequence, corresponding base sites, size of the PCR product, and sequence number (GenBank) were as follows: 5-HT1A, 5'-CTG TTG CTG GGT ACT

CTC ATT TTC TGC-3' (upper primer, base position 121) and 5'-ACC AAG ATG CCC GCG TAG AAG TCT-3' (lower primer, base position 661), with a PCR product of 540 pb and GenBank sequence number NM_012585.1. β -Actin, 5'-CAC CAC AGC TGA GAG GGA AAT CGT GCG TGA-3' (upper primer, base position) and 5'-ATT TGC GGT GCA CGA TGG AGG GCG CGG ACT-3' (lower primer, base position) with a PCR product of 517 pb and GenBank sequence number NM_031144 as a constitutive gene. RT-PCR was performed as described previously. Briefly, 2 μ g of total RNA was used as the template to synthesize cDNA in 0.05 M Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 7 mM MgCl₂ buffer containing 0.05 U/ μ l RNase inhibitor and 200 U/ μ l Maloney's murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase. Reverse transcription (RT) was carried out using an RT reaction mixture (25 μ l) at 37 °C for 1 h, then at 70 °C for 10 min. The cDNA was stored at -20 °C until used. Optimal PCR conditions were determined to detect the expression of 5-HT1A receptors. Primers that recognize β -actin were used with the same cDNA preparations as an internal control to quantify mRNA. PCR was conducted using Taq DNA polymerase (Invitrogen) in a PCR reaction mixture (50 μ l) containing 1 μ l cDNA. For the 5-HT1A receptor, kept at 95 °C for 'hotstart' PCR for 5 min, amplification was performed for 41 cycles of 1 min each at 94 °C for denaturing, 1 min at 60 °C for annealing, and 1.5 min at 72 °C for extension. The PCR products (15 μ l) were electrophoresed in a 1.5% agarose gel using 100-pb ladder DNA standards as a size reference (Gibco BRL). DNA was visualized by ethidium bromide staining, and the gels were photographed under ultraviolet transillumination. Once the scan was completed, the area corresponding to each band (which represented the amplified PCR product) was automatically calculated and normalized against the area representing the expression of the constitutive gene. Results were expressed as relative intensity in arbitrary units compared to the control value.

2.4. Statistical analysis

All data presented in this study are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses compared the effect of neonatal treatment on baseline behavior, while for immobility, swimming, and climbing a Student's *t*-test was used. For analysis of the expression of the 5-HT1A receptors, a Mann-Whitney-U statistic was utilized. The effects of 8-OH-DPAT and its combination with PCPA in the FST were analyzed using a factorial ANOVA ($2 \times 2 \times 2$), where neonatal treatment (saline vs. CMI), PCPA treatment (saline vs. PCPA) and administration of 8-OH-DPAT (saline vs. 8-OH-DPAT) were the factors. Finally, the effects of treatment with 8-OH-DPA (FST, temperature and locomotor activity) at different doses were performed using a two-factor ANOVA (2×3), where neonatal treatment (saline vs. CMI) and the different doses of 8-OH-DPAT (saline, 0.25, 0.50 mg/kg) were the factors. When significant, ANOVA was followed by the Newman-Keuls *post hoc* test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

The baseline behavior of the CMI and CON groups during the FST is shown in Fig. 1. At adulthood, the CMI treated group exhibited significantly more immobility [$p < 0.05$] accompanied by a significant decrease in swimming behavior [$p < 0.05$] compared to the neonatal rats treated with saline solution. The climbing behavior of the CMI-treated rats was not affected. Regarding the effect of 8-OH-DPAT on neonatal treatment, results are shown in Fig. 2. Significant differences in immobility behavior were detected in relation to the neonatal treatments [$F(1,41) = 17.9285$, $p < 0.0002$] and the effect of the drug [$F(2,40) = 14.01314$, $p < 0.0001$]. Regarding swimming, there were also differences in neonatal treatments [$F(1,41) = 30.97$, $p < 0.001$] and the effect of 8-OH-DPAT [$F(2,40) = 27.9492$, $p < 0.0001$]; though no significant differences were detected in relation to climbing, neonatal treatment [$F(2,40) = 0.49857$, $p < 0.5066$] and 8-OH-DPAT [$F(2,40) = 0.01113$, $p < 0.9889$].

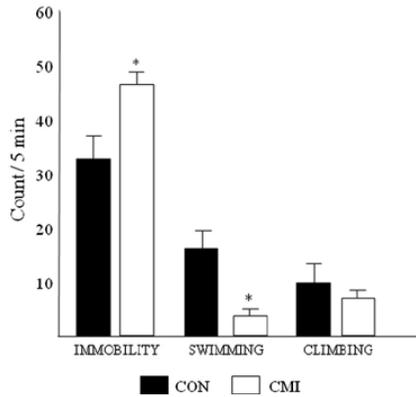


Fig. 1. Effect of neonatal administration of CMI on immobility time during the FST. In the group treated neonatally with CMI, findings showed an increase in immobility time and a decrease in active behaviors, compared to the group treated with the saline solution (CON). Mean \pm S.E.M., ANOVA followed by Newman-Keuls test. * $p < 0.05$.

Administration of 8-OH-DPAT at both doses (0.25 and 0.5 mg/kg) reduced immobility behavior significantly in CON [Newman-Keuls, $p < 0.05$] and induced an increase in swimming behavior [Newman-Keuls, $p < 0.05$], but did not modify climbing. In the case of the rats treated neonatally with CMI, findings included a significant increase in immobility conduct with a reduction in swimming behavior when the vehicle (saline solution) was administered, compared to the rats in CON. But this increase in immobility conduct [$p < 0.01$] in the CMI rats decreased significantly upon administering 8-OH-DPAT [Newman-Keuls, $p < 0.01$] at both doses (0.25 and 0.5 mg/kg), which also induced an increase in swimming behavior [$p < 0.01$] of a similar magnitude and at both doses. No significant differences were observed in immobility and swimming behaviors between the rats in CMI and CON before administering the 8-OH-DPAT.

The results related to pre-treatment with PCPA on the effect of 8-OH-DPAT in the rats treated neonatally with CMI and those in CON upon subjection to the FST are shown in Fig. 3. With respect to immobility, significant differences were detected only in neonatal treatments [$F(1,55) = 18.72236$, $p < 0.0001$] and the effect of

8-OH-DPAT [$F(3,53) = 30.52784$, $p < 0.0001$]. Regarding swimming, there were also differences in neonatal treatments [$F(1,55) = 28.94434$, $p < 0.0001$], and the effect of PCPA [$F(3,53) = 7.14033$, $p < 0.01$] and 8-OH-DPAT [$F(3,53) = 91.92753$, $p < 0.0001$]. No significant differences in climbing were detected after neonatal treatment [$F(1,55) = .13021$, $p < 0.72$], but the effect of PCPA [$F(3,53) = 5.59402$, $p < 0.0226$] and the administration of 8-OH-DPAT [$F(3,53) = 4.60894$, $p < 0.0375$] did reveal significant differences, as treatment with 8-OH-DPAT significantly reduced immobility conduct while increasing swimming behavior in both groups, CON and CMI. Pre-treatment with PCPA did not block the reduction of immobility induced by the 8-OH-DPAT in the rats treated neonatally with the saline solution, in the CON rats [Newman-Keuls, $p < 0.05$], or in those treated neonatally with CMI [Newman-Keuls, $p < 0.01$]. This reduction in immobility behavior was accompanied by a significant increase in swimming in both the CON [Newman-Keuls, $p < 0.01$] and CMI animals [Newman-Keuls, $p < 0.01$], similar to that observed upon administering 8-OH-DAT.

With regard to rectal temperature, neonatal treatment did not affect this parameter ($F(1,37) = 0.026$, $p < 0.872$). The statistical analysis shows that basal temperature was similar for both groups (CON and CMI), while the administration of 8-OH-DPAT, in both doses, induced a significant reduction in temperature that was similar in both groups [$F(2,36) = 46.46027$, $p < 0.0001$, Table 1]. With respect to locomotor activity, statistical analysis shows differences in neonatal treatment [$F(1,14) = 10.84607$, $p < 0.0031$] and the administration of 8-OH-DPAT [$F(2,13) = 17.41474$, $p < 0.0001$], but not in the combination of factor AxB ($F(2,27) = 0.42707$, $p < 0.6573$). Administering both doses of 8-OH-DPAT induced a significant, and similar, increment in locomotor activity in both the CON and CMI groups ($F(2,36) = 44.270$, $p < 0.0001$, Fig. 4).

The semi-quantitative determination of RT-PCR in the expression of RNAm of the 5-HT_{1A} receptors in the raphe nucleus, hippocampus and hypothalamus is presented in Fig. 5. Neonatal treatment with CMI reduced the levels of expression of RNAm for the 5-HT_{1A} receptors in the raphe nucleus ($t = 4.29$, $p < 0.001$), compared to the CON group (Panel A). In the case of the post-synaptic receptors located in the hypothalamus (Panel B), an opposite response was observed due to the effect of neonatal treatment with CMI, as it induced a significant increase in the expression of the RNAm of the 5-HT_{1A} receptors ($t = 7.31$; $p < 0.0001$). This same response was seen in the hippocampus ($t = 3.23$; $p < 0.0001$), with an observed increase in the expression of the receptor due to the effect of neonatal treatment with CMI (Panel C).

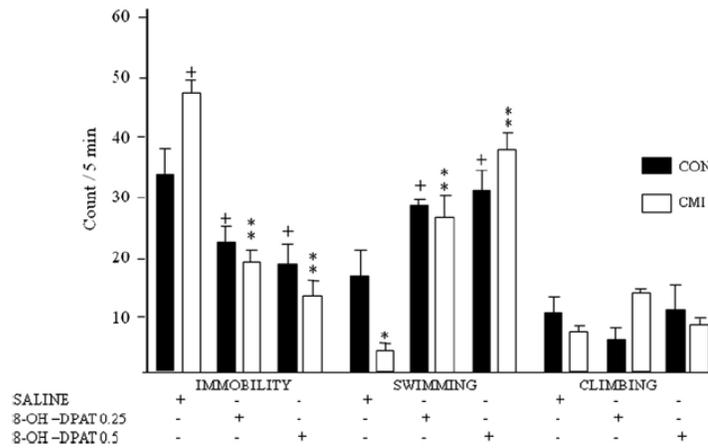


Fig. 2. Effects of the administration of 8-OH-DPAT on the FST in rats treated neonatally with CMI. Treatment with 8-OH-DPAT reduced immobility while increasing swimming in both neonatal treatment groups, CMI and CON. Mean \pm S.E.M., ANOVA followed by Newman-Keuls test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CMI saline, + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs. CON saline.

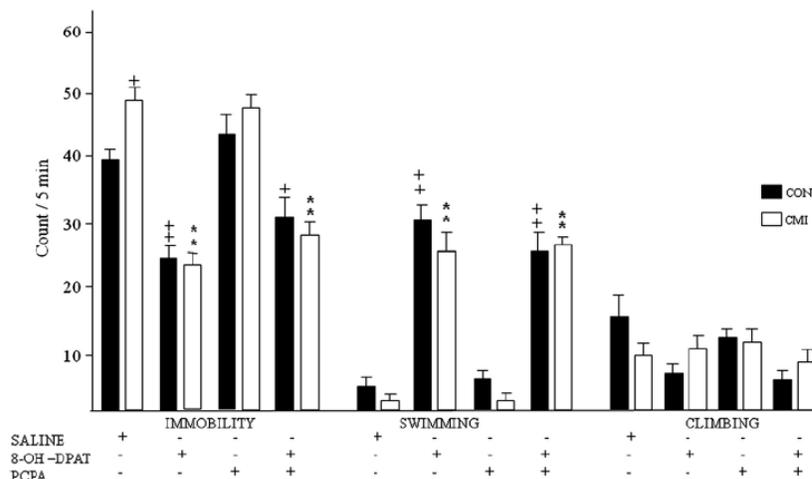


Fig. 3. Effects of pre-treatment with PCPA and administration of 8-OH-DPAT on the FST in rats treated neonatally with CMI. Treatment with 8-OH-DPAT reduced immobility by increasing swimming in both groups. Pre-treatment with PCPA caused no changes in these behaviors. Mean \pm S.E.M., ANOVA followed by Newman-Keuls test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CMI saline; +++ $p < 0.01$ vs CON saline.

4. Discussion

The present results corroborate the suggestion that neonatal treatment with clomipramine induces a marked immobility in the FST when the rats reach adulthood [17,41]. This was accompanied by a significant decrease in swimming behavior, though with no modification of the incidence of climbing behavior [41]. These data suggest that CMI-treated rats experience alterations in the activity of the serotonin system. Alterations of the serotonergic system after neonatal treatment with serotonin reuptake blockers have been reported repeatedly [14–20]: neonatal treatment with CMI induces a decrease in hypothalamic levels of 5-HT [23], though other authors have reported a significant decrease of both 5-HT and NA in the brain stem, septum, hippocampus, hypothalamus and frontal cortex [15]. Rats treated neonatally with CMI also show lower levels of serotonin and dopamine in the limbic regions of the left side, while control animals have lower levels on the right side [23]. Additionally, CMI rats show a decrease in the firing rate of the serotonergic units located in the dorsal raphe nucleus [21]. Similarly, it has been reported that rats neonatally treated with CMI, or with the serotonin selective reuptake inhibitor LU 10-134-C, show a decrease in 5-HT transporter mRNA expression in the raphe nucleus [22]. Given that this modified the swimming behavior in the FST, it can be assumed that the serotonergic system is altered by neonatal treatment with CMI [23,30,31]. This study thus provides additional evidence that neonatal treatment with CMI induces a significant decrease in the expression of the mRNA of the 5-HT1A receptors in the DR, while in the hypothalamus and hippocampus, the CMI-treated rats showed an increased expression of the mRNA of this receptor. Such limbic brain regions as the hippocampus, the lateral

septum, the cortical areas, and the mesencephalic raphe nuclei (both the DR and medial raphe) have the highest density of 5-HT1A receptors [42]. A downregulation of 5-HT1A receptors has been proposed as a general hypothesis to explain alterations in the 5-HT receptor function in subjects with depressive symptoms [43], perhaps accompanied by other 5-HT receptors [44]. The 5-HT1A autoreceptor is related, at least in part, to the regulation of the release of 5-HT [45]. A key component of brain 5-HT neurotransmission is the discharge rate of 5-HT neurons in the DR nucleus, a major aggregation of 5-HT neurons. Previous studies in CMI-treated rats have shown a decrease in neuronal firing rates in the DR with desensitization of the 5-HT1A autoreceptors [46,24], but without changes in the levels of 5-HT1A receptor mRNA in the dorsal raphe and CA1 hippocampus at 22 or 69 days after the final CMI injection [22]. These differences could be due to the sensitivity of the techniques employed, as our study used PCR, while Hansen and Mikkelsen [22] used in situ hybridization.

Our results show a downregulation of 5-HT1A autoreceptors in the DR. Similarly, the decrease in 5-HT firing activity and the

Table 1
Effects of the administration of 8-OH-DPAT on rectal temperature in rats treated neonatally with CMI.

	Basal	8-OH-DPAT	
		0.25 mg/kg	0.5 mg/kg
Control	37.62 \pm 0.21	35.72 \pm 0.13 ⁺⁺	35.60 \pm 0.34 ⁺⁺
CMI	37.69 \pm 0.11	35.34 \pm 0.29 ^{**}	35.82 \pm 0.30 ^{**}

CMI = clomipramine. The table shows the mean \pm S.E.M. ANOVA followed by Newman-Keuls test.

** $p < 0.01$ vs. CMI basal.
++ $p < 0.01$ vs. control basal.

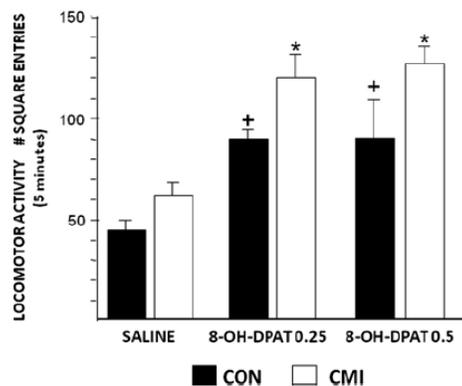


Fig. 4. Effects of the administration of 8-OH-DPAT on locomotor activity in rats treated neonatally with CMI. Treatment with 8-OH-DPAT increased motor activity in both groups (CMI and CON). Mean \pm S.E.M., ANOVA followed by Newman-Keuls test. + $p < 0.01$ vs. CON saline; * $p < 0.01$ vs CMI saline.

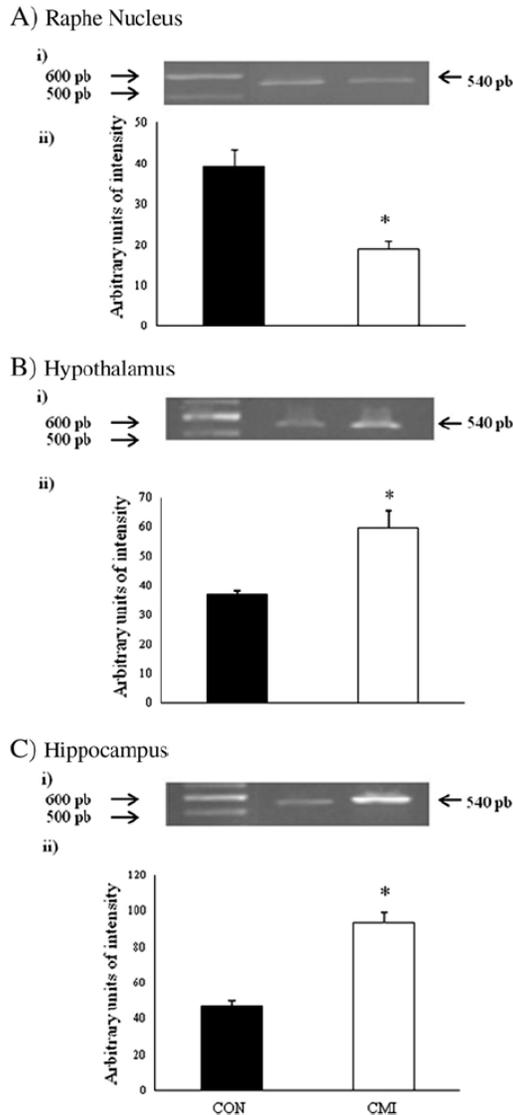


Fig. 5. Determination of the expression of the 5-HT_{1A} receptors by PCR in the dorsal raphe nucleus (A), hippocampus (B) and hypothalamus (C) in rats treated neonatally with CMI and CON. The CMI rats showed a reduction in the expression of the receptor in the dorsal raphe nucleus, while an increase was observed in the hypothalamus and hippocampus. Mean \pm S.E.M., ANOVA followed by Newman-Keuls test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CMI saline; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs CON saline.

desensitization/downregulation of 5-HT_{1A} autoreceptors were both found in 5-HT transporter knockout mice, a transgenic model of depression [47,48], as in the animal model of chronic unpredictable stress [49]. Our results suggest that 5-HT_{1A} receptor downregulation, induced by neonatal treatment with CMI, may also be associated with an attenuation of 5-HT neuronal activity. These alterations may represent major endophenotypic hallmarks in depressive disorders. In support of this hypothesis, Arango et al. [50] reported a reduction in the distribution volume of 5-HT_{1A} autoreceptors in the DR in depressed patients [50]. However, those observations raise an apparent controversy, since selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressants are known to

acutely decrease 5-HT neuronal firing activity and later desensitize 5-HT_{1A} autoreceptors in order to restore normal 5-HT neuronal firing activity [5], but without inducing any effect on the expression of either 5-HT_{1A} autoreceptor mRNA or the protein [51]. This contradiction could be explained as follows: neonatal treatment with CMI induced desensitization and downregulation of the 5-HT_{1A} autoreceptors, whereas SSRI desensitizes only the autoreceptors that restore normal 5-HT neuronal firing, which occurs only after long-term drug administration [43]. Conversely, in CMI rats, 5-HT_{1A} autoreceptor downregulation and desensitization are paralleled by a dramatic decrease in 5-HT neuronal firing activity. This desensitization can therefore be inferred as a compensatory response to a primary decrease in 5-HT electrical activity, which may in turn be directly induced by neonatal treatment with CMI. On the other hand, the increment in the expression of the 5-HT_{1A} postsynaptic receptors was expected since the CMI-treated rats show low levels of 5-HT [15,23]. The terminal brain regions in which 5-HT_{1A} receptor density is significantly higher in the CMI rats than the CON rats could be related to the observation that, at baseline, there was a difference in the extracellular levels of 5-HT between the two groups [15]. This conclusion follows upon the assumption that lower extracellular levels of 5-HT would upregulate the postsynaptic receptor sites studied here, assuming no change in receptor affinity. This explanation has some support since both the CMI and CON rats responded similarly to administration of 8-OH-DPAT. It is accepted that the antidepressant-like action of 8-OH-DPAT (as well as buspirone or gepirone, the 5-HT_{1A} receptor partial agonists) evidenced in the FST is related to the activation of 5-HT_{1A} receptors [30,52,53]. Despite some exceptions, pre-clinical data generally indicate that the antidepressant effect of 5-HT_{1A} receptor agonists is predominantly mediated by postsynaptic 5-HT_{1A} receptors; whereas the anxiolytic effect is predominantly mediated by presynaptic 5-HT_{1A} receptors [54]. This conclusion is based largely on a series of studies that used different experimental procedures, including local intracerebral injection techniques [53,55]. It has also been reported that the same application schedule of PCPA as used in the present study did not affect the anti-immobility effect of 8-OH-DPAT on the rat FST [55], which would support the idea that the latter effect is mediated by postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. Similarly, our results show that in both groups the selective 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT was active in the FST by inducing a statistically significant decrease in immobility behavior and an increase in swimming behavior, a finding similar to other studies. Though the CMI rats were more immobile than the CON rats in the forced swim test, they exhibited a slight increase in motor activity after placement in a novel cage, when compared to CON rats. These results suggest that the immobility displayed by CMI rats in the forced swim test cannot be related to a decrease in motor activity per se and, therefore, indicates a marked depression-like behavior. The direct involvement of elevated levels of corticosterone in the immobility behavioral response in the forced swim test has been demonstrated [56,57]. Neonatal treatment with CMI is known to induce enhanced plasma corticosterone levels at baseline [58]; thus, the increase in immobility time observed in the FST in CMI rats could be related to a hyper-reactivity of the HPA axis. Moreover, no difference in spontaneous locomotor activity was found between the CMI and CON rats after administering 8-OH-DPAT, which suggests that the function of the 5-HT_{1A} receptor seems to be preserved.

It has been suggested that 5-HT_{1A} receptors play a role in the etiology of both depression and anxiety-related behaviors [58,59]. Moreover, their involvement in the therapeutic effect of antidepressants has been clearly demonstrated in naive rats [60,61]. In the present study, we investigated the existence of putative adaptive changes in 5-HT_{1A} receptor function in CMI rats by studying the response induced by the systemic administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT. We found that 8-OH-DPAT induced decreases in core body temperature and locomotor activity that were similar in both the CON and CMI rats. The majority of studies indicate that, in rats, 8-OH-DPAT-induced hypothermia results from the activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors

[36,62]. Indeed, the hypothalamus is a likely candidate as a mediator of the hypothermic response to 5-HT_{1A} receptor agonists [63,64]. Taken together, our results seem to suggest that the 5-HT_{1A} serotonergic receptor in the CMI rats responds appropriately, thus indicating a normal functionality of the 5-HT_{1A} receptor.

On the other hand, previous studies in our laboratory using this same animal model of depression evaluated the effect of 8-OH-DPAT on the parameter of masculine sexual behavior. It is well known that the administration of 8-OH-DPAT facilitates the expression of masculine sexual behavior in male rats, and that this effect is mediated through 5-HT_{1A} postsynaptic receptors [65]. The role of presynaptic serotonergic receptors on the mechanism of action of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists on masculine sexual behavior: physiological and pharmacological implications [65]. The administration of 8-OH-DPAT in CMI rats induced a facilitating effect in most of the copulatory parameters that was similar to that observed in the CON animals, suggesting that the 5-HT_{1A} receptor seems to be preserved in these rats [17].

In conclusion, our results show that neonatal treatment with CMI alters the serotonergic system by inducing a downregulation of the 5-HT_{1A} autoreceptors in the dorsal raphe, but increasing the expression of the postsynaptic 5-HT_{1A} receptors (hypothalamus and hippocampus), though it seems that the function of the postsynaptic 5-HT_{1A} receptors is not affected, suggesting that the depressive behavior observed in adulthood in this model may be associated with long-term alterations in the expression of the mRNA of the 5-HT_{1A} receptors.

References

- [1] Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 2003;289:3095–105.
- [2] Fink KB, Gothert M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev* 2007;59:360–417.
- [3] Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Greer PJ, Mathis C. Serotonin type-1A receptor imaging in depression. *Nucl Med Biol* 2000;27:499–507.
- [4] Hirvonen J, Kajander J, Alonen T, Oikonen V, Nagren K, Hietala J. Measurement of serotonin 5-HT_{1A} receptor binding using positron emission tomography and [¹¹C]WAY-100635—considerations on the validity of cerebellum as a reference region. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:185–95.
- [5] Blier P, Ward N. Is there a role for 5-HT_{1A} receptor agonist in treatment of depression? *Biol Psychiatry* 2003;53:193–203.
- [6] Ohno Y. New insight into the therapeutic role of 5-HT_{1A} receptor in central nervous disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2010;10(2):148–57.
- [7] Anisman H, Du L, Palkovits M, Faludi G, Kovacs GG, Szontagh-Kishazi P. Serotonin receptor subtype and p11 mRNA expression in stress-relevant brain regions of suicide and control subjects. *J Psychiatry Neurosci* 2008;33:131–41.
- [8] Stockmeier CA, Dilley GE, Kulnane LS, Miguel-Hidalgo JJ, Rajkowska-Markow G. Morphometric evaluation of the midbrain dorsal raphe nucleus (DR) in suicide victims with major depression (MD). *Abstr Soc Neurosci* 1999;25:2098.
- [9] Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res* 2008;42:433–42.
- [10] Osterlund M, Overstreet D, Hurd Y. The flinders sensitive line rats, a genetic model of depression, show abnormal serotonin receptor mRNA expression in the brain that is reversed by 17 β -estradiol. *Mol Brain Res* 1999;74:154–66.
- [11] Shayit M, Yadid G, Overstreet DH, Weller A. 5-HT_{1A} receptor subsensitivity in infancy and supersensitivity in 1A adulthood in an animal model of depression. *Brain Res* 2003;980:100–8.
- [12] Drevets WC, Thase ME, Moses-Kolko EL, Price J, Frank E, Kupfer DJ, et al. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl Med Biol* 2007;34:865–77.
- [13] Nishi K, Kanemaru K, Diskisc M. A genetic rat model of depression, Flinders Sensitive Line, has a lower density of 5-HT_{1A} receptors, but a higher density of 5-HT_{1B} receptors, compared to control rats. *Neurochem Int* 2009;54:299–307.
- [14] Vogel GW, Buffenstein A, Minter K, Hennessey A. Drugs effects on REM sleep and endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev* 1990;14:49–63.
- [15] Vijayakumar M, Meti BL. Alterations in the levels of monoamines in discrete brain regions of clomipramine induced animal model of endogenous depression. *Neurochem Res* 1999;24:345–9.
- [16] Vogel G, Neill D, Hagler M, Kors D, Hartley P. Decreased intracranial self-stimulation in a new animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 1990;14:65–8.
- [17] Bonilla-Jaime H, Retana-Marquez S, Velázquez-Moctezuma J. Pharmacological features of masculine sexual behavior in an animal model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60:39–45.
- [18] Vogel G, Hagler M, Hennessey A, Richard C. Dose-dependent decrements in adult male rat sexual behavior after neonatal clomipramine treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54(3):605–9.
- [19] Frank MG, Heller HC. Neonatal treatments with the serotonin uptake inhibitors clomipramine and zimelidine, but not the noradrenaline uptake inhibitor desipramine, disrupt sleep patterns in adult rats. *Brain Res* 1997;768(1–2):287–93.
- [20] Velázquez-Moctezuma J, Díaz RO. Neonatal treatment with clomipramine increased immobility in the forced swimming test: an attribute of animal models of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;42(4):737–9.
- [21] Yavari P, Vogel GW, Neill DB. Decreased raphe unit activity in a rat model of endogenous depression. *Brain Res* 1993;611:31–6.
- [22] Hansen HH, Mikkelsen JD. Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic neonatal exposure to a serotonin reuptake inhibitor. *Eur J Pharmacol* 1998;352:307–15.
- [23] Feenstra MG, Van Galen H, Te Riele PJ, Botterblom MH, Mirmiran M. Decreased hypothalamic serotonin levels in adult rats treated neonatally with clomipramine. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;55:647–52.
- [24] Kinney CG, Vogel GW, Feng P. Decreased dorsal raphe nucleus neuronal activity in adult chloral hydrate anesthetized rats following neonatal clomipramine treatment: implications for endogenous depression. *Brain Res* 1997;756:68–75.
- [25] Porsolt RD, Bertin A, Jalife M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. *Nature* 1977;266:730–2.
- [26] Porsolt RD, Bertin A, Blavet N, Deniel M, Jalife M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur J Pharmacol* 1979;57:201–10.
- [27] Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:238–45.
- [28] Fluge A, Gagliano M, Cannizzaro C, Novara V, Cannizzaro G. Antidepressant and anxiolytic effects of alprazolam versus the conventional antidepressant desipramine and the anxiolytic diazepam in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 1992;214:233–8.
- [29] Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 1997;8:523–32.
- [30] Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;121:66–72.
- [31] Detke MJ, Johnson J, Lucki I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol* 1997;5(2):107–12.
- [32] Cervo L, Grignaschi G, Samanin R. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a selective serotonin 1A receptor agonist, reduces the immobility of rats in the forced swimming test by acting on the nucleus raphe dorsalis. *Eur J Pharmacol* 1988;158(1–2):53–9.
- [33] Cervo L, Samanin R. Potential antidepressant properties of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a selective serotonin 1A receptor agonist. *Mol Psychiatry* 1987;144(2):223–9.
- [34] Cervo L, Samanin R. Effect of chronic treatment with 8-OH-DPAT in the forced swimming test requires the integrity of presynaptic serotonergic mechanisms. *Psychopharmacology* 1991;103(4):524–8.
- [35] Middlemiss DN, Fozard JR. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT₁ recognition site. *Eur J Pharmacol* 1983;90:151–3.
- [36] Hutson TP, Donohoe GC. Hypothermia induced by the putative 5-HT_{1A} agonists LY165163 and 8-OH-DPAT is not prevented by 5-HT depletion. *Eur J Pharmacol* 1987;143:221–8.
- [37] Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)* 1988;94:147–60.
- [38] Archer J. Sex differences in the emotional behaviour of laboratory mice. *Br J Psychol* 1977;68(1):125–31.
- [39] Chomczynsky P, Sacchi N. Single-step of isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
- [40] Delgado-Rizo V, Salazar A, Panduro A, Amendariz-Borunda J. Treatment with anti-transforming growth factor antibodies influenced and altered patterns of cytokine gene expression in injured rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1988;1442:20–7.
- [41] Vázquez-Palacios G, Bonilla-Jaime H, Velázquez-Moctezuma J. Antidepressant effects of nicotine and fluoxetine in an animal model of depression induced by neonatal treatment with clomipramine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29(1):39–46.
- [42] Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999;38(8):1083–152.
- [43] Blier P, Montigny C. Differential effect of gepirone on presynaptic and postsynaptic serotonin receptors: single cell recording studies. *J Clin Psychopharmacol* 1990;10(3):13–20.
- [44] Stahl S. 5HT_{1A} receptors and pharmacotherapy. Is serotonin receptor down-regulation linked to the mechanism of action of antidepressant drugs? *Psychopharmacol Bull* 1994;30(1):39–43.
- [45] Hamon M, Bourgoin S, Morot-Gaudry Y, Glowinski J. End product inhibition of serotonin synthesis in the rat striatum. *Nat New Biol* 1972;237(75):184–7.
- [46] Maudhuit C, Hamon M, Adrien J. Electrophysiological activity of raphe dorsalis serotonergic neurons in a possible model of endogenous depression. *Neuroreport* 1995;6(4):681–4.
- [47] Li Q, Wichems C, Heill A, Lesch KP, Murphy DL. Reduction in the density and expression, but not G-protein coupling, of serotonin receptors (5-HT_{1A}) in 5-HT transporter knock-out mice: gender and brain region differences. *J Neurosci* 1995;20(21):7888–95.
- [48] Fabre V, Beaufour C, Evrard A, Rioux A, Hanoun N, Lesch KP, et al. Altered expression and functions of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter. *Eur J Neurosci* 2000;12(7):2299–310.

- [49] Rodriguez-Bambico F, Nguyen NT, Gobbi G. Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors after chronic unpredictable stress. *Eur Neuropsychopharmacol* 2009;19:215–28.
- [50] Arango V, Underwood MD, Boldrini M, Tamir H, Kassir SA, Hsiung S, et al. Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology* 2001;25(6):892–903.
- [51] Johnson MT, McCullough J, Nindl G, Chamberlain JK. Autoradiographic evaluation of electromagnetic field effects on serotonin (5HT_{1A}) receptors in rat brain. *Biomed Sci Instrum* 2003;39:466–70.
- [52] Cryan J, Leonard B. 5-HT_{1A} and beyond: the role of serotonin and its receptors in depression and the antidepressant response. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 2000;15:113–35.
- [53] De Vry J, Schreiber R, Melon C, Dalmus M, Jentsch KR. 5-HT_{1A} receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004;14:487–95.
- [54] De Vry J. 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology* 1995;121(1):1–26.
- [55] Schreiber R, De Vry J. Neuroanatomical basis for the antidepressant-like effects of the 5-HT_{1A} receptor agonists 8-OH-DPAT and ipsapirone in the rat forced swimming test. *Behav Pharmacol* 1993;4(6):625–36.
- [56] Korte SM, De Kloet ER, Buwalda B, Bouman SD, Bohus B. Antisense to the glucocorticoid receptor in hippocampal dentate gyrus reduces immobility in forced swim test. *Eur J Pharmacol* 1996;301:19–25.
- [57] Mitchell JB, Meaney MJ. Effects of corticosterone on response consolidation and retrieval in the forced swim test. *Behav Neurosci* 1991;105:798–803.
- [58] Bonilla-Jaime H, Retana-Márquez S, Arteaga-Silva M, Hémandez-González M, Vázquez-Palacios G. Circadian activity of corticosterone in an animal model of depression: response to muscarinic cholinergic stimulation. *Physiol Behav* 2010;100:311–5.
- [59] Overstreet DH, Ommisaris RC, De La Garza R, File SE, Knapp DJ, Seiden LS. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in animal tests of anxiety and depression: evidence from genetic models. *Stress* 2003;6:101–10.
- [60] Sibille R, Hen N. Serotonin (1A) receptors in mood disorders: a combined genetic and genomic approach. *Behav Pharmacol* 2001;12:429–38.
- [61] Blier P, de Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:220–6.
- [62] Celada P, Puig M, Amargós-Bosch M, Adell A, Artigas F. The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci* 2004;29(4):252–65.
- [63] Millan MJ, Rivet JM, Canton H, Le Marouille-Girardon S, Gobert A. Induction of hypothermia as a model of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated activity in the rat: a pharmacological characterization of the actions of novel agonists and antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:1364–76.
- [64] Stockmeier CA, Wingenfeld P, Gudelsky GA. Effects of repeated electroconvulsive shock on serotonin 1A receptor binding and receptor-mediated hypothermia in the rat. *Neuropharmacology* 1992;31(11):1089–94.
- [65] Fernández-Guasti A, Escalante AL, Alherius S, Hillegart V, Larsson K. Stimulation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in brain regions and its effects on male rat sexual behavior. *Eur J Pharmacol* 1992;210:121–9.



Contents lists available at ScienceDirect

Hormones and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yhbeh

Regular article

Hormone replacement with 17 β -estradiol plus dihydrotestosterone restores male sexual behavior in rats treated neonatally with clomipramine



Ofelia Limón-Morales ^a, Cesar Soria-Fregozo ^b, Marcela Arteaga-Silva ^c, Marisela Hernández González ^d, Gonzalo Vázquez-Palacios ^e, Herlinda Bonilla-Jaime ^{c,*}

^a Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Apartado, Postal 55 535, C.P. 09340, D.F. México

^b Laboratorio de Psicobiología, Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara, México

^c Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Apartado Postal 55 535, C.P. 09340, D.F. México

^d Instituto de Neurociencias, Universidad de Guadalajara, Francisco de Quevedo 180, Col. Arcos de Vallarta, CP 44130, Guadalajara, Jalisco, México

^e Colegio De Ciencia y Tecnología, Universidad Autónoma de la Ciudad de México-San Lorenzo Tezonco, Av. Prolongación San Isidro 151, Col. San Lorenzo Tezonco, Deleg. Iztapalapa CP 09790, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 October 2013

Revised 18 September 2014

Accepted 23 September 2014

Available online 11 November 2014

Keywords:

Sexual behavior

Clomipramine (CMI)

Depression

Gonadal hormones

Motivation

17 β -estradiol

ABSTRACT

Male sexual behavior (MSB) in rodents, in both its consummatory and motivational components, is regulated by hormones such as testosterone, 17 β -estradiol and 5- α -dihydrotestosterone. In experiments, neonatal treatment with clomipramine (CMI; a serotonin reuptake inhibitor) reproduces some of the signs of depression in adult age, including reduced sexual behavior manifested in a lower percentage of subjects that mount, intromit and ejaculate, although their testosterone levels were not altered. However, the effect of this treatment on estrogen levels and the consequences of hormone substitution using 17 β -estradiol and 5- α -dihydrotestosterone on the expression of male sexual behavior are still unknown. Therefore, the objective of the present study was to analyze the effect of neonatal treatment with CMI on plasma testosterone and 17 β -estradiol levels, and the role of testosterone, 17 β -estradiol and 5- α -dihydrotestosterone in altering the consummatory and motivational components of sexual behavior in male rats. To this end, it analyzed the copulatory parameters and sexual incentive motivation (SIM) of rats treated with CMI under two conditions: basal and post-hormone replacements. Neonatal treatment with CMI did not affect plasma testosterone or 17 β -estradiol concentrations, but did decrease both the consummatory component and sexual motivation according to the results of the SIM test. These aspects were recovered after administering 17 β -estradiol + 5- α -dihydrotestosterone, but not testosterone.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

It has been proposed that reproductive behaviors in male mammals include two separate, but interacting, components: an appetitive or motivational component (denominated sexual motivation) that directs males to search for and approach receptive females; and a consummatory or executory component (called sexual performance), in which the male makes sexual contact in the form of mounts, intromissions and ejaculations (Beach et al., 1956). Both components, appetitive and consummatory, require a complex regulation that in the case of males depends on testicular hormones. Testosterone (T), the main testicular androgen, can be metabolized to 17 β -estradiol (E₂) and 5- α -dihydrotestosterone (DHT), both of which are present in the brain and play a well-known

regulatory role in sexual behavior (see the review in Mensah-Nyagan et al., 1999). The consummatory component is also affected by the loss of gonadal hormones, so that when T production is suspended by castration, sexual activity declines (see the review in Hull et al., 2006) and administering T can restore males' ability to mate by achieving penile insertion and ejaculation (see the review in Hull et al., 2006). Previous studies suggest that both hormones, E₂ combined with DHT, are necessary for the proper display of sexual behavior in male rats (Larsson et al., 1973), and, moreover, that this hormonal response is dependent on the animal's prior sexual experience (Pfaff, 1970; Sodersten, 1973).

MSB is not limited to the display of the motor patterns directly related to copulation, as these must be preceded by the approach to a potential mate. In a finding that may be conceptually equivalent to sexual desire in humans, the more intense the rat's approach behavior, the higher the level of sexual conduct (Agmo, 1999; Agmo and Ellingsen, 2003; Agmo et al., 2004; Spiteri and Agmo, 2006). A reliable technique for measuring central motivation more directly is the sexual incentive motivation (SIM) test (Spiteri and Agmo, 2006). This test of sexual

* Corresponding author at: Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, C.P. 09340 Iztapalapa, D.F. México. Fax: + 52 55 5804 4930.

E-mail address: bjh@xanum.uam.mx (H. Bonilla-Jaime).

incentive motivation quantifies the intensity of approach behaviors directed to a stimulus, such as the copula. It can also be argued that the more intense the behavior approach, the more intense the motivation behind this approach. Thus, the time that rats spend in the sexual incentive zone provides an indicator of sexual motivation that correlates with the human libido (Vega-Matuszyk et al., 1998; Agmo, 1999; Agmo and Ellingsen, 2003). In contrast, the increase in mount and intromission latencies and reduced time spent in the sexual incentive zone during SIM seem to suggest reduced sexual motivation. Some studies have shown that sexual experience increases sexual motivation (Ametislvaskaia et al., 2010), but that only sexual reinforcement through ejaculation enhances the motivational impact of the incentive cues emitted by females (López et al., 1999). Few studies have examined the role of hormones in sexual motivation in the SIM, however Attila et al. (2010) recently suggested that sexual motivation is regulated by androgens (Attila et al., 2010).

Serotonin (5-HT) is a widely distributed neuromodulator that plays an important role in regulating brain development (Gaspar et al., 2003). Manipulation of this system during early stages of neurodevelopment through administration of antidepressant agents can change brain development, and the behavioral consequences may depend on the stage of development: i.e., prenatal, early and late postnatal (Kepser and Homberg, in press). For example, chronic treatment with fluoxetine, a serotonin reuptake inhibitor, during gestation and lactation (Gouvêa et al., 2008) in adult rats (Vega-Matuszyk et al., 1998), induces a reduction on the SIM test (Gregorian et al., 2002; Clayton and Montejo, 2006); whereas brief neonatal exposure to clomipramine (CMI), a serotonin reuptake inhibitor, may produce various behavioral abnormalities that appear to be due to long-term alterations in the serotonergic system (Mirmiran et al., 1981; Feenstra et al., 1996), such as reduced aggressiveness (Vijayakumar and Meti, 1999), shorter REM sleep onset, more REM sleep periods (Mirmiran et al., 1981; Vogel et al., 1990), and impairment of male sexual performance (Bonilla-Jaime et al., 1998; Feng and Vogel, 2001). These rats perform fewer intromissions and show a decrease in the frequency of ejaculations (Neill et al., 1990; Vogel et al., 1996; Bonilla-Jaime et al., 1998). The deficits in masculine sexual behavior in the CMI rats were not associated with alterations in plasma testosterone concentrations in the basal condition (Bonilla-Jaime et al., 2003). Since male CMI rats show alterations in sexual behavior, such as increased latencies to initiate copulation (mount and intromission latencies), these measures for assessing sexual motivation are of limited utility. Hence, the present work was interested in determining the influences of early life serotonin levels in the development of sexual motivation measured using the SIM test by administering CMI in the neonatal period, whether this can be modified by sexual experience, and if this alteration in the sexual performance and sexual motivation (in the SIM test) in CMI rats is mediated by sexual hormones (T, E₂ and DHT). Finally, though it is well-known that T levels in these animals are normal, possible alterations in the production of metabolites, such as serum blood levels of E₂ have not been analyzed, despite the fact that it is widely believed that they may be the most active elements in the central nervous system.

Materials and methods

Animals

Pregnant Wistar rats were obtained from the vivarium at the *Universidad Autónoma Metropolitana*. All experiments were carried out in accordance with the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999 (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999). Three days after delivery, the female pups were eliminated from the study and the males were cross-fostered to maintain uniform litter size ($n = 56$). All animals were kept on a reversed 12-h light/dark cycle with lights on at 2100 h and temperature controlled at 24 °C. Food and water were available *ad libitum*. The male pups were injected subcutaneously twice daily

(at 0900 and 1800) from 8 to 21 days of age. All litters followed the same treatment regimen, but one group (CMI) received clomipramine (15 mg/kg 0.1 ml) in each injection, while the control group (CON) received the same volume of saline in the same number of injections. At 23 days, the pups were weaned and housed in groups (5–6 from the same treatment regimen per cage). At 3 months, both the CMI and CON rats ($N = 53$ per group) were subjected to the following experiments.

Experimental procedure

The experimental procedure is described in Fig. 1. To analyze the effect of neonatal treatment with CMI on sexual motivation, sexually-naïve males from both groups (CON and CMI, $n = 7$ per group) at 90 days of postnatal life (Fig. 1) were subjected to a sexual incentive motivation test (SIM; for details see the *Sexual Incentive Motivation Test (SIM)* section). At 48 h after the SIM test, all males were subjected to three tests of sexual behavior (at 94, 101, 108 days of postnatal life, as described in the *Assessment of masculine sexual behavior* section). Finally, after these three masculine sexual behavior tests, the animals were once again subjected to the SIM test to analyze the effect of sexual experience on sexual motivation (Fig. 1).

To analyze the effect of administering the gonadal hormones testosterone (T; Androstene-17- β -ol-3-one), 17 β -estradiol (E₂; (17 β)-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol), and dihydrotestosterone (DHT; 5 α -Androstene-17- β -ol-3-one) on alterations of sexual behavior in the CMI rats, one week after the final masculine sexual behavior test, both groups (CMI, CON) were orchidectomized (Orx; for details see the *Orchidectomy* section), except for a sham group, which was incised but without extraction of the testicles. Two doses of E₂ were used, a sub-threshold dose (5 μ g/rat) that reestablished the levels of this hormone to physiological levels, and optimal doses (10 μ g/rat) to restore masculine sexual behavior (Martínez-Mota et al., 2008).

Hormone treatment began 3 weeks after castration (140 days of postnatal life). The CMI and CON rats were subjected to the following treatment regimens for 21 days: A) sham + oil (0.1 ml); B) Orx + oil (0.1 ml); C) Orx + E₂ (5 or 10 μ g/0.1 ml per rat); D) Orx + DHT (1 mg/0.1 ml per rat); E) Orx + DHT (1 mg/0.1 ml per rat) + E₂ (5 or 10 μ g/0.1 ml per rat); and, F) Orx + T (1 mg/0.1 ml per rat). All the steroids administered were previously dissolved in corn oil. All hormones were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Analyses of the SIM test were performed on days 14 and 16 of hormonal treatment (154–156 days of postnatal life; see Fig. 1), and masculine sexual behavior (MSB) was analyzed on day 21 (161 days of postnatal life; see Fig. 1). All animals were housed with seven rats per cage, except for the Orx group ($n = 4$). All behavioral procedures were conducted in a room adjacent to where the rats were housed.

Sexual Incentive Motivation Test (SIM)

One week before SIM testing, all experimental males were familiarized with the SIM arena during three 10-min sessions, separated by 48 h. During these sessions, the incentive animal cages were empty, and before each new session, the arena was carefully washed with a 70% ethanol solution. Experimenters waited until it had evaporated completely before proceeding (5 min). The arena was also washed between subjects during the same session.

The experimental tests consisted of two 10-min sessions in which each experimental male was placed manually in the center of the arena under identical conditions to those of the familiarization assays, except that one of the incentive animal cages contained a sexually-receptive female (sexual incentive), and the other an intact male (social incentive). The position of the incentive animals was changed semi-randomly during the sessions to balance any possible position preference. During the SIM test, researchers measured the time that the

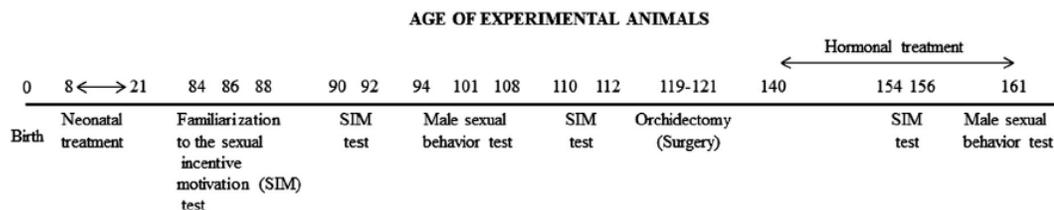


Fig. 1. Timeline illustrating the temporal sequence of events in the experimental manipulations conducted with the animals from birth until the end of hormonal treatment.

male remained in the vicinity of each incentive cage. We registered the time that the experimental rats spent in each incentive zone, considered to be whenever the two anterior paws were inside the zone. The motivational score was calculated by the formula: (time with female) / (time with female + time with male). The SIM test was performed in a rectangular arena (100 × 50 cm with 45 cm-high walls). The floor and walls were made of black acrylic with one opening (25 × 25 cm) on each long side. Behind each opening, an incentive animal cage (25 × 15 × 25 cm high) could be fitted. The front facing the arena was made of double wire mesh (separation = 1 cm; mesh size = 12 × 12 mm), which allowed the rats to hear and smell the animal in the cage but impeded direct physical contact. A virtual – “incentive” – zone of 29 × 21 cm was defined in front of each incentive animal cage. Detailed descriptions of the apparatus can be found elsewhere (Ágmo, 2003; Ágmo et al., 2004; Spiteri and Ágmo, 2006). The female rats were made sexually receptive by administering estradiol benzoate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, at 10 µg/0.1 ml oil, SC) 48 h before the SIM tests. Progesterone (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, at 1 mg/0.1 ml oil, SC) was administered 4 h before the testing.

Assessment of masculine sexual behavior

During these tests, a male was placed in a plexiglass arena (45 cm diameter) 5 min before introducing a receptive female as the stimulus (hormone-treated female, see above). Test duration was 30 min and the sexual behavior tests were performed at 7-day intervals. Behavioral testing was performed under dim red lights 3 h after onset of the dark phase. Tests lasted 30 min after presentation of the female and the following parameters were recorded: latency to first mount; latency to first intromission; latency to first ejaculation; number of mounts (mounts with pelvic thrusting); and intromissions (mounts with pelvic thrusting and penile insertion) during the first copulatory series. In addition, ejaculation frequency (number of ejaculations during 30 min of recording), and post-ejaculatory intervals (time between ejaculation and subsequent intromission) were recorded. The hit rate was calculated as follows: ratio between the number of intromissions and mounts plus intromissions. The full description of masculine sexual behavior parameters has been published elsewhere (Larsson, 1956; see the review in Guevara-Perez et al., 2011).

Orchidectomy

The male rats were orchidectomized under ketamine anesthesia (1 mg/kg ip). Briefly, a single midline incision was made in the scrotum to expose and then remove the testes. The animals were sutured and returned to their home cages following surgery and left to recover for at least 3 weeks before initiating the experiments. In the case of the sham rats, the same single midline incision was made in the scrotum, but the testes were not removed.

Determination of serum 17β-estradiol and testosterone levels by RIA (radioimmunoassay)

To analyze T and E₂ levels, the following groups were sacrificed: CON and CMI males with neonatal treatment only, with no other

manipulation. Both groups were decapitated at three months of age to obtain trunk blood and analyze serum E₂ and T concentrations. Serum was obtained by centrifugation at 1500 rpm for 30 min. Total serum testosterone or estradiol concentrations were measured by radioimmunoassay using the commercial kits TKTT-1 for T and TKE-21 for E₂ measurement (Diagnostic Product Corporation). The procedure used antibody-coated tubes in which 125I-labeled T or E₂ competed with free T or E₂, respectively, for antibody sites in the sample. After incubation, separation of bound T or E₂ was achieved by decanting. The tubes were then counted in a gamma counter, and the counts were inversely related to the amount of T or E₂ present in the serum. Total quantities of T (in pg/ml) or E₂ (in pg/ml) were determined by comparing counts to a calibration curve. Specific activity was 4 µCi. The sensitivity limit for testosterone was 0.0045 ng/ml, and for E₂, 0.13 pg/ml.

Statistical analyses

The percentage of rats that displayed mounts, intromissions and ejaculations before and after hormonal restitution was analyzed with a chi-square test. The effects of neonatal CMI treatment on the copulatory parameters of masculine sexual behavior were also analyzed by a chi-square test. Effects of hormonal supplementation on the sexual behavior of the orchidectomized rats were analyzed using a Kruskal–Wallis test, followed by a Bonferroni-adjusted Dunn’s test. The sexual incentive motivation in the basal condition before and after sexual experience was analyzed using a Kruskal–Wallis test, followed by a repeated means analysis followed by Newman–Keuls; while hormonal supplementation was analyzed using a Kruskal–Wallis test followed by a Bonferroni-adjusted Dunn’s test. CMI effect on serum concentrations of T and E₂ were analyzed by a student’s *t* test.

Results

The effect of neonatal treatment with saline and CMI on sexual incentive motivation in sexually-experienced and -inexperienced adult male rats is shown in Fig. 2. It is clear that the motivation directed towards the sexual incentive diminished in the group treated neonatally with CMI compared to the CON group ($p < 0.05$) after submission to the MSB test ($p < 0.05$), as those males spent less time in the female incentive zone. However, the CMI rats spent the same amount of time in the social incentive zone as in the sexual incentive zone. After the three masculine sexual behavior tests, the time that the CON group rats spent in the female incentive zone increased ($p < 0.05$) while the time spent in the social incentive zone decreased (Fig. 2 panel B); sexual experience decreased the time that CON males spent in the area of social incentive; while treatment with CMI does not modify this time, compared to basal values. In contrast, the CMI-treated rats did not differ in the time spent in the sexual incentive and social incentive zones after submission to three MSB tests, as they attained a preference score near 0.45.

The percentages of CMI and saline rats that displayed mounts, intromissions and ejaculations in the third MSB tests are shown in Fig. 3, where the number of males that showed each of the behaviors is indicated in Table 1 at the top of each parameter. Neonatal treatment with CMI did not affect the percentage of males that mounted, but

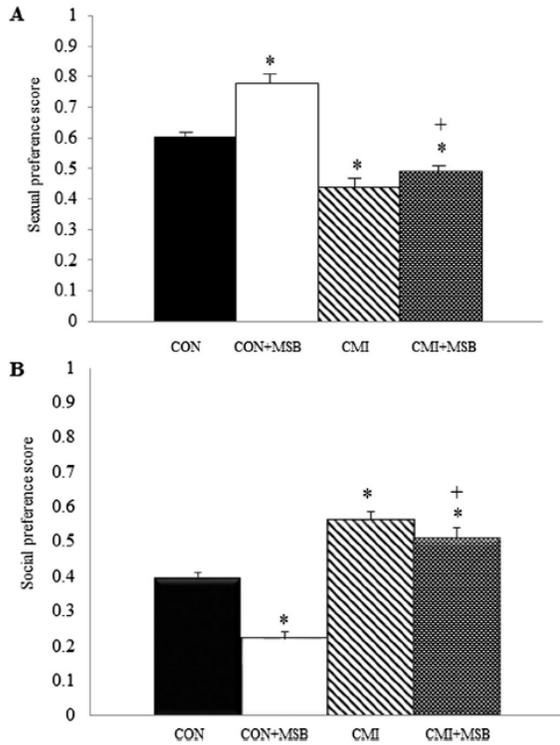


Fig. 2. Effect of sexual interaction on sexual and social motivations in the SIM test. A: MSB increases sexual motivation in the CON group, but does not modify the reduced sexual motivation in the CMI group. Social preference scores. B: Sexual experience decreases the time that the CON rats spent in the proximity of the social incentive. CMI produced no effect. Mean \pm E.E.M., repeated means analysis followed by Newman-Keuls; * $p < 0.05$ vs. CON; † $p < 0.05$ vs. group CON + MSB. Abbreviations: MSB; male sexual behavior.

significantly affected the percentage of intromissions, which decreased to 60% ($p < 0.01$). Moreover, only 10% of those rats ejaculated, compared to the animals treated with saline ($p < 0.01$). This is reflected in the number of ejaculations (2.8 vs 1) in these rats.

With respect to the copulatory parameters of the CMI rats (Table 1), they showed an increase in mount latency ($p < 0.05$) and intromission latency ($p < 0.05$). Only 5 of the 53 CMI rats reached ejaculation in the 30 min of the third test of sexual behavior. Fig. 4 shows the effect of hormonal treatment on the SIM test. Orchidectomy decreased preference scores in CON ($p < 0.01$), but these did not change in the CMI rats. DHT administration did not restore sexual motivation in the CON group ($p < 0.01$) or the CMI males, but, in contrast, administering 5 and 10 μg of E_2 did restore sexual motivation in the CON group on the SIM test, and 10 μg of E_2 induced an increase in the time spent in the female incentive zone by the CMI rats ($p < 0.05$). Similarly, treatment with $\text{E}_2 + \text{DHT}$ restored motivation levels in both CON and CMI males ($p < 0.05$). T administration, meanwhile, restored sexual motivation in males treated neonatally with saline, but failed to restore it in the CMI-treated males, which maintained the reduced time spent in the female incentive zone.

The effects of hormonal treatment with E_2 and $\text{E}_2 + \text{DHT}$ on the orchidectomized CON and CMI rats subjected to the MSB test are shown in Fig. 5. The orchidectomized CON males treated only with oil failed to display sexual activity at any time, but administration of both doses of E_2 (5 and 10 μg) to the CON rats made them highly motivated, as they exhibited ano-genital investigation during all tests and 100% of them displayed mounting and intromissions, though no ejaculations. Meanwhile, the CON rats injected with both doses of E_2 combined with DHT and the T treatment displayed full restoration of sexual behavior with mount, intromission and ejaculation patterns by the third week of treatment. Table 2 shows the number of males that manifested each one of these behaviors according to the different treatment labels, as follows: mount latencies (ML), intromission latencies (IL), ejaculation latencies (EL), number of mounts (NM), post-ejaculatory interval (PEI), and hit rate (HR) for both CON and CMI rats, including those left intact and those that were gonadectomized and treated with E_2 (5 and 10 μg), and E_2 (5 and 10 μg) plus DHT and T. Hormone therapy for 21 days with both doses of E_2 combined with DHT and T proved capable of restoring all sexual behavior parameters in the castrated CON rats, similar to the results seen in the sham CON rats. In the case of the CMI rats, treatment with 5 and 10 μg of E_2 decreased intromission and mount latencies ($p < 0.05$). Hormonal replacement with 5 μg of E_2 , and the dose of 10 μg of E_2 plus DHT restored the different copulatory parameters to levels similar to those of the sham CON rats. Finally, the CMI males treated with 5 and 10 μg of $\text{E}_2 + \text{DHT}$ displayed more numerous ejaculations ($p < 0.05$), but decreased intromission and mount latencies

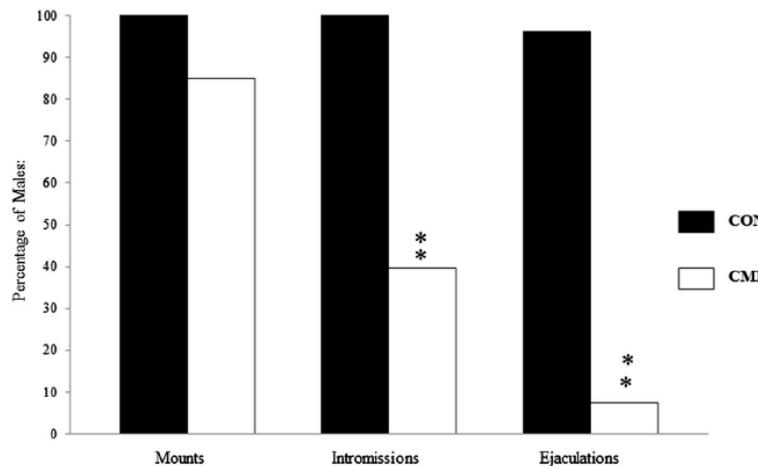


Fig. 3. Effects of neonatal CMI treatment on the percentage of males that displayed mounts, intromissions and ejaculations on the third MSB test. Treatment with CMI caused a reduction in the percentage of males that presented intromissions and ejaculations. χ^2 ** $p < 0.01$ vs. CON.

Table 1

MSB parameters on the third behavioral test. Neonatal CMI treatment caused an increase in mount and intromission latencies. Mean \pm E.E.M.; χ^2 * p < 0.05. Abbreviations: EF = Ejaculation frequency; ML = Mount latency; IL = Intromission latency; EL = ejaculation latency; NM = Number of mounts; NI = Number of intromissions; HR = Hit rate; PR = Refractory period.

	EF	ML	IL	EL	NM	NI	HR	PR
CON (n = 53)	n = 51 2.7 \pm 0.1	n = 53 9.2 \pm 1.0	n = 53 12.6 \pm 1.4	n = 51 457.4 \pm 48.9	n = 51 7 \pm 0.76	n = 51 12.5 \pm 0.8	n = 51 0.67 \pm 0.02	n = 51 380.4 \pm 24.6
CMI (n = 53)	n = 5 1.5 \pm 0.25	n = 45 279.4 \pm 55.1*	n = 21 283.2 \pm 65.7*	n = 5 904 \pm 225.7	n = 5 11.2 \pm 3.9	n = 5 8.2 \pm 1.8	n = 5 0.52 \pm 0.07	n = 5 332.7 \pm 45.9

(p < 0.05). In both groups, T restored all sexual behavior parameters and decreased intromission and mount latencies in CMI rats (p < 0.05). Table 3 shows that CMI treatment did not alter serum T and E_2 levels.

Discussion

Effects of CMI treatment on sexual motivation and execution

The results of these experiments corroborate that neonatal treatment with CMI causes deterioration of the motivational and executive aspects of MSB (Neill et al., 1990; Vogel et al., 1996; Bonilla-Jaime et al., 1998; Bonilla-Jaime et al., 2003), while the increase in mount and intromission latencies and the reduced time spent in the sexual incentive zone during SIM seem to suggest reduced sexual motivation. Chronic treatment with CMI or fluoxetine during neurodevelopment induces long-term modifications of sexual motivation (Vega-Matuszcyk et al., 1998; Gregorian et al., 2002; Clayton and Montejó, 2006), alterations that could be the result of similarly long-term changes in neurotransmission systems and interaction among them, by causing modifications of cerebral maturation due to the manipulation of the serotonergic system in the neonatal phase. The serotonergic system, which is implicated in regulating male sexual behavior (see the review in Hull et al., 2006), is one of the systems most greatly affected by neonatal treatment with CMI, which reduces expression of the 5-HT transporter (Hansen and Mikkelsen, 1998) and the neuronal firing rate in the dorsal raphe nuclei (Yavari et al., 1993). Maciag et al. (2006) suggest that the copulatory deficit induced by neonatal administration of SSRI is due to stimulation of the 5-HT_{1B} receptor, and not the 5-HT_{1A} receptor, based on the fact that neonatal administration of the 5-HT_{1B} receptor agonist (CGB12066B) reproduces alterations in MSB in a way similar to SSRI. Also, previous laboratory studies indicate that administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, to adult CMI rats can stimulate MSB and reestablish the alterations caused by the effects of neonatal treatment with CMI (Bonilla-Jaime et al., 1998).

Thus, it is suggested that this receptor is functional in the structures involved in MSB regulation.

Some studies suggest that the 5-HT₂ receptor seems to mediate alterations in the motivational aspect of sexual conduct, as observations show that neonatal treatment with 5-HT₂ (González et al., 1996), specifically 5-HT_{2A} receptor agonists, reduces sexual motivation (Popova and Amstislavskaya, 2002). In this regard, prenatal exposure to fluoxetine reduced the density of the 5-HT₂ receptor in the hypothalamus (Cabrera and Battaglia, 1994) and frontal cortex in prepubertal rats after prenatal exposure to CMI (De Ceballos et al., 1985). This body of evidence indicates that the reduction of sexual motivation in rats treated neonatally with CMI may be due to an alteration in the 5-HT₂ and/or 5-HT_{1B} serotonergic receptors during neurodevelopment.

Effect of hormonal restitution on MSB and SIM in rats treated with CMI

Sexual hormones are important in the copulatory deficit of CMI rats; thus, hormonal restitution with E_2 + DHT was able to reverse the effects of castration in the CON and CMI subjects by reestablishing all the copulatory parameters evaluated. In addition, it increased the percentage of individuals among the CMI rats that mounted, intromitted and ejaculated, compared to the sham CMI group, suggesting that both hormones are necessary for adequate development of sexual behavior. In rats, MSB is regulated by the sexual hormones (see the review in Hull et al., 2006), including T, which is metabolized to E_2 and DHT (see the review in Mensah-Nyagan et al., 1999). In addition to regulating the performance of copulation, the sexual hormones also play a key role in sexual motivation. Attila et al. (2010) analyzed the participation of different gonadal hormones in sexual motivation using the SIM test to show that neither E_2 nor DHT alone succeed in reestablishing sexual motivation in castrated males, and that only combining the two and administering T reestablished motivation completely. However, they suggest that the estrogens are fundamental in regulating the motivational aspect of MSB by supplying fadrozole, an aromatase inhibitor that can inhibit the effect of T on the sexual motivation incentive. A

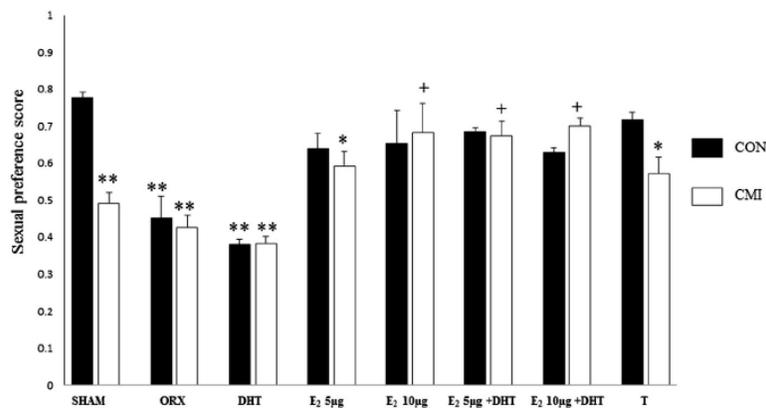


Fig. 4. Effect of administering diverse gonadal hormones on the sexual motivation incentive of rats treated neonatally with saline and CMI. Both the combination of E_2 + DHT and the dose of 10 μ g of E_2 reestablished the sexual motivation altered by treatment with CMI. Mean \pm E.E.M.; Kruskal–Wallis followed by a Bonferroni-adjusted Dunn's test; * p < 0.05 different from CON sham; ** p < 0.01 different from CON sham; + p < 0.05 different from CMI sham; ++ p < 0.01 different from CMI sham.

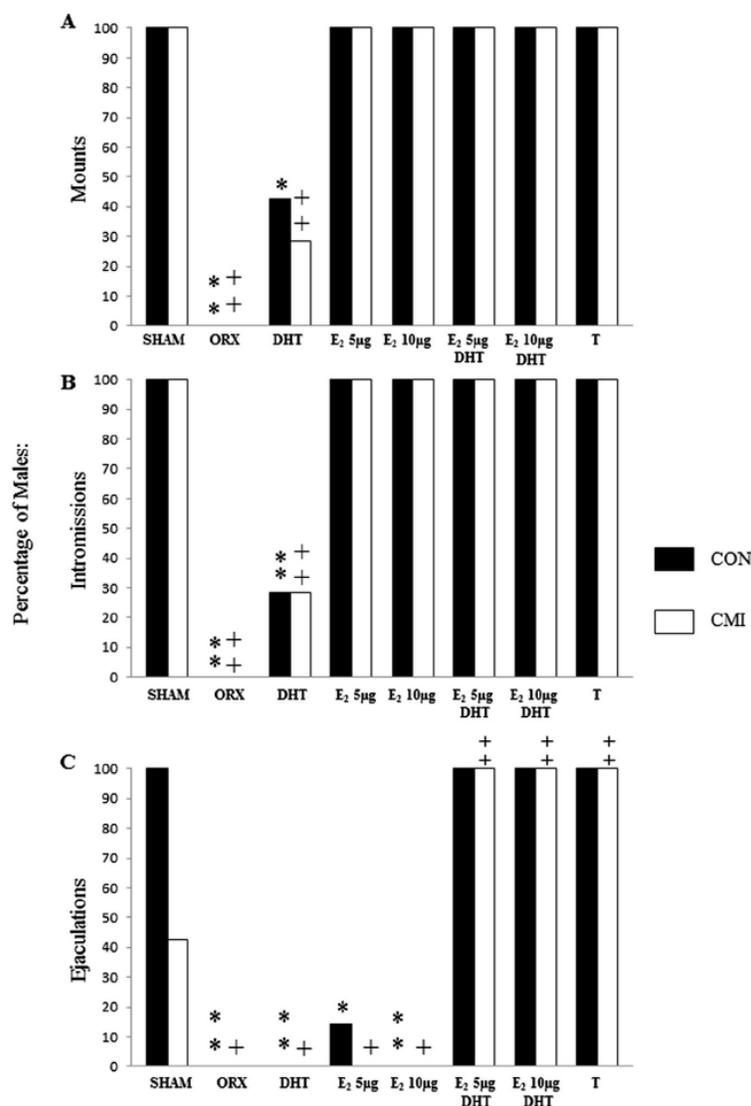


Fig. 5. Effects of hormonal treatment for 21 days on CMI rats on the MSB. Treatment with E₂ and E₂ + DHT reestablished 100% of mounts (panel A) and intromissions (panel B), but only E₂ + DHT restored the ejaculatory pattern (panel C). X² *p < 0.05 different from CON sham; **p < 0.01 different from CON sham; †p < 0.05 different from CMI sham; ††p < 0.01 different from CMI sham.

similar effect can be seen in the male rat by inactivating aromatase (Honda et al., 1998; Taziaux et al., 2007) or reducing T due to stress (McCormick et al., 2013).

Estrogens can be produced in various areas of the brain and exercise a broad range of actions in different neurotransmission systems (see the review in McEwen, 1991). In this regard, E₂ has been shown to have a strong interaction with the serotonergic system at different levels. We know, for example, that it can inhibit the transporter function of monoamines, and interact with some serotonergic receptors like 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} (see the review in Blier, 2001). Recently, it has been reported that the reduction in hormonal levels caused by orchidectomy induces a decrease in 5-HT levels, but increases those of its principal metabolite, 5-HIAA. The levels of both substances in the hypothalamus and hippocampus are restored only by administering E₂ (Bitar et al., 1991), but this effect also reduces the mRNA content of the 5-HT_{2A}

receptor in the dorsal raphe nuclei and the binding sites for this receptor in the nucleus accumbens, the frontal cortex, the cingulate, and the primary olfactory cortex. This can be restored by administering E₂, but not the other non-aromatizable androgens, such as DHT (Summer and Fink, 1998). In this respect, the CMI rats presented serum T levels similar to those of the CON rats, together with normal E₂ levels, thus corroborating previously reported results (Bonilla-Jaime et al., 2003). This finding has been correlated with low cerebral aromatase activity in the mPOA (Portillo et al., 2007). In addition to aromatase activity, there is the possibility of an alteration in ER α expression in key areas that regulate copulation, as occurs in depressive patients, where ER α expression in the prefrontal cortex and the hippocampus is greater (Perlman et al., 2005), or in the Flinders sensitive line for rats (FSL). One animal model of depression presents a reduction in the levels of ER α expression (Osterlund et al., 1999) added to alterations in MSB

Table 2

Copulatory parameter of rats treated neonatally with CMI after 21 days of hormonal treatment. Treatment with E₂ reduced mount and intromission latencies, while the combined E₂ + DHT treatment restored all parameters of sexual conduct in both groups. Mean ± E.E.M.; Kruskal Wallis followed by a Bonferroni-adjusted Dunn's test. *p < 0.05 different from CON sham; **p < 0.01 different from CON sham; †p < 0.05 different from CMI sham; ††p < 0.01 different from CMI sham. Abbreviations: EF = Ejaculation frequency; ML = Mount latency; IL = Intromission latency; EL = ejaculation latency; NM = Number of mounts; NI = Number of intromissions; HR = Hit rate; PR = Refractory period.

	EF	ML	IL	EL	NM	NI	HR	PR
SHAM								
CON (n = 7)	2.8 ± 0.14	30.6 ± 9.9	36.7 ± 8.9	296.1 ± 17.9	4.3 ± 1.1	8 ± 0.7	0.657 ± 0.06	253 ± 15.1
CMI (n = 3/7)	1	238.1 ± 74.8+	326 ± 88.7+	1074 ± 121+	17.7 ± 2.4+	4.67 ± 0.68	0.2 ± 0.04+	700 ± 183.5+
ORX								
CON (n = 4)	0+	-	-	-	-	-	-	-
CMI (n = 4)	0	-	-	-	-	-	-	-
DHT								
CON (n = 7)	0+	106.3 ± 14.5	130 ± 50.5	-	-	-	-	-
CMI (n = 7)	0	175.5 ± 25.8	480.5 ± 122.7	-	-	-	-	-
E₂ 5 µg								
CON (n = 7)	1	30.6 ± 5.6	35.4 ± 5.7	492	7	14	0.7	330
CMI (n = 7)	0	18.9 ± 2.8*	77.1 ± 17.8*	-	-	-	-	-
E₂ 10 µg								
CON (n = 7)	0+	57.3 ± 14.9	491.7 ± 119.4+	-	-	-	-	-
CMI (n = 7)	0	30 ± 14.*	78.6 ± 10.7*	-	-	-	-	-
E₂ 5 µg + DHT								
CON (n = 7)	2.9 ± 0.2	28.6 ± 4.7	36.7 ± 8.7	257.3 ± 38	3.6 ± 1.3	7.4 ± 1.1	0.71 ± 0.1	319.4 ± 7.6
CMI (n = 7)	2.9 ± 0.26*	24.6 ± 5.5*	36.3 ± 4.3*	449 ± 61.5	7.6 ± 1.2	10.6 ± 0.7	0.59 ± 0.4**	289.4 ± 19
E₂ 10 µg + DHT								
CON (n = 7)	2.7 ± 0.2	7.3 ± 0.8	9.1 ± 1.5	370 ± 36	8.6 ± 1.3	9.1 ± 0.7	0.5 ± 0.02	339 ± 9.7
CMI (n = 7)	3.4 ± 0.2*	26.1 ± 4.2*	33.1 ± 4.4*	248.3 ± 47.7*	2.9 ± 0.8*	5.9 ± 0.8	0.7 ± 0.03*	246 ± 9.8*
T								
CON (n = 7)	2.3 ± 0.4	27.1 ± 13.3	52.6 ± 30.7	724.9 ± 233.8	12 ± 4	15.6 ± 4	0.6 ± 0.04	310 ± 33.2
CMI (n = 7)	1.7 ± 0.4	31.7 ± 10.2*	41.1 ± 13.7*	915.7 ± 165.3	8.1 ± 3.7	18.1 ± 3.6	0.7 ± 0.06*	347 ± 27

(Ferreira-Nuño et al., 2002). But it is also well documented that this is low in the locus coeruleus of depressive patients who commit suicide (Ostlund et al., 2003). Moreover, we know that sexual motivation seems to be influenced by previous sexual experience, since inexperienced males show no preference for the odors of a receptive female (Lydell and Doty, 1972). Mounting conduct alone is sufficient for males to begin to manifest preference for a receptive female, showing that performance of copulatory acts is necessary if the female is to acquire incentive properties, and that execution of sexual reflexes fosters learning by functioning as a reinforcer (Stern, 1970). In contrast, a male exposed to a receptive female but without the opportunity to copulate, does not show an increased preference for her. The SIM test showed that the sexual motivation of male rats that had copulated previously increased; though this does not appear to be maintained in the long term (Agmo and Ellingsen, 2003). Similar results were seen in the CON rats, where an increase in incentive sexual motivation in sexually-expert males was observed in comparison to inexperienced males as a reflex of previous sexual interaction.

In conclusion, neonatal treatment with CMI caused alterations in male sexual conduct and reduced incentive sexual motivation. Also, this treatment seems to trigger alterations in the production of, or response to, estrogens at the central level, since administering E₂ + DHT reestablishes both sexual motivation and execution completely; in contrast to T, which does so only deficiently, perhaps by inducing an

alteration of aromatase at the cerebral level, or changes in ERs expression in areas related to copulation which exercise effects through both its genomic pathways and its membrane-initiated (non-genomic) pathway (Vasudevan and Pfaff, 2008), in addition to the participation of the serotonergic in areas involved in execution and sexual motivation.

References

- Agmo, A., 1999. Sexual motivation – an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav. Brain Res.* 105 (1), 129–150.
- Agmo, A., 2003. Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 117, 3–14.
- Agmo, A., Ellingsen, E., 2003. Relevance of non-human animal studies to the understanding of human sexuality. *Scand. J. Psychol.* 44 (3), 293–301.
- Agmo, A., Turi, A.L., Ellingsen, E., Kaspersen, H., 2004. Preclinical models of sexual desire: conceptual and behavioral analyses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78 (3), 379–404.
- Ametislaivskaia, T.G., Gladkikh, D.V., Belousova, I.I., Maslova, L.N., Popova, N.K., 2010. The influence of sexual experience on sexual motivation and copulatory behavior in male rats. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova* 96 (2), 154–162.
- Attila, M., Oksala, R., Agmo, A., 2010. Sexual incentive motivation in male rats requires both androgens and estrogens. *Horm. Behav.* 58, 341–351.
- Beach, F.A., Conovitz, M.W., Goldstein, A.C., Steinberg, F., 1956. Experimental inhibition and restoration of mating behavior in male rats. *J. Genet. Psychol.* 89 (2), 165–181.
- Bitar, M.S., Ota, M., Linnoila, M., Shapiro, B.H., 1991. Modification of gonadectomy-induced increases in brain monoamine metabolism by steroid hormones in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 16 (6), 547–557.
- Blier, P., 2001. Possible neurobiological mechanism underlying faster onset of antidepressant action. *J. Clin. Psychiatry* 62, 7–11.
- Bonilla-Jaime, H., Retana-Marquez, S., Velázquez-Moctezuma, J., 1998. Pharmacological features of masculine sexual behavior in an animal model of depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60 (1), 39–45.
- Bonilla-Jaime, H., Retana-Marquez, S., Vázquez-Palacios, G., Velázquez-Moctezuma, J., 2003. Corticosterone and testosterone levels after chronic stress in an animal model of depression. *Neuropsychobiology* 48, 55–58.
- Cabrera, T.M., Battaglia, G., 1994. Delayed decreases in brain 5-hydroxytryptamine_{2A/2C} receptor density and function in male rat progeny following prenatal fluoxetine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269 (2), 637–645.
- Clayton, A.H., Montejo, A.L., 2006. Major depressive disorder, antidepressants, and sexual dysfunction. *J. Clin. Psychiatry* 67 (6), 33–37.
- De Ceballos, M.L., Benedi, A., Urdin, C., Del Rio, J., 1985. Prenatal exposure of rats to antidepressant drugs down-regulates beta-adrenoceptors and 5-HT₂ receptors in cerebral cortex. Lack of correlation between 5-HT₂ receptors and serotonin-mediated behaviour. *Neuropharmacology* 24 (10), 947–952.

Table 3

Plasma T and E₂ levels in male CON and CMI rats measured by RIA. Treatment with CMI did not modify hormonal levels. Mean ± E.E.M.; Student's t test. *p < 0.05.

	17β-estradiol pg/mL	Testosterone ng/mL
CON n = 8	7.808 ± 0.019	1.2548 ± 0.083
CMI n = 10	7.452 ± 0.022	1.6493 ± 0.102

- Feenstra, M.G.P., Van Galen, H., Te Riele, P.J.M., Botterblom, M.H.A., Mirmiran, M., 1996. Decreased hypothalamic serotonin levels in adult rats treated neonatally with clomipramine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55 (4), 647–652.
- Feng, P.M., Vogel, G.W., 2001. The critical window of brain development from susceptible to insusceptive. Effects of clomipramine neonatal treatment on sexual behavior. *Dev. Brain Res.* 129 (1), 107–110.
- Ferreira-Nuño, A., Overstreet, D.H., Morales-Otal, A., Velázquez-Moctezuma, J., 2002. Masculine sexual behavior features in the Flinders sensitive and resistant line rats. *Behav. Brain Res.* 128 (2), 113–119.
- Gaspar, P., Cases, O., Maroteaux, L., 2003. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (12), 1002–1012.
- González, M.I., Albonetti, E., Siddiqui, A., Farabollini, F., Wilson, C.A., 1996. Neonatal organizational effects of the 5-HT₂ and 5-HT_{1A} subsystems on adult behavior in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54 (1), 195–203.
- Gouvêa, T.S., Morimoto, H.K., de Faria, M.J., Moreira, E.G., Gerardin, D.C., 2008. Maternal exposure to the antidepressant fluoxetine impairs sexual motivation in adult male mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90 (3), 416–419.
- Gregorian, R.S., Golden, K.A., Bahce, A., Goodman, C., Kwong, W.J., Khan, Z.M., 2002. Antidepressant-induced sexual dysfunction. *Ann. Pharmacother.* 36 (10), 1577–1589.
- Guevara-Perez, M.A., Hernandez-Gonzalez, M., Sanz-Martin, A., Amezcua-Gutiérrez, C.A., 2011. La conducta sexual como modelo de conducta motivada y su utilidad para estudiar la actividad cerebral. In: Guevara-Perez, M.A., Hernandez-Gonzalez, M., Sanz-Martin, A., Amezcua-Gutiérrez, C.A. (Eds.), *Registro y análisis automatizado de señales bioeléctricas cerebrales durante la ejecución cerebral*. Second edition Universidad de Guadalajara, Mexico, pp. 19–29.
- Hansen, H.H., Mikkelsen, J.D., 1998. Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic neonatal exposure to a serotonin reuptake inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 352, 307–315.
- Honda, S., Harada, N., Ito, S., Takagi, Y., Maeda, S., 1998. Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp19* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 445–449.
- Hull, E.M., Wood, R.I., McKenna, K.E., 2006. *Neurobiology of male sexual behavior*. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, Amsterdam; Boston.
- Kepler, L.J., Homberg, J.R., 2014. The neurodevelopmental effects of serotonin: a behavioral perspective. *Behav. Brain Res.* (Epub ahead of print).
- Larsson, K., 1956. Conditioning and sexual behavior in male albino rat. *Acta Psychol. Gothoburgensis.* 1, 1–269.
- Larsson, K., Sodersten, P., Beyer, C., 1973. Sexual behavior in male rats treated with estrogen in combination with dihydrotestosterone. *Horm. Behav.* 4, 289–299.
- López, H.H., Olster, D.H., Ettenberg, A., 1999. Sexual motivation in the male rat: the role of primary incentives and copulatory experience. *Horm. Behav.* 36 (2), 176–185.
- Lydell, K., Doty, R.L., 1972. Male rat of odor preferences for female urine as a function of sexual experience, urine age, and urine source. *Horm. Behav.* 3 (3), 205–212.
- Maciag, D., Coppinger, D., Paul, I.A., 2006. Evidence that the deficit in sexual behavior in adult rats neonatally exposed to citalopram is a consequence of 5-HT₁ receptor stimulation during development. *Brain Res.* 1125 (1), 171–175.
- Martínez-Mota, L., Cruz-Martínez, J.J., Márquez-Baltazar, S., Fernández-Guasti, A., 2008. Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88 (3), 332–340.
- McCormick, C.M., Green, M.R., Cameron, N.M., Nixon, F., Levy, M.J., Clark, R.A., 2013. Deficits in masculine sexual behavior in adulthood after social instability stress in adolescence in rats. *Horm. Behav.* 63 (1), 5–12.
- McEwen, B.S., 1991. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Tips. Rev.* 12, 141–147.
- Mensah-Nyagan, A.G., Do-Rego, J.L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletier, G., Vaudry, H., 1999. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 51 (1), 63–81.
- Mirmiran, M., Van de Poll, N.E., Comer, H.G., Van Oyen, H., Boer, G., 1981. Suppression of active sleep by chronic treatment with clomipramine during early postnatal development: effect on adult sleep and behavior in rat. *Brain Res.* 204, 129–146.
- Neill, D., Vogel, G., Hagler, M., Kors, D., Hennessey, A., 1990. Diminished sexual activity in a new model of endogenous depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14, 73–76.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Diario oficial de la Federación.
- Osterlund, M., Overstreet, D., Hurd, Y., 1999. The flinders sensitive line rats, a genetic model of depression, show abnormal serotonin receptor mRNA expression in the brain that is reversed by 17 β -estradiol. *Mol. Brain Res.* 74, 154–166.
- Ostlund, H., Keller, E., Hurd, Y.L., 2003. Estrogen receptor gene expression in relation to neuropsychiatric disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 54–63.
- Perلمان, W.R., Tomaskovic-Crook, E., Montague, D.M., Webster, M.J., Rubinow, D.R., Kleinman, J.E., Weickert, C.S., 2005. Alteration in estrogen receptor alpha mRNA levels in frontal cortex and hippocampus of patients with major mental illness. *Biol. Psychiatry* 58 (10), 812–824.
- Pfaff, D.W., 1970. Nature of sex hormone effects on rat sex behavior: specificity of effects and individual patterns of response. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 73, 349–358.
- Popova, N.K., Amstislavskaya, T.G., 2002. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonin receptors differentially modulate mouse sexual arousal and the hypothalamo-pituitary-testicular response to the presence of a female. *Neuroendocrinology* 76 (1), 28–34.
- Portillo, W., Castillo, C.G., Retana-Márquez, S., Roselli, C.E., Paredes, R.G., 2007. Neuronal activity of aromatase enzyme in non-copulating male rats. *J. Neuroendocrinol.* 19 (2), 139–141.
- Sodersten, P., 1973. Estrogen-activated sexual behavior in male rats. *Horm. Behav.* 4, 247–256.
- Spiteri, T., Agmo, A., 2006. Modèles précliniques du désir sexuel. *Sexologies* 15, 241–249.
- Stern, J.J., 1970. Responses of male rats to sex odors. *Physiol. Behav.* 5 (4), 519–524.
- Summer, B.E.H., Fink, G., 1998. Testosterone as well estrogen increases serotonin 2A receptor mRNA and binding site densities in the male rat brain. *Mol. Brain Res.* 59, 205–214.
- Taziaux, M., Keller, M., Bakker, J., Balthazart, J., 2007. Sexual behavior activity tracks rapid changes in brain estrogen concentrations. *J. Neurosci.* 27 (24), 6563–6572.
- Vasudevan, N., Pfaff, D.W., 2008. Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 238–257.
- Vega-Matuszyk, J., Larsson, K., Eriksson, E., 1998. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sexual motivation in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60 (2), 527–532.
- Vijayakumar, M., Meti, B.L., 1999. Alterations in the levels of monoamines in discrete brain regions of clomipramine induced animal model of endogenous depression. *Neurochem. Res.* 24, 345–349.
- Vogel, G., Neill, D., Hagler, M., Kors, D., 1990. A new animal model of endogenous depression: a summary of present findings. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14, 85–91.
- Vogel, G., Hagler, M., Hennessey, A., Richard, C., 1996. Dose-dependent decrements in adult male rat sexual behavior after neonatal clomipramine treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54 (3), 605–609.
- Yavari, P., Vogel, G.W., Neill, D.B., 1993. Decreased raphe unit activity in a rat model of endogenous depression. *Brain Res.* 611, 31–36.