



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**CONTENIDO Y LIBERACIÓN DE SEROTONINA EN EL HIPOCAMPO VENTRAL  
DE RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE Y SU RELACIÓN CON  
CONDUCTAS TIPO DEPRESIVAS. PARTICIPACIÓN DE LOS  
GLUCOCORTICOIDES.**

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en Biología Experimental

PRESENTA

Mtro. en Biol. Experimental Felipe de Jesús Jiménez Vásquez

Matricula: 2143800900

Comité de tutores

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez (Directora)

Dra. Sandra Adela Orozco Suarez (Asesora)

Dr. Moisés Rubio Osornio (Asesor)

Iztapalapa, Ciudad de México, septiembre de 2021

## Declaración de originalidad

El que suscribe Felipe de Jesús Jiménez Vásquez, alumno del posgrado Doctorado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “CONTENIDO Y LIBERACIÓN DE SEROTONINA EN EL HIPOCAMPO VENTRAL DE RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE Y SU RELACIÓN CON CONDUCTAS TIPO DEPRESIVAS. PARTICIPACIÓN DE LOS GLUCOCORTICOIDES.”,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. jurado para la obtención del grado de DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si esta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 10 de septiembre de 2021.

Atentamente



---

Felipe de Jesús Jiménez Vásquez

## Carta de confidencialidad

Ciudad de México, a 10 de septiembre de 2022

Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental, DCBS

P r e s e n t e

El que suscribe (Felipe de Jesús Jiménez Vásquez) alumno con número de matrícula 2143800900, del posgrado Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación "CONTENIDO Y LIBERACIÓN DE SEROTONINA EN EL HIPOCAMPO VENTRAL DE RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE Y SU RELACIÓN CON CONDUCTAS TIPO DEPRESIVAS. PARTICIPACIÓN DE LOS GLUCOCORTICOIDES" a desarrollar en la UAM-I, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



---

Felipe de Jesús Jiménez Vásquez

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORA

**Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez**

Laboratorio de Neuropsicoendocrinología, Departamento de Biología de la reproducción, Área de Biología Conductual y Reproductiva, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, [rems@xanum.uam.mx](mailto:rems@xanum.uam.mx).

ASESOR

**Dr. Moisés Rubio Osornio**

Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez", [ruomon@gmail.com](mailto:ruomon@gmail.com).

ASESORA

**Dra. Sandra Adela Orozco Suárez**

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades C.M.N. Siglo XXI, [sorozco5@hotmail.com](mailto:sorozco5@hotmail.com).

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.

Para la realización de la tesis de doctorado el alumno Felipe de Jesús Jiménez Vásquez contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca número: 465570.

## Miembros de jurado

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 Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis titulada:

“Contenido y liberación de serotonina en el hipocampo ventral de ratas estresadas prenatalmente y su relación con conductas tipo depresivas. Participación de los glucocorticoides.”

Presentó

M. en B.E. Felipe de Jesús Jiménez Vásquez

El día 10 de septiembre de 2021

---

**PRESIDENTE**

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez  
Ciencias de la Salud, DCBS  
Universidad Autónoma Metropolitana  
Iztapalapa  
Ciudad de México

---

**SECRETARIA**

Dra. María del Carmen Rubio Osornio  
Departamento de Neurofisiología  
Instituto Nacional de Neurología y  
Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”  
Ciudad de México

---

**VOCAL**

Dra. Sandra Adela Orozco Suárez  
Unidad de Investigación Médica en  
Enfermedades Neurológicas.  
Hospital de Especialidades  
C.M.N. Siglo XXI  
Ciudad de México

---

**VOCAL**

Dra. Sonia Galván Arzate  
Departamento de Neuroquímica  
Instituto Nacional de Neurología y  
Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”  
Ciudad de México

“En la vida, a diferencia del ajedrez, el juego continúa después del jaque mate”

Isaac Asimov

## **Agradecimientos**

A la directora de este trabajo, la Dra. María del Socorro Retana Márquez por todos los conocimientos transmitidos, tanto en el ámbito académico y personal, por toda su dedicación, compromiso y gracias a su guía logré concluir esta etapa de mi formación académica.

Al Dr. Moisés Rubio Osornio y la Dra. Sandra Orozco Suarez por su continua participación, por sus valiosos comentarios y apoyo en el laboratorio.

A la Dra. María del Carmen Rubio Osornio por sus palabras de aliento.

A mis compañeros de laboratorio y amigos con los que compartí momentos agradables.

A Diana Méndez Guerrero por todo el tiempo compartido y por su apoyo durante el posgrado, gracias.

A mis padres, a mi abuela y a Christ por su apoyo invaluable e incondicional en los momentos más difíciles.

## Resumen

El estrés prenatal modifica el sistema serotoninérgico en diferentes regiones del encéfalo y altera su síntesis, el metabolismo, los receptores y el contenido de serotonina (5HT) en estructuras como el hipocampo. Sin embargo, actualmente se desconoce si la concentración extracelular de 5-HT se modifica en el hipocampo ventral por efecto del estrés prenatal. En este trabajo se evaluó el contenido y la concentración extracelular de 5-HT y de su metabolito, el ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA), en el hipocampo ventral y su relación con conductas depresivas en la edad adulta en animales estresados prenatalmente, a los tres meses de edad mediante las pruebas de nado forzado (FST) y la ingesta de sacarosa. Así mismo, se evaluó la concentración sérica de corticosterona, como indicador de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. La preferencia de sacarosa fue diferente en los animales estresados prenatalmente: el 69% mostró menor consumo de sacarosa y se les consideró anhedónicos; el 31% restante, tuvo un consumo de sacarosa similar al grupo control, por lo que se les consideró no anhedónicas. Después de la prueba de sacarosa, el contenido y la concentración extracelular de 5-HT en los animales estresados prenatalmente fueron similares a los del grupo control, pero con mayor nivel del metabolito en los controles. Durante la FST, el tiempo de inmovilidad fue mayor y el nado fue menor en los animales estresados prenatalmente. Después de la FST, el contenido de 5-HT disminuyó significativamente en el grupo control, incrementándose su concentración extracelular.

En las ratas anhedónicas, el contenido de 5-HT aumentó significativamente y su concentración extracelular aumentó ligeramente, en el grupo control. Las ratas anhedónicas y no anhedónicas mostraron menor concentración extracelular del metabolito. La concentración de corticosterona en las ratas estresadas prenatalmente fue significativamente mayor en comparación con el grupo control, después de la prueba de sacarosa y los niveles de corticosterona se incrementan en todos los grupos después de FST, pero en mayor proporción en los animales anhedónicos. Estos datos muestran que el estrés prenatal genera conductas tipo depresivas en la descendencia adulta, las cuales están relacionadas con una baja concentración extracelular y menor metabolismo de la 5-HT en el hipocampo ventral, así como con la hiperactividad e hiperreactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

## **Abstract**

Prenatal stress modifies the serotonergic system in different regions of the brain and alters the synthesis, metabolism, receptors and content of serotonin in structures such as the hippocampus. However, it is currently unknown if extracellular concentration of serotonin is modified in the ventral hippocampus as a result of prenatal stress. In this work, the content and extracellular concentration of 5-HT and its metabolite, 5-Hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) in the ventral hippocampus and its relationship with depressive behaviors in adulthood in prenatally stressed animals, at three months of age, using forced swimming test (FST) and sucrose intake was evaluated. Serum corticosterone concentration was also evaluated, as an indicator of the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Sucrose preference was different in prenatally stressed animals: 69% had lower sucrose consumption; the remaining 31% had sucrose consumption similar to the control group, so they were considered as non-anhedonic. After sucrose test, the content and extracellular concentration of serotonin in prenatally stressed animals were similar to those of the control group, but with a higher level of the metabolite in control animals. During the FST, immobility was longer, and swimming was shorter in prenatally stressed animals. After FST, serotonin content decreased in the control group, with increased extracellular concentration. In the anhedonic rats, serotonin content increased, and its extracellular concentration increased only slightly, to a lesser extent than in the control group. The anhedonic and non-anhedonic rats showed lower extracellular concentration of the metabolite.

Corticosterone concentration in prenatally stressed rats was higher, compared to the control group after sucrose test, and increased in all groups after FST, but a greater extent in anhedonic animals. These data show that prenatal stress generates depressive behaviors in adult offspring, which are related to a low extracellular concentration and lower serotonin metabolism in the ventral hippocampus, as well as hyperactivity and hiper-reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal axis.

## Abreviaturas

Ácido gama aminobutírico	GABA
Ácido 5-Hidroxiindolacético	5-HIAA
Análisis de varianza	ANOVA
Cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica	HPLC-ED
Cuerno de Amón 1	CA1
Cuerno de Amón 2	CA2
Cuerno de Amón 3	CA3
Eje hipotálamo hipófisis adrenal	HHA
Glucocorticoides	GC
Hormona liberadora de corticotropina	CRH
Hormona adrenocorticotrópica	ACTH
<i>Locus coeruleus</i>	LC
Monoamina oxidasa A	MAOA
Noradrenalina	NA
Núcleo paraventricular	PVN
Núcleo accumbens	NAc
Prueba de nada forzado	FST
Receptores para glucocorticoides	GR
Receptores para mineralocorticoides	MR
Serotonina	5-HT
Transportador vesicular de monoaminas	VMAT2
Triptófano hidroxilasa 2	TPH2

# Índice

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1.1	Estrés	1
1.1.2	Sistema locus coeruleus-sistema nervioso simpático-médula adrenal	2
1.1.3	Eje hipotálamo hipófisis adrenal	3
1.4	Depresión	11
1.4.1	Hipótesis de la génesis de la depresión	13
1.4.2	Hipótesis noradrenérgica	13
1.4.3	Hipótesis GABAérgica	14
1.4.4	Hipótesis serotoninérgica	15
1.4.5	Modelos animales de depresión	16
1.4.6	Animales anhedónicos y no anhedónicos	17
1.5	Hipocampo	19
1.5.1	Participación del hipocampo ventral en la depresión	22
1.6	Neurotransmisores involucrados en la depresión	24
1.7	Serotonina (5-HT)	25
<b>2</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>28</b>
2.1	Estrés prenatal y el Eje HHA	28
2.2	Ontogenia del hipocampo	31
2.3	Glucocorticoides (GC) y su efecto en la neurogénesis en el hipocampo	32
2.4	Serotonina y estrés prenatal	33
2.5	Conducta depresiva y estrés prenatal	34
<b>2</b>	<b>Planteamiento del problema</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>Justificación</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>Pregunta de investigación</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Objetivo General</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>Objetivos Particulares</b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>38</b>
8.1	Declaración ética	39
8.2	Animales	39
8.2.2	Estrés prenatal	39
8.2.3	Consumo de sacarosa	40

8.2.4 Prueba de nado forzado (FST) .....	42
8.2.5 Contenido de 5-HT .....	44
8.2.6 Microdiálisis.....	44
8.2.7 Evaluación del contenido y la concentración extracelular de 5-HT .....	46
8.3. Contenido del transportador de 5-HT .....	47
8.4 Extracción de corticosterona .....	48
9. Análisis estadístico .....	48
10 Resultados.....	50
10.1 Ganancia de peso de las hembras gestantes .....	50
10.3 Consumo y preferencia de sacarosa .....	51
10.4 Prueba de nado forzado (FST) .....	55
10.5 Contenido de 5-HT y 5HIAA en el hipocampo ventral .....	57
10.6 Tasa metabólica (5HIAA/5HT) .....	59
10.7 Concentración extracelular de 5-HT en el hipocampo ventral.....	60
10.8 Transportador de 5-HT.....	62
10.9 Concentración sérica de corticosterona.....	63
11 Discusión .....	66
11.1 Ganancia de peso en las hembras gestantes .....	66
11.2 Peso de las crías al nacimiento .....	67
11.3 Consumo de sacarosa y conducta anhedónica .....	68
11.4 Prueba de nado forzado (FST) .....	71
11.5 Contenido de 5-HT y su metabolito.....	72
11.6 Concentración extracelular de 5-HT.....	74
11.7 Contenido del transportador de 5-HT .....	75
11.8 Concentración de corticosterona .....	75
12 Conclusiones .....	76
13 Referencias.....	78
14 Artículo científico .....	101
15 Acta de disertación pública .....	115

# **1 Introducción**

A través del tiempo, los organismos han desarrollado estrategias para sobrevivir en el medio ambiente, a pesar de factores adversos como la falta de alimento y agua o la presencia de diversos depredadores que ponen en peligro su vida. Como consecuencia, la respuesta del estrés les ha permitido afrontar estos cambios y sobrevivir. Actualmente los humanos están expuestos a factores estresantes, como la pérdida de un familiar, el desempleo, ambientes de abusos en el trabajo o en una relación sentimental que, si bien no amenazan la existencia, sí pueden activar mecanismos de supervivencia de manera crónica y causar problemas en el estado de salud al presentarse enfermedades en la edad adulta (Johnson et al., 1992; Charmandari et al., 2005; Nicolaidis et al., 2015).

## **1.1 Estrés**

El estrés es una respuesta fisiológica en donde las condiciones medioambientales exceden la capacidad natural reguladora de un organismo en situaciones que son impredecibles e incontrolables (Koolhaas et al., 2011). Los organismos están expuestos a diferentes estímulos, denominados estresores, los cuales pueden ser intrínsecos o extrínsecos, que alteran el equilibrio interno del organismo, estado conocido como homeostasis (Cannon, 1929; Cooper, 2008).

La respuesta del estrés depende de la calidad del estresor, que puede ser físico o emocional, así como de la intensidad y de la duración; sobre esta última, existen dos tipos: el agudo y el crónico (Johnson et al., 1992). Los estresores físicos incluyen cambios en el medio interno, como la anoxia y la hipoglucemia. Los

cambios en el medio externo pueden ser, por ejemplo, la variación extrema de la temperatura. Los estresores psicológicos, que tienen repercusión en las emociones y desencadenan miedo, angustia o frustración, son los activadores más potentes del eje hipotálamo hipófisis adrenal (Porter y Knight, 1972). La respuesta del estrés es llevada a cabo por el sistema de estrés, el cual tiene componentes del sistema nervioso central y componentes periféricos; sus componentes principales son el *Locus Coeruleus*, el Sistema Nervioso Simpático, la Médula Adrenal y el eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA).

### **1.1.2 Sistema locus coeruleus-sistema nervioso simpático-médula adrenal**

La activación del sistema *locus coeruleus*-sistema nervioso simpático-médula adrenal (LC-SNS) permite la liberación de norepinefrina en una densa red de terminales neuronales noradrenérgicas distribuidas por todo el cerebro, lo que resulta en el incremento del estado de alerta y ansiedad. La adrenalina y la noradrenalina también se liberan desde la médula adrenal hacia la circulación general (Figura 1). Es ampliamente aceptado que la activación de este sistema se asocia con ventajas adaptativas durante las situaciones de estrés (Johnson et al., 1992). Este sistema responde rápidamente a diversos estresores y controla una gran variedad de sistemas, como son el cardiovascular, el respiratorio, el gastrointestinal, el renal, y el endocrino (Charmandari et al., 2005).

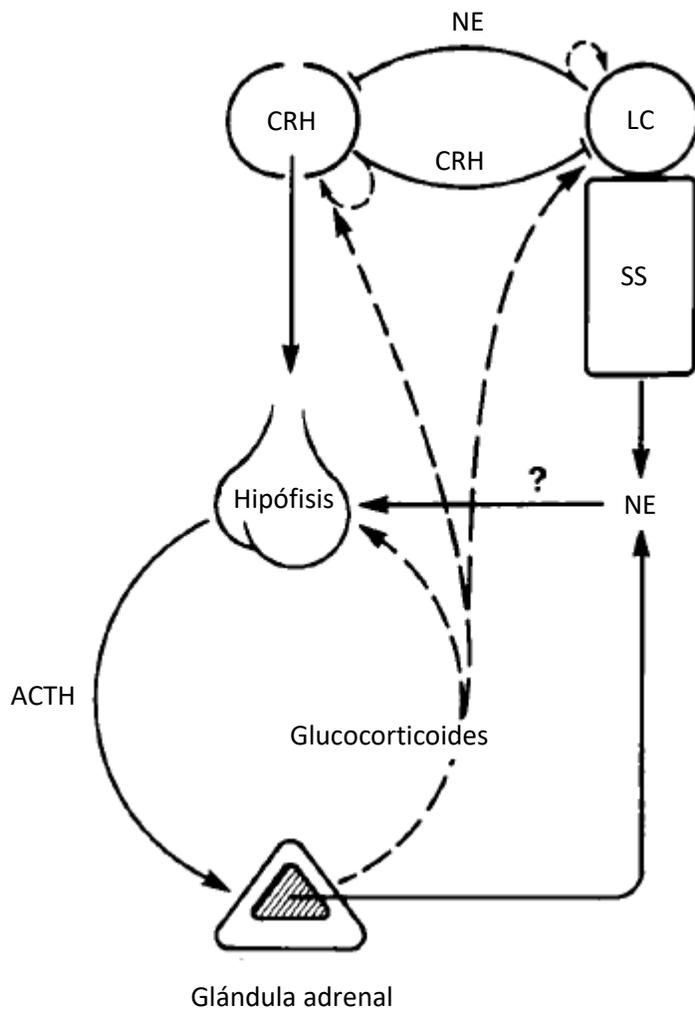


Figura 1. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y del sistema *locus coeruleus*-sistema nervioso simpático-médula adrenal. Estos dos sistemas son los dos principales mecanismos de la respuesta de estrés. NE: noradrenalina; CRH: hormona liberadora de corticotropina; LC: *Locus coeruleus*; SS: sistema simpático y simpatoadrenomedular (Modificado de Johnson et al., 1992).

### 1.1.3 Eje hipotálamo hipófisis adrenal

El eje HHA es un regulador de la homeostasis en los animales. La respuesta del estrés está integrada por componentes conductuales, endocrinos y autonómicos, los cuales se coordinan para neutralizar los efectos negativos de los estresores en

la homeostasis (Johnson et al., 1992). El eje HHA regula su actividad mediante la liberación de glucocorticoides (GC) de la glándula adrenal, y estos mismos finalizan la actividad del eje adrenal mediante la interacción con sus receptores a nivel del hipocampo, la hipófisis y en la glándula adrenal, (Figura 2).

Diversos estresores crónicos, como la inmersión en agua fría, la inmovilización y los choques eléctricos, inducen la síntesis y secreción de la Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH), péptido de 41 aminoácidos, así como de la arginina vasopresina (AVP), péptido de 9 aminoácidos con un puente de disulfuro entre dos cisteínas (Holt y Haspel, 2010), desde un grupo de neuronas localizadas en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo (Flier et al., 1995). La CRH se desplaza por el sistema porta hipofisiario, llega a la adenohipófisis y se une con sus receptores, ubicados en la membrana de los corticotropos hipofisarios, de esta forma estimulan la síntesis y la liberación de la hormona Adrenocorticotrópica (ACTH) hacia la circulación sanguínea periférica.

La ACTH interactúa con sus receptores que se encuentran en las células de la corteza de la glándula adrenal, la cual en los mamíferos está constituida por tres zonas: la zona glomerulosa, que es la externa; la zona fasciculata, la intermedia; y la zona reticularis, la interna. En la zona fasciculata se sintetizan los GC en respuesta a la ACTH (Mitani, 2014). Los GC se liberan de la glándula adrenal hacia la circulación sanguínea, donde el 95% de cortisol circula unido a una alfa globulina llamada transcortina o globulina fijadora de corticosteroides (CBG). La fracción unida al cortisol se considera fisiológicamente inactiva. La pequeña fracción libre de cortisol en el plasma representa la fracción activa de la hormona que ejerce

retroalimentación negativa sobre la liberación de la CRH hipotalámica y de la ACTH hipofisiaria (Siiteri et al., 1982; Johnson et al., 1992). Los receptores para GC se localizan en casi todos los tipos de tejidos y órganos (Kadmiel y Cidlowski, 2013).

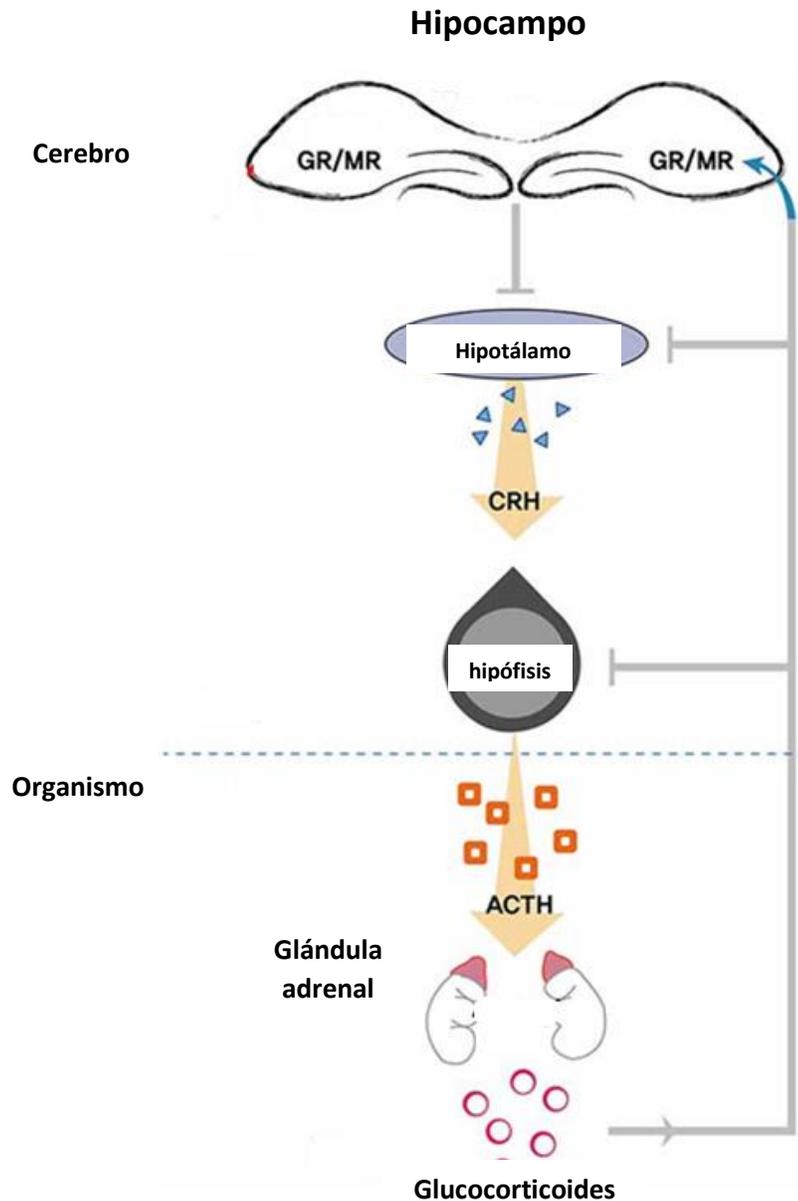
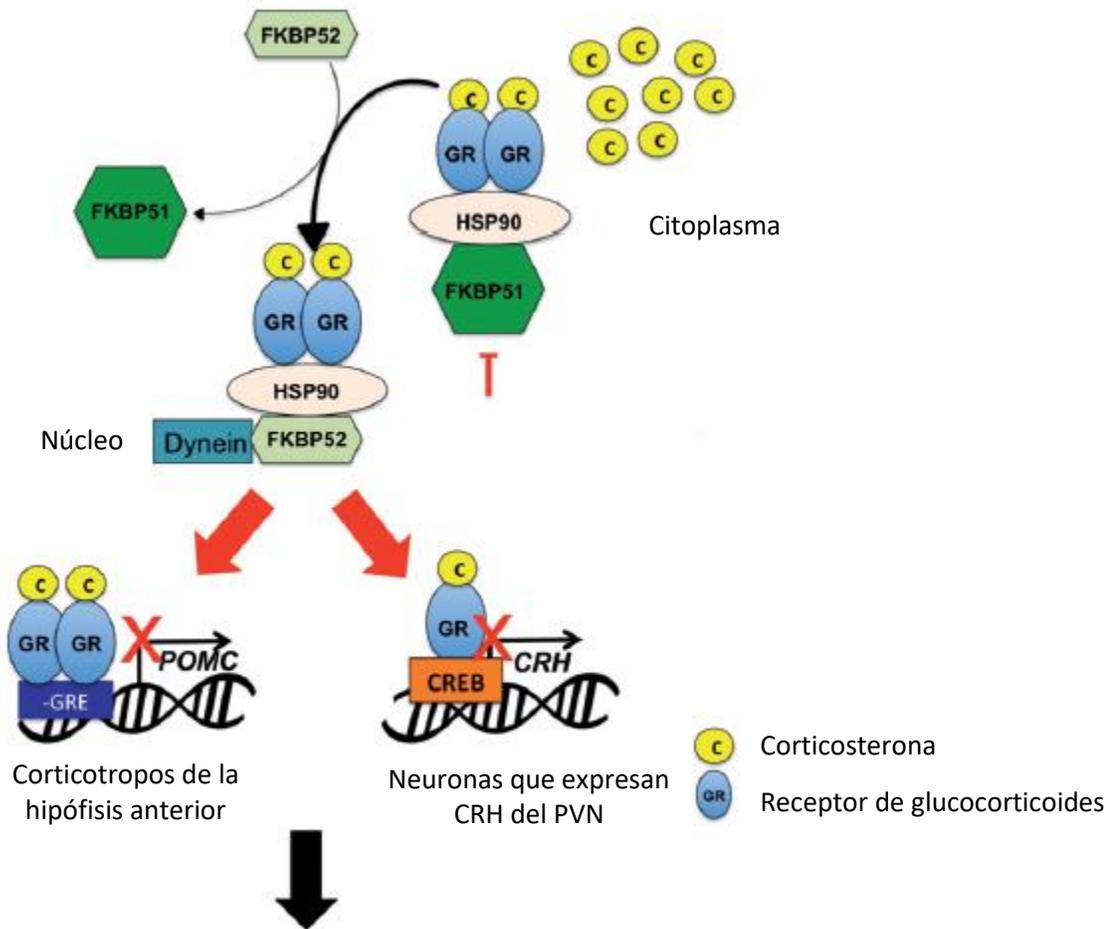


Figura 2. Eje hipotálamo hipófisis adrenal. La exposición a estresores crónicos activa algunas neuronas del núcleo paraventricular, promoviendo la liberación de CRH hacia el sistema porta-hipofisiario para llegar a los corticotropos en la adenohipófisis. La CRH, promueve la síntesis y liberación de la ACTH hacia el torrente sanguíneo. La unión de la ACTH con sus receptores en las células fasciculares de la corteza adrenal promueve la síntesis y liberación de GC. Los GC se unen con sus receptores MR y GR para detener la respuesta del eje adrenal durante la respuesta de estrés (Modificado de Paul et al., 2015).

En el hipocampo se encuentran específicamente dos tipos de receptores: los receptores para glucocorticoides (GR) y los receptores para mineralocorticoides (MR). Los GC tienen un papel muy importante en la regulación de la actividad basal del eje HHA, así como al término de la respuesta del estrés. Los GC interactúan con sus receptores y actúan al nivel de centros extra-hipotalámicos, en el hipotálamo y en la hipófisis. La retroalimentación negativa de los GC en la secreción de la CRH y de la ACTH limita la duración de la exposición del organismo a los GC; minimiza los efectos negativos de estas hormonas sobre el metabolismo, la lipogénesis, la reproducción, así como sus efectos inmunosupresores. Durante el estrés, la interacción de los GC con los MR cambia en menor medida, mientras que GR cambia considerablemente (Johnson et al., 1992). Los MR tienen alta afinidad por los GC y se activan con concentraciones bajas de GC sin la presencia de estresores. Mientras que los GR tienen menor afinidad por los GC, se activan después de la exposición a estresores o durante los picos circadianos y ultradianos. La retroalimentación negativa en la secreción de la CRH y ACTH es regulada mediante los GR, reestableciéndose los niveles de GC a través de la inhibición del eje HHA (Groeneweg et al., 2011).

Los GC pueden atravesar la membrana celular y unirse a los GR y MR en el citosol. Esto ocasiona cambios conformacionales que provoca que los receptores se transloquen al núcleo y se unan al ADN, que activan o reprimen genes blancos (Scheschowitsch et al., 2017). En su estado inactivo, los GR y MR se encuentran predominantemente en el citosol, unidos a proteínas chaperonas, incluidas las de choque térmico hsp90, hsp70, hsp23 y las inmunofilinas pertenecientes a la familia

de proteínas de unión FK506, incluidas FKBP51 y FKBP52 (codificadas por los genes *fkbp5* y *fkbp4*, respectivamente (Echeverria et al., 2009; Riggs et al., 2003). Las proteínas de choque térmico están involucradas en el tráfico intracelular, plegamiento y activación de GR y MR (Pratt et al., 2004), mientras que FKBP51 y FKBP52 regulan la afinidad de GR y MR por la corticosterona y la translocación nuclear (Kirschke et al., 2014; Vandevyver et al., 2012). Los cambios conformacionales por la unión de la corticosterona a los MR y GR hacen que FKBP51 se disocie y FKBP52 se una. Esto permite que los receptores se unan al transportador nuclear dineína y se transloquen al núcleo (Echeverria et al., 2009; Riggs et al., 2003). Además de su papel en la translocación de GR y MR, FKBP51 también participa en la regulación de cinasas, incluidas AKT (cinasa serina/treonina) (Fabian et al., 2013) y GSK3 $\beta$  (glucógeno sintasa cinasa 3) (Gassen et al., 2016), ambas involucradas en la regulación de la actividad de GR (Rogatsky et al., 1998; Stechschulte et al., 2014) (Figura 3).



- Disminución de los glucocorticoides (GC)
- ¿Cambios en los ritmos ultradianos?

Figura 3. Mecanismos hipotéticos de la retroalimentación negativa de los GC sobre la actividad del eje HHA. El GR normalmente se localiza en el citosol con un conjunto de proteínas chaperonas que incluyen FKBP51. El aumento de corticosterona durante el estrés o en el pico circadiano induce el desprendimiento de GR de FKBP51 y su unión a FKBP52, lo que lleva a la translocación nuclear de GR y la unión al ADN. El GR expresado en la hipófisis anterior y en el PVN regula la retroalimentación negativa de corticosterona al reducir la síntesis de POMC y CRH. El tratamiento con FKBP51 facilitará la unión de GR a FKBP52, por lo tanto, el efecto genómico del GR y la inhibición por retroalimentación negativa. Esto finalmente dará como resultado una disminución de la secreción de corticosterona y cambios en los ritmos ultradianos (Modificado de Gjerstad et al., 2018).

Los mecanismos no genómicos o respuesta rápida a los GC son mediados por receptores membranales acoplados a proteína G y difieren entre las áreas del cerebro. En el PVN hay una supresión rápida de la transmisión glutamatérgica (Hill y Tasker, 2012). En el hipocampo, en la región de CA1 y en las neuronas del giro dentado incrementa rápidamente la señalización de glutamato (Karst et al., 2005).

Los efectos provocados por los GC en sus células blanco pueden ser mediados por mecanismos genómicos y no genómicos. El mecanismo genómico consiste en lo siguiente: cuando los receptores se encuentran inactivos, están unidos a proteínas de choque térmico, como HSP90 y HSP70, y a las co-chaperonas, como FKBP5 y BAG1. Cuando los GC atraviesan la membrana celular y se unen a sus receptores citosólicos, las proteínas chaperonas se disocian, el receptor se dimeriza y se transloca al núcleo, en donde se unen a elementos de respuesta para GC y permiten el reclutamiento de factores de transcripción y de la RNA polimerasa, así da inicio la transcripción de genes específicos (Gray et al., 2017) (Figura 4). Algunos de los genes que los GC regulan de manera positiva son GILZ (Cremallera de leucina regulada por GC) y SGK1 (cinasa regulada por suero y GC 1) y de manera negativa, la  $\beta$ -arrestina 2 (Kadmiel y Cidlowski, 2013).

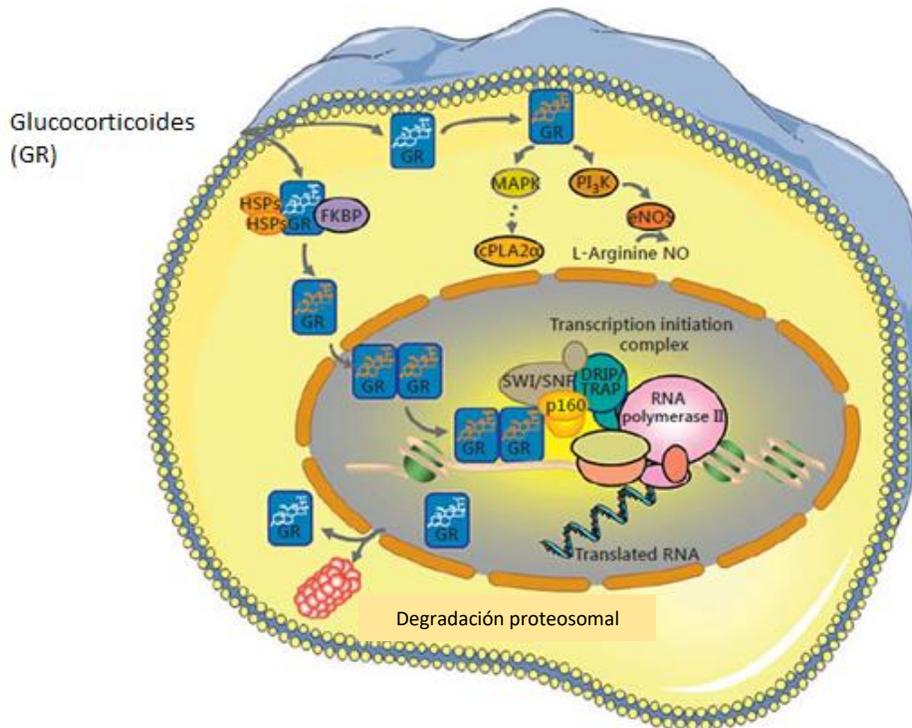


Figura 4. Mecanismo genómico de los glucocorticoides (GC). HSP: proteínas de choque térmico; FKBP: inmunofilinas; p160: coactivadores del receptor nuclear 160; SWI/SNF: Complejo regulador del nucleosoma de levaduras; DRIP/TRAP = Proteínas que interactúan con el receptor de la vitamina D / Complejo de proteínas asociadas con los receptores de hormonas de la tiroides.; MAPK: cinasas de proteína activada por mitógenos; cPLA2 $\alpha$ : fosfolipasa citosólica alfa A2; PI3K: fosfatidilinositol 3 cinasa; eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial; NO: óxido nítrico (Modificado de Nicolaidis et al., 2015) .

## 1.4 Depresión

La depresión se define como un trastorno psiquiátrico que se caracteriza por la combinación de síntomas a nivel psicológico, fisiológico y conductual (Lolak et al., 2014). Existen diversos tipos de depresión y para diagnosticar una depresión mayor se deben presentar síntomas durante un periodo de dos semanas; por ejemplo,

siempre está presente el estado anímico deprimido o la pérdida de interés y placer en realizar actividades. De acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales 5 (DSM-5) (American Psychological Association (APA), 2013), también se manifiestan la pérdida o ganancia de peso, insomnio o hipersomnia, agitación psicomotora o enlentecimiento, fatiga o pérdida de energía, sentimientos de inutilidad, inapropiada o excesiva culpabilidad, disminución en la capacidad para pensar, falta de concentración, indecisión y pensamientos recurrentes de suicidio.

De acuerdo con el manual DSM5, los tipos de depresión que se pueden presentar en las diversas etapas de la vida son:

- El trastorno de desregulación disruptiva del estado de ánimo, describe a los niños con problemas graves conductuales y emocionales, cuya característica prominente es la irritabilidad no episódica o crónica.
- Trastorno depresivo persistente o distimia: es una forma de depresión continua y de largo plazo (crónica).
- Trastorno disfórico premenstrual, es una afección en la cual las mujeres presentan síntomas graves de depresión, irritabilidad y tensión antes de la menstruación.
- Depresión inducida por fármacos, se produce cuando los medicamentos beta-bloqueadores se utilizan para tratar problemas cardíacos y la presión arterial alta.

Se han desarrollado diversos modelos en roedores para medir las conductas tipo depresivas y explicar los mecanismos conductuales, celulares y moleculares que afectan a los humanos por esta enfermedad psiquiátrica (Harro, 2019). Por ejemplo,

se realizan las siguientes mediciones, la anhedonia se evalúa por medio de la prueba de preferencia de sacarosa, además de la auto estimulación craneal, el monitoreo del peso corporal, la duración de las fases de sueño y sus posibles alteraciones, estas últimas mediante electroencefalogramas; la actividad locomotora se mide con la prueba de campo abierto; la prueba de nado forzado (FST) o la prueba de la suspensión de la cola para observar la falta de energía en el roedor; y, por último, la prueba de laberinto acuático de Morris para analizar las deficiencias cognitivas (Czéh et al., 2016).

#### **1.4.1 Hipótesis de la génesis de la depresión**

Se han relacionado diversos neurotransmisores con la generación de la depresión mayor como la noradrenalina, el ácido gama aminobutírico (GABA) y la 5-HT. Existen diversos fármacos que modifican la concentración de estos neurotransmisores en el sistema nervioso y contrarrestan los síntomas depresivos en las personas.

#### **1.4.2 Hipótesis noradrenérgica**

Los niveles de noradrenalina y su metabolito el 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (MHPG) disminuyen en pacientes con depresión; sin embargo, otros autores han observado aumento del MHPG en el plasma y disminuye en la orina de pacientes con depresión (Potter et al., 1993). Otros estudios indican aumento en el número de receptores  $\alpha$ -2 (Meana et al., 1992) y  $\beta$ -adrenérgicos (Mann, 1999) en el hipotálamo y la corteza prefrontal de tejido *post mortem* de víctimas de suicidio que fueron

diagnosticadas con depresión mayor. Asimismo, en modelos animales de depresión, se encontró disminución de las células del *Locus Coeruleus*. El tratamiento con antagonistas para los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  provoca un efecto antidepresivo en roedores, que probablemente ocurre mediante el bloqueo de los receptores adrenérgicos postsinápticos  $\alpha_2$  (Yanpallewar et al., 2011). La administración de BRL44408, antagonista selectivo de los receptores alfa-2A, tiene un efecto antidepresivo y disminuye el tiempo de inmovilidad en la FST (Dwyer et al., 2010). A pesar de que se ha demostrado la efectividad de los fármacos antidepresivos dirigidos al sistema noradrenérgico, el uso de fármacos antidepresivos dirigidos al sistema serotoninérgico es mayor (Nelson, 1999).

### **1.4.3 Hipótesis GABAérgica**

Los hallazgos más importantes que respaldan la hipótesis gabaérgica de la depresión provienen de estudios clínicos que reportan niveles bajos de GABA en el plasma (Petty y Sherman, 1984), en el líquido cefalorraquídeo (Gerner y Hare, 1981) y en el tejido cortical de pacientes con depresión (Honig et al., 1988); y que la concentración de GABA disminuye en las cortezas occipital, dorsomedial y prefrontal (Frederick y Petty, 1995). Esta disminución de niveles GABA sobresale en pacientes con depresión resistentes a los tratamientos (Price et al., 2009). En modelos animales de depresión se encuentra una disminución en la cantidad de receptores GABA<sub>B</sub> en la corteza prefrontal (Martin et al., 1989) y en la subunidad GABA<sub>B1</sub> (Mombereau et al., 2004). En contraste, la densidad de receptores GABA<sub>A</sub> se incrementa en el septum (Kram et al., 2000). El sistema GABAérgico contribuye a la patogénesis de la depresión, sin embargo, no se sabe exactamente cómo

participa este neurotransmisor en la generación de la depresión mayor. La disminución de GABA en diversas áreas cerebrales refleja, probablemente, la disminución en su síntesis y la disminución de la actividad de la enzima la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) (Sanacora y Saricicek, 2008).

#### **1.4.4 Hipótesis serotoninérgica**

La hipótesis serotoninérgica de la depresión mayor propone que la disminución de la concentración de 5-HT en el encéfalo tiene un papel muy importante en la aparición de esta enfermedad (Coppén, 1967). La mayoría de los fármacos para tratar la depresión mayor se enfocan principalmente en el sistema serotoninérgico (Artigas, 2013), su principal objetivo es incrementar los niveles de 5-HT mediante el bloqueo del transportador de 5-HT. También existen los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (SSRI), que son fármacos de última generación que provocan menos efectos secundarios en los pacientes (Serretti y Kato, 2008).

Sin embargo, la hipótesis serotoninérgica de la depresión no cuenta con fundamentos explícitos, debido a la poca claridad de los resultados obtenidos en trabajos clínicos con pacientes y en animales de laboratorio. Algunos autores proponen que sólo se utiliza la hipótesis serotoninérgica como sustento para que las grandes empresas farmacéuticas puedan vender fármacos como los SSRI (Cowen, 2008). Hay evidencia en pacientes depresivos que muestran que hay una disminución en el transporte de 5-HT en las plaquetas (Coppén et al., 1978) y en los bajos niveles plasmáticos del aminoácido triptófano, que es el precursor para la síntesis de 5-HT (Cowen et al., 1989). Trabajos más recientes utilizan la técnica de

tomografía de emisión de positrones (PET) y de tomografía de emisión de fotón único (SPECT) para estudiar el cerebro humano.

En pacientes depresivos, la unión del ligando [carbonyl-11C] WAY-100635 con los receptores 5HT1A disminuye (Drevets et al., 2007). En cambio, en pacientes depresivos con tratamiento farmacológico la unión del ligando [11C] DASB con el receptor 5HT2A se incrementa, mientras que, en pacientes sin tratamiento farmacológico, es decir, personas que se recuperaron de la depresión y personas sanas, la capacidad de unión del ligando [11C] DASB con el receptor no se modifica (Bhagwagar et al., 2006). Como consecuencia, estos resultados no apoyan la hipótesis donde se menciona que el déficit del transportador de 5-HT participa en la generación de la depresión mayor (Bhagwagar et al., 2007).

#### **1.4.5 Modelos animales de depresión**

Los modelos animales son instrumentos desarrollados para el estudio de enfermedades como la depresión; no obstante, es difícil que un modelo animal replique todos los síntomas de esta enfermedad. Estos modelos se han producido para medir alteraciones fisiológicas, endocrinas, neuroanatómicas y conductuales (Deussing, 2006). Así como la conducta anhedónica, la pérdida o ganancia de peso, alteraciones en la locomoción, modificación del ciclo sueño vigilia, déficit cognitivo (problemas en el aprendizaje y la memoria), alteraciones en la conducta social, la actividad del eje adrenal y alteraciones en estructuras cerebrales, como el hipocampo (Czéh et al., 2016).

Se pueden emplear tres criterios para aceptar que un modelo animal de depresión es válido: (1) Los modelos animales deben parecerse a la condición humana en varios aspectos, incluyendo la similitud entre el fenotipo conductual y el perfil de síntomas clínicos (validez de apariencia). (2) El modelo animal se basa en mecanismos neurobiológicos similares a los encontrados en pacientes depresivos que son importantes en la etiología y en su patogénesis (validez de construcción). (3) Mejoramiento o atenuación de los síntomas depresivos por tratamientos clínicamente efectivos y a la inversa y la ausencia de cambios por tratamientos ineficaces del trastorno humano (validez predictiva) (Czéh et al., 2016) (Hao et al., 2019).

#### **1.4.6 Animales anhedónicos y no anhedónicos**

En modelos animales, se ha observado que las ratas que son sometidas a estresores tienen una respuesta de estrés diferente en comparación con ratas control, esta respuesta se puede medir después de pruebas conductuales, como la ingesta de sacarosa. Las ratas anhedónicas disminuyen el consumo de agua con sacarosa, esto se asocia con la incapacidad de sentir placer. Mientras que las ratas no anhedónicas, también denominadas resilientes, no modifican la ingesta de sacarosa y su consumo es similar al de las ratas del grupo control. La separación del grupo de estrés en dos subgrupos permite observar con más claridad los efectos del estrés en los animales.

La anhedonia y la motivación implican muchas regiones cerebrales, pero se restringe principalmente a las regiones límbicas del cerebro y se asocia con una actividad reducida en la vía de recompensa mesolímbica, que son en específico las

proyecciones dopaminérgicas desde el Área Ventral Tegmental (VTA), en el mesencéfalo, hasta el Núcleo Accumbens (NAc), en el Estriado Ventral (Treadway y Zald, 2011). Cuando las ratas son expuestas a estrés crónico leve, muestran conducta anhedónica y son menos sensibles a las recompensas naturales y a las drogas, liberando menos dopamina en el NAc como respuesta a las recompensas (Di Chiara et al., 1999).

La variabilidad en la respuesta de las ratas sometidas a estrés en la prueba de sacarosa se debe al control del medio ambiente y su interacción con la madre durante el desarrollo. Las crías comparten el mismo espacio intrauterino, su posición en el útero tiene efectos significativos en el desarrollo del feto (Ryan y Vandenberg, 2002), pues depende de la posición intrauterina que las crías reciban mayor o menor concentración de hormonas y nutrientes de la circulación sanguínea (Vom Saal y Bronson, 1980). Por ejemplo, la concentración de hormonas liberadas en la madre durante el estrés prenatal en la circulación sanguínea, como la corticosterona no es la misma a la que los fetos están expuestos y la menor exposición podría influir en el desarrollo de la conducta anhedónica después de la exposición a estresores en la vida adulta.

El desarrollo de pruebas conductuales en roedores como la FST, la ingesta de sacarosa y la suspensión de la cola han permitido medir la conducta tipo depresiva en ratas y ratones. El estrés por inmovilización durante toda la gestación incrementa el tiempo de inmovilidad en las crías macho en comparación con las hembras (Alonso et al., 1991). El aumento en el tiempo de inmovilidad en la FST se ha replicado en otros trabajos, entre ellos, donde se utiliza el estrés por inmovilización

desde el día 14 de la gestación hasta el nacimiento de las crías, así se incrementa el tiempo de inmovilidad en las ratas estresadas en comparación con los animales control (Morley-Fletcher et al., 2003). Posteriormente, se ha demostrado que la exposición al estrés solamente por inmovilización en el día 21 de la gestación incrementa el tiempo de inmovilidad en las ratas estresadas prenatalmente (Bernal et al., 2009).

A pesar de que la FST ha sido utilizada por muchos años para verificar el funcionamiento de fármacos antidepresivos y medir la conducta de inmovilidad (Kara et al., 2018), además de analizar que el estrés prenatal aplicado en diferentes etapas de la gestación provoca la manifestación de estas conductas tipo depresivas en los animales, algunos autores proponen que la inmovilidad es solo una respuesta adaptativa y que los roedores se mantienen inmóviles para conservar su energía y sobrevivir más tiempo (Molendijk y De Kloet, 2015).

## **1.5. Hipocampo**

El hipocampo es una región cerebral que forma parte de un grupo de estructuras del sistema límbico llamada formación hipocámpal, la cual incluye al giro dentado, el hipocampo, el subiculum, el presubiculum, el parasubiculum y la corteza entorrinal (Freemon, 1980) (Figura 5).

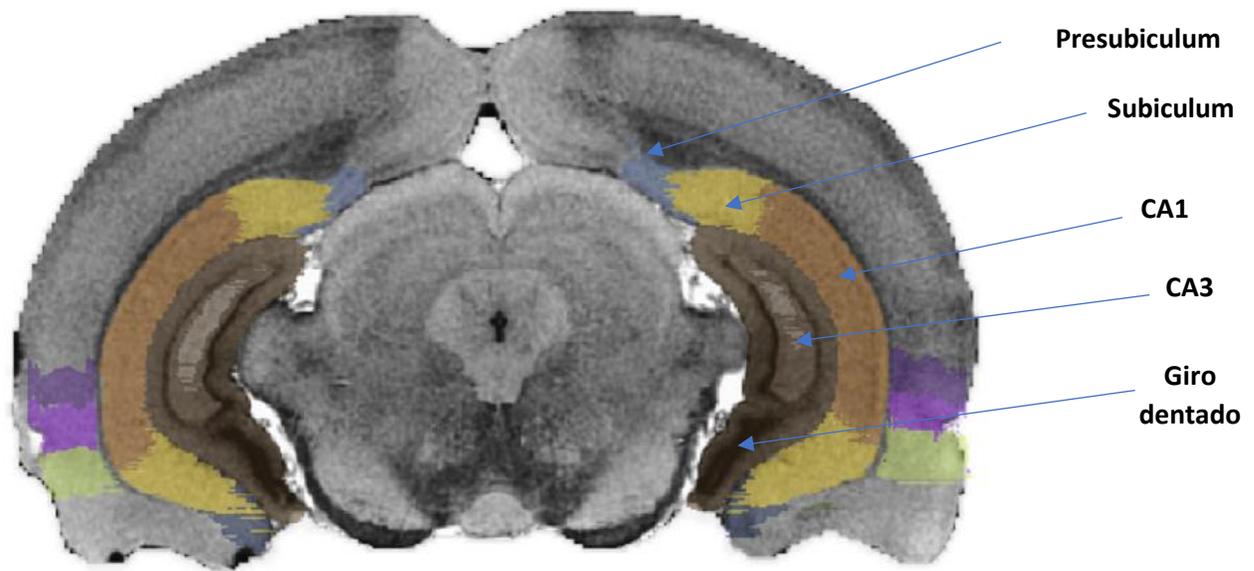


Figura 5. Formación hipocampal. Corte coronal del hipocampo ventral de rata, se muestran las estructuras cerebrales sombreadas en diferentes colores que señalan a las estructuras que componen a la formación hipocampal (Mofificado de Cappaert et al., 2015).

El hipocampo está formado principalmente por neuronas piramidales, distribuidas en capas, la cuales se dividen en tres regiones: cuerno de Amón 1 (CA1), cuerno de Amón 2 (CA2) y cuerno de Amón 3 (CA3); esta clasificación se basa en el tamaño y forma de las neuronas (Cappaert et al., 2015) (Figura 6). A su vez, el hipocampo se divide en hipocampo ventral e hipocampo dorsal, el ventral tiene conexiones más densas con la amígdala y núcleos autonómicos e hipotalámicos en comparación con el dorsal.

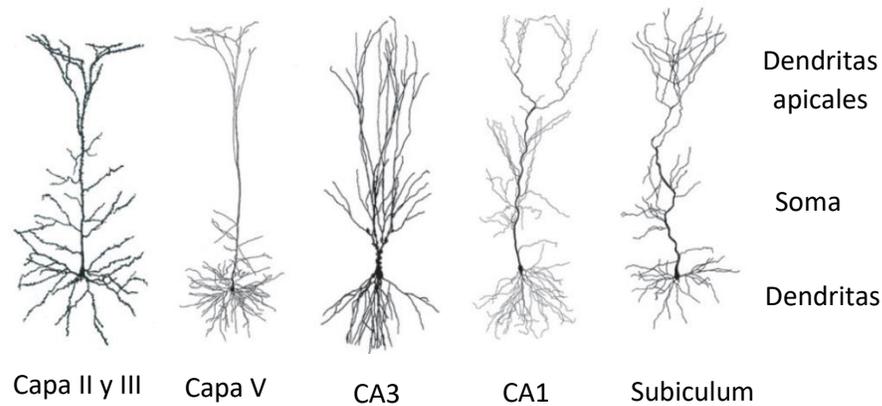


Figura 6. Estructura de las neuronas piramidales. La capa V de las neuronas piramidales tiene dendritas apicales más largas que la capa II y III en la corteza entorrinal. Las ramificaciones de las dendritas apicales las neuronas piramidales de CA3 están más cercanas al soma en comparación con las neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo (Modificado de Spruston, 2008).

El hipocampo ventral envía proyecciones hacia los núcleos medial, intercalado y basomedial de la amígdala y al área de transición entre el hipocampo y la amígdala; en cambio, el hipocampo dorsal distribuye sus eferencias en las regiones laterales de la amígdala. Las proyecciones de las áreas cinguladas (la corteza infralímbica y prelímbica), involucradas en la regulación de las emociones, alcanzan el hipocampo ventral a través de la entrada a las regiones ventromediales de la corteza entorrinal; mientras que la corteza cingulada anterior y el área retroesplenial, involucradas en el procesamiento espacial, se proyectan principalmente al hipocampo dorsal a través de la región lateral y dorsal de la corteza entorrinal (Figura 7). Las proyecciones del hipocampo hacia la corteza entorrinal se originan en la región CA1 y en el subículo, y de esta forma muestran una organización similar a las entradas entre la corteza entorrinal y el hipocampo (Cappaert et al., 2015).



al., 2002). En cambio, las lesiones en el hipocampo ventral alteran la respuesta de estrés y el comportamiento emocional (Henke, 1990; Kjelstrup et al., 2002).

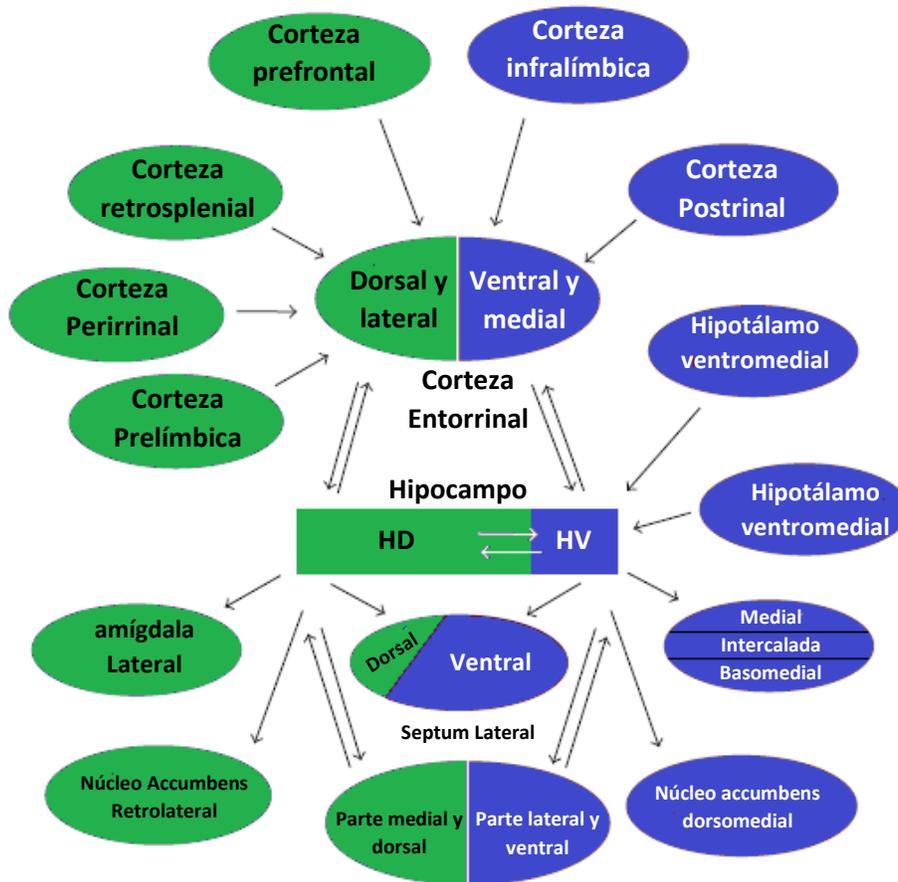


Figura 8. El hipocampo dorsal y ventral tienen diferentes conexiones con estructuras cerebrales corticales y subcorticales, pero en la región intermedia del hipocampo comparten ciertas conexiones. El hipocampo ventral tiene conexiones más densas con la amígdala, el hipotálamo y núcleos autonómicos en comparación con el hipocampo dorsal. Hipocampo ventral HV, hipocampo dorsal HD (Modificado de Grigoryan y Segal, 2016).

## 1.6 Neurotransmisores involucrados en la depresión

En la depresión mayor participan numerosos neurotransmisores como la 5-HT, la noradrenalina, la dopamina, el GABA, el glutamato y la acetilcolina. En la depresión mayor la actividad de las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas en el tallo cerebral está disminuida; en el núcleo del rafe dorsal, la tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas se reduce (Kinney et al., 1997) (Werner y Covenas, 2011); también baja la tasa de disparo de la noradrenalina en el tallo cerebral y la activación de los receptores alfa 1 adrenérgicos (Nutt et al., 2007). En el caso de la dopamina, hay una concentración mínima en el sistema extrapiramidal y en el hipocampo, esta descompensación es regulada por los receptores dopaminérgicos D2 (Nutt et al., 2007).

La participación de la acetilcolina es importante en la depresión, ya que incrementa la liberación de 5-HT mediante la activación de los receptores colinérgicos. Este efecto es observado en el hipocampo dorsal y en la corteza prefrontal medial. En este sentido, la activación de los receptores colinérgicos alfa 7 pueden tener un efecto antidepresivo (Kornum et al., 2006). El neurotransmisor GABA tiene también participación en la depresión a través de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. En el núcleo dorsal del rafe, las neuronas GABAérgicas pueden ejercer inhibición de las neuronas noradrenérgicas a través de los receptores GABA<sub>B</sub>.

El glutamato es un neurotransmisor excitatorio y parcialmente presenta actividad presináptica inhibitoria y ejerce su efecto mediante los receptores ionotrópicos

(NMDA) y los receptores metabotrópicos glutaminérgicos. En la depresión mayor hay disminución o incremento del glutamato que se encuentra en ciertas regiones cerebrales. Los antagonistas para NMDA incrementan los niveles de 5-HT (Palucha, 2006) (Sanacora et al., 2007).

## **1.7 Serotonina (5-HT)**

La 5-HT es una monoamina o indolamina compuesta por un anillo indol, sustituido en el carbono tres por una cadena de dos carbonos con un grupo amino (Nichols y Nichols, 2008). Se localiza en el sistema nervioso central, en el tracto gastrointestinal y en las plaquetas (Muck-Šeler y Pivac, 2011).

En el cerebro hay diversos núcleos formados por somas de neuronas serotoninérgicas localizados en el tallo cerebral cerca de la línea media y pueden dividirse en núcleos superiores e inferiores dependiendo de su ubicación. El grupo superior consiste en cuatro núcleos: el núcleo caudado linear B8, los núcleos del rafe medial B8 y B5, las neuronas laterales que se localizan en posición dorsal a la estructura *Lemniscus Medialis* B9, los núcleos del rafe dorsal B7 y B6. El grupo inferior consiste en cinco núcleos: el Núcleo del Rafe oscuro B2, el Núcleo del Rafe pálido B1 y B4, el Núcleo del Rafe magno B3, las neuronas en la médula ventrolateral y el Núcleo reticular intermedio B1 y B3 (Jacobs y Azmitia, 1992) (Figura 9).

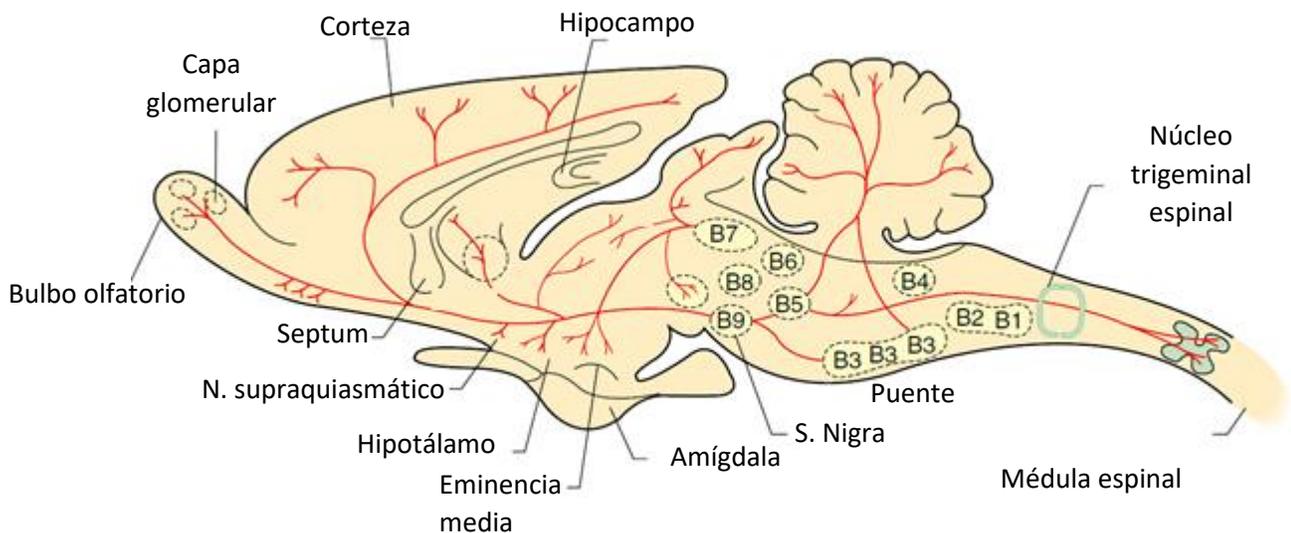


Figura 9. Representación de la localización de los núcleos serotonérgicos del rafe. Se muestra un esquema de cerebro de ratona en una sección sagital y las principales proyecciones de los núcleos del rafe hacia otras estructuras cerebrales (Modificado de Brady et al., 2012).

La tasa de síntesis de la 5-HT en el cerebro está vinculada a la concentración del aminoácido precursor de la 5-HT el L-triptófano, en las neuronas (Fernstrom, 1983). La síntesis de 5-HT se lleva a cabo en los somas neuronales, después es empaquetada en el Aparato de Golgi y transportada por el axón hacia la terminal axónica, donde es almacenada y liberada en la hendidura sináptica en respuesta a la propagación del potencial de acción y despolarización de la terminal axónica; una vez liberada, se une con sus receptores en la membrana de la neurona postsináptica.

La primera enzima en participar en la síntesis de 5-HT es la Triptófano Hidroxilasa 2 (TPH2); esta enzima cataliza la reacción de hidroxilación y forma al 5-hidroxitriptófano. La enzima TPH2 se considera la enzima limitante en la síntesis de 5-HT. Después, la enzima Triptófano Descarboxilasa elimina un grupo carboxilo para sintetizar la 5-HT; inmediatamente se empaqueta en el transportador vesicular de monoaminas (VMAT2), el cual es movilizado mediante transporte axonal hacia la terminal axónica.

La liberación de la 5-HT requiere la fusión de la membrana de la vesícula sináptica con la membrana de la neurona presináptica, para permitir la liberación de la 5-HT hacia la hendidura sináptica. La 5-HT interactúa con sus receptores, localizados tanto en la neurona presináptica como en la postsináptica. Los mecanismos de inactivación de la 5-HT son la recaptura hacia la neurona presináptica mediante el transportador de 5-HT, transportados por el transportador vesicular de monoaminas (VMAT2), para ser reutilizados o bien metabolizados por la monoamina oxidasa A (MAOA), que se encuentran en la membrana interna de la mitocondria de la neurona presináptica.

## **2 Antecedentes**

Durante el embarazo se pueden presentar situaciones estresantes tanto para la madre como para el feto, como enfermedades crónicas o problemas familiares. Estos estresores pueden ocasionar abortos espontáneos, malformaciones en el feto y preclamsia en las mujeres, por lo que el recién nacido puede presentar bajo peso (Mulder et al., 2002). El estrés prenatal afecta al sistema nervioso del feto, esto ocasiona que en la amígdala se incrementen el número de receptores para CRH (Ward et al., 2000), como consecuencia, se expande el núcleo lateral, en el que se procesa el miedo (Salm et al., 2004). En la corteza prefrontal ocasiona disminución en el tamaño y la complejidad de las dendritas apicales (Murmu et al., 2006); en el hipocampo de los primates disminuye la neurogénesis (Coe et al., 2003), la proliferación de células en el giro dentado y la densidad de espinas dendríticas y sinapsis en células piramidales en la región de CA3 (Lemaire et al., 2000). Lo anterior se ha relacionado con la generación de enfermedades psiquiátricas como la ansiedad, la esquizofrenia, y la depresión en la edad adulta (Watson et al., 1999). La utilización de modelos experimentales en roedores sometidos a estrés prenatal permite obtener información acerca de los efectos del estrés prenatal en el sistema nervioso y en el eje adrenal de la descendencia.

### **2.1 Estrés prenatal y el Eje HHA**

El desarrollo del eje adrenal es diferente entre las especies. La hipótesis de la programación fetal fue descrita por primera vez hace tres décadas (Barker et al.,

1989) y sugiere que el medio ambiente intrauterino puede alterar permanentemente la estructura de los órganos y su función durante periodos críticos de la organogénesis y el crecimiento de los tejidos (Charil et al., 2010). En especies como las ratas, los ratones y los conejos la maduración neuroendocrina ocurre en la etapa postnatal (Kapoor et al., 2006). En el día 13 de la gestación de una rata, las glándulas adrenales de los fetos sintetizan y secretan corticosterona; del día 16 al día 19 de la gestación, los niveles de corticosterona en el plasma se incrementan y disminuyen progresivamente. En la rata el RNA mensajero (RNAm) de los GR es detectado en el hipocampo, en el hipotálamo y en la hipófisis en el día 13 de la gestación (Cintra et al., 1993). En el caso de los MR el RNAm aparece en el día 16 de la gestación (Diaz et al., 1998).

Existe una conexión muy importante entre la placenta y el desarrollo fetal cerebral, ya que el estrés materno cambia la función de la placenta y esto tiene efectos negativos durante la gestación en el desarrollo fetal (Uno et al., 1994). En la gestación de humanos, el estrés prenatal activa el eje adrenal de la madre y se incrementa la producción y liberación de la CRH de la placenta. En modelos animales, la aplicación de diversos estresores de forma crónica como choques eléctricos, inmovilización y estrés por inmersión en agua fría, estimula el eje adrenal de la madre gestante. La estimulación crónica del eje adrenal ocasiona el incremento de los niveles de corticosterona en la circulación sanguínea de la madre (Guerrero et al., 2016).

En la placenta, la CRH se incrementa por los GC, en contraste con la producción de la CRH en el hipotálamo, la cual es suprimida por el cortisol y los niveles de CRH

se elevan en el plasma fetal debido al estrés prenatal. La CRH placentaria interactúa con el cerebro fetal y puede influenciar al hipocampo fetal (Kastin y Akerstrom, 2002). Los niveles de GC maternos se incrementan y su interacción con la placenta y el feto aumenta (Mairesse et al., 2007). Debido a su estructura química y naturaleza lipofílica, los GC pueden atravesar la membrana de fosfolípidos de la célula y la barrera placentaria (Kino y Chrousos, 2004). La enzima 11 $\beta$ -hidroxilasa-2 es la enzima placentaria encargada de metabolizar a la corticosterona activa y evita que incremente su concentración en el feto. Sin embargo, la exposición a estresores y la activación del eje HHA disminuye la expresión de la enzima 11 $\beta$ -hidroxilasa-2 y facilita el incremento e interacción de la corticosterona con el feto (Mairesse et al., 2007).

El patrón de los niveles de la ACTH es paralelo a la corticosterona, esto indica que la hiperactividad durante la última etapa de la gestación es regulada por un incremento en la secreción de la ACTH en los corticotropos. En la adenohipófisis, el RNA mensajero de la proopiomelanocortina es detectado en el día 15 de la gestación, se incrementa entre el día 17 y 21; mientras que el contenido de ACTH en la glándula adrenal aumenta entre el día 17 y 19 y disminuye el día 20. La CRH y la arginina vasopresina estimulan la liberación de ACTH de la glándula hipófisis en los días 17, 19 y 21. La CRH se puede detectar en los fetos en el día 17 de la gestación en el área que probablemente será el núcleo paraventricular. Desde ese día, el RNA mensajero de CRH se incrementa progresivamente hasta el día 15 de la etapa postnatal, pero además es detectable desde el día 18 de la gestación y se incrementa a partir de ese momento (Baram y Lerner, 1991).

El estrés aplicado a las madres durante la gestación afecta a diversos componentes del eje HHA de las crías después de nacimiento. La aplicación de estresores durante la gestación disminuye los GR y MR en el hipocampo en el día 21 y 90 de la etapa postnatal (Henry et al., 1994). El estrés prenatal provoca cambios en la secreción de corticosterona regulada por ritmos circadianos e incrementa la concentración de esta misma hormona en la fase de luz en machos y hembras (Koehl et al., 1999), además de modificar la función del eje adrenal a largo plazo. Las crías nacidas de madres estresadas secretan más corticosterona, en comparación con las crías de madres no estresadas, a los 4, 16 y 24 meses de la etapa postnatal. Los niveles de corticosterona basales son más elevados en las ratas estresadas prenatalmente a los 16 meses en comparación con las no estresadas (Vallée et al., 1999). El estrés prenatal también causa incremento del RNA mensajero para CRH en las hembras y eleva la concentración de ACTH en los machos en el día 90 de vida postnatal (McCormick et al., 1995).

## **2.2 Ontogenia del hipocampo**

En los embriones de las ratas, el neuroepitelio, que constituye al primordio hipocampal, tiene tres componentes. De uno de estos se desarrollan las células piramidales del cuerno de Ammón, las células granulares en el giro dentado y la glía, ubicada en la fimbria (red de neuronas que se localizan en el hipocampo) (Bayer y Altman, 1974). El lugar putativo de la fuente de células piramidales del Cuerno de Ammón se detecta el día 14 de la gestación y se considera el neuroepitelio hipocampal. En el día 20 las neuronas piramidales son generadas y partir de ese momento se considera como hipocampo. Desde el día 19 de la

gestación hasta el nacimiento, las células proliferativas migran al giro dentado, siguen una vía curva entre la fimbria y rodean el borde del Cuerno de Ammón (Bayer, 1980). La matriz secundaria produce neuronas granulares maduras que forman el borde superficial de la capa granular; también produce la matriz germinal dentada terciaria que se dispersa a través del hilus del giro dentado durante el periodo perinatal. Entre el día 20 y 30 postnatal, la matriz terciaria desaparece del hilus, pero permanece un remanente (Bayer et al., 1993).

### **2.3 Glucocorticoides (GC) y su efecto en la neurogénesis en el hipocampo.**

La concentración elevada de GC afecta a la neurogénesis, proceso por el cual nuevas neuronas son generadas e integradas en el sistema nervioso central (Akins y Garcia, 2016). El estrés disminuye la proliferación de células progenitoras en el giro dentado del hipocampo, este proceso es general y no depende de la especie, del tipo de estresor o la etapa de la vida (Mirescu y Gould, 2006). En el hipocampo se localizan los GR y MR y se activan de acuerdo con la concentración de GC. En el primer caso, la activación de GR se lleva a cabo a través de las altas concentraciones de cortisol, la disminución de la proliferación de células progenitoras y la diferenciación neural sin afectar la diferenciación de la astrogliá. Por el contrario, en el segundo caso, a través de los MR se presenta una baja concentración de cortisol, se promueve la proliferación de células progenitoras en el hipocampo y la diferenciación de neuronas en astrogliá (Anacker et al., 2013).

Resultan poco conocidos los efectos de los GC que se regulan a través de los MR y GR por la vía no genómica y el impacto en las células progenitoras. La activación

del GR en un cultivo de células progenitoras estimula a ERK1/2 (proteínas cinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares) después del tratamiento con dexametasona y promueve la fosforilación de la conexina 43 (proteínas integrales de la membrana que forman hexámeros llamados conexomas) para disminuir la comunicación intercelular (Samarasinghe et al., 2011).

## **2.4 Serotonina y estrés prenatal**

El estrés prenatal disminuye los niveles de 5-HT en todo el cerebro en el día 56 postnatal (Plaut et al., 1972), la unión de [<sup>3</sup>H] 5HT en el hipocampo y la síntesis de 5-HT en el día 60 postnatal (Peters, 1986). La aplicación de estresores en hembras gestantes, a partir del día 15 hasta el 21 de la gestación, disminuye el contenido de 5-HT y aumentan su metabolito, así como la tasa metabólica en el hipocampo de las crías en el día 35 posnatal (Hayashi et al., 1998). Además, en el día 21 posnatal, se incrementa la concentración del metabolito de la 5-HT y su tasa metabólica en el hipocampo (Ishiwata et al., 2005), lo que causa un fenotipo tipo-depresivo (Mueller y Bale, 2008). Otros estudios, sin embargo, no reportan diferencias en el contenido de 5-HT en el destete (Gemmel et al., 2016) o en la edad adulta (Ishiwata et al., 2005; Van den Hove et al., 2014) El estrés prenatal también causa aumento en el transportador de 5-HT (Bielas et al., 2014), disminuye la unión de la 5-HT con el receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Van den Hove et al., 2006), así como la expresión de este último (Huang et al., 2012) en el hipocampo ventral de la descendencia masculina y femenina en el día 28 posnatal. Además, la inmunorreactividad de la enzima triptófano hidroxilasa en el núcleo del rafe se incrementa (Miyagawa et al., 2011; Van den Hove et al., 2014).

## 2.5 Conducta depresiva y estrés prenatal

El estrés prenatal durante la gestación tiene efectos negativos en las ratas adultas y marca la tendencia a desarrollar conductas depresivas en diferentes etapas de la vida. La conducta anhedónica de las ratas se mide por medio de la prueba de ingesta de sacarosa, esto permite observar la conducta tipo depresiva causada por estresores como la inmovilización y la exposición a luz muy brillante. Se ha reportado que en las ratas hembra el consumo de sacarosa disminuye (Behan et al., 2011); sin embargo, en la mayoría de los trabajos, se utilizan solo a los machos en los cuales se observa que el consumo de sacarosa también disminuye (Basta-Kaim et al., 2014; Głombik et al., 2015; Ślusarczyk et al., 2015). En asociación con la disminución en el contenido de 5-HT en el hipocampo, el estrés prenatal causa conductas tipo ansiosas y tipo depresivas en las hembras y los machos (Soares-Cunha et al., 2018). Asimismo, las ratas estresadas prenatalmente presentan disminución en el consumo de sacarosa como conducta anhedónica (Basta-Kaim et al., 2014; Głombik et al., 2015; Ślusarczyk et al., 2015), además de la conducta de desesperanza aprendida, con mayor tiempo de inmovilidad en la FST (Alonso et al., 1991; Morley-Fletcher et al., 2004; Soares-Cunha et al., 2018). Sin embargo, no es claro si estas conductas están relacionadas con cambios en el contenido y/o la liberación de 5-HT en el hipocampo ventral de los animales estresados.

## **2 Planteamiento del problema**

Los estresores aplicados durante la gestación tienen efectos negativos en las crías parecen alterar la función del sistema nervioso y favorecer el desarrollo de enfermedades psiquiátricas, pues afectan la función de estructuras cerebrales como el hipocampo y el sistema serotoninérgico, esto se relaciona directamente con enfermedades como la depresión y las conductas tipo depresivas en la edad adulta. A pesar de que se han estudiado los efectos negativos del estrés sobre esta estructura, la pérdida de neuronas en la región de CA1 Y CA3, la disminución el tamaño de las dendritas, la densidad de receptores serotoninérgicos y el contenido de 5-HT, se desconoce el efecto que provoca el estrés prenatal en la concentración extracelular de 5-HT después de la prueba la ingesta de sacarosa y de la FST en el hipocampo ventral y su relación con las conductas tipo depresivas.

### **3 Justificación**

El estrés prenatal interfiere con el desarrollo del cerebro fetal, ocasionando menor tamaño del hipocampo, la disminución en la densidad de las dendritas de las neuronas piramidales y del contenido de neurotransmisores como la 5-HT. Por esto, es importante evaluar cómo el estrés prenatal afecta las aferencias serotoninérgicas presentes en el hipocampo ventral y si tienen relación con las conductas tipo depresivas. Si bien se sabe que el contenido de 5-HT se modifica en el hipocampo por efecto del estrés prenatal, la técnica de microdiálisis puede proporcionar información más exacta sobre cómo se afecta la liberación de 5-HT en el hipocampo ventral en la relación con las conductas tipo depresivas.

### **4 Pregunta de investigación**

¿De qué manera el estrés prenatal afecta al sistema serotoninérgico a nivel de la liberación de 5-HT, así como su transportador en el hipocampo ventral en relación con las conductas tipo depresivas?

## **5 Hipótesis**

Las conductas tipo depresivas, generadas por el estrés prenatal, están relacionadas con la disminución en la concentración extracelular de 5-HT en el hipocampo ventral de la descendencia masculina.

## **6 Objetivo General**

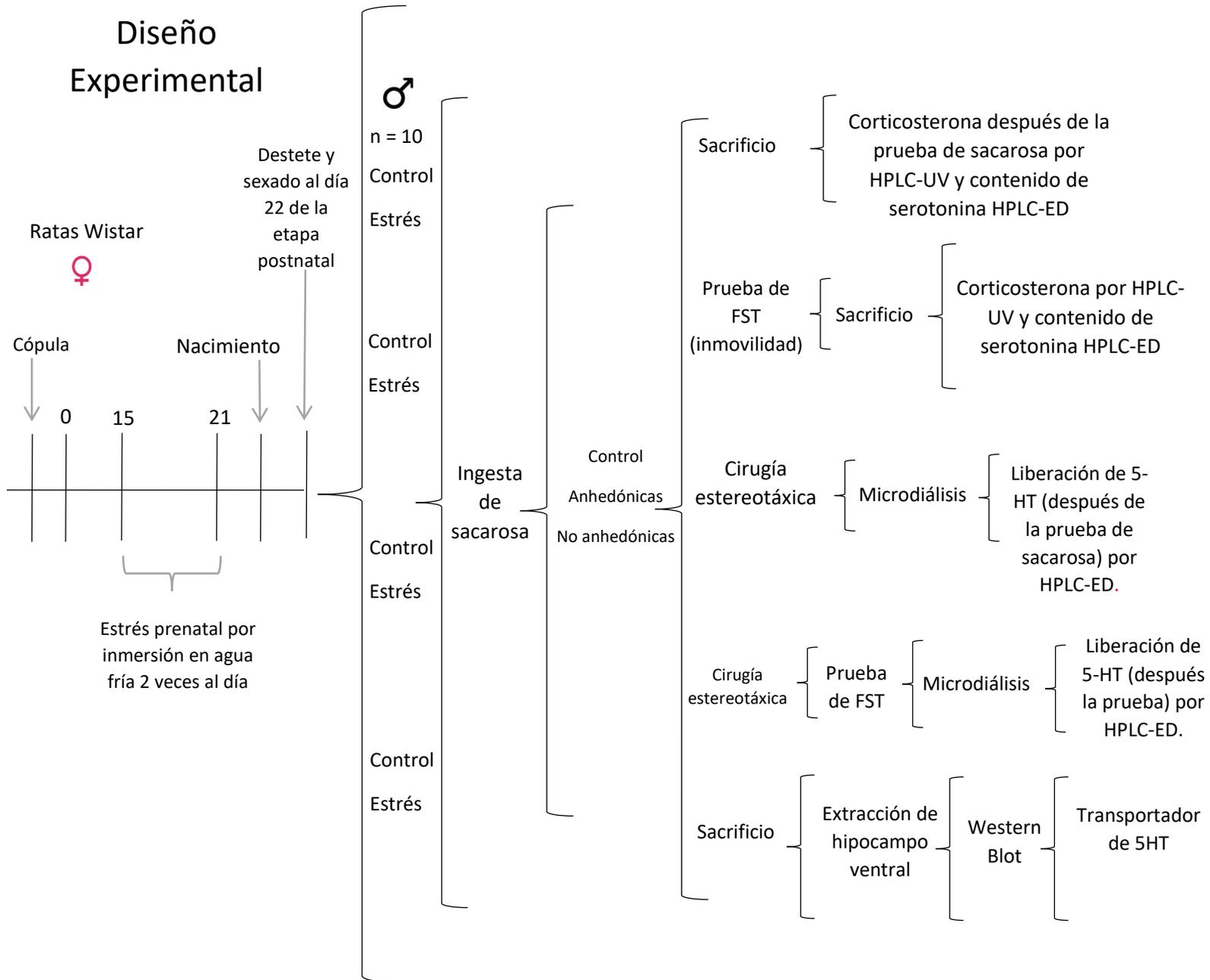
Determinar los efectos causados por el estrés prenatal en la liberación de 5-HT y su metabolismo en el hipocampo ventral, además de la relación con conductas tipo depresivas en la edad adulta.

## **7 Objetivos Particulares**

- Evaluar las conductas tipo depresivas en la descendencia adulta estresada prenatalmente.
- Determinar la concentración extracelular de 5-HT en el hipocampo ventral de las ratas estresadas prenatalmente y su relación con conductas tipo depresivas.
- Evaluar los cambios en el transportador de 5-HT.
- Evaluar la actividad y reactividad del eje adrenal y su correlación con la concentración extracelular de 5-HT y las conductas tipo depresivas en los machos estresadas prenatalmente.

## 8 Materiales y métodos

### Diseño Experimental



## **8.1. Declaración ética**

El manejo de los animales y los experimentos se apegaron a las normas oficiales mexicanas (NOM-062-ZOO-1999), así como a la reglamentación de animales domésticos y de laboratorio, publicado en los lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (mayo, 2010).

## **8.2. Animales**

Se utilizaron ( $n = 20$ ) ratas de la cepa Wistar con un peso de 250 gramos, de dos meses y medio de edad, proporcionadas por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio bajo un ciclo invertido de luz/oscuridad, temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ , con alimento y agua a libre demanda. Se permitió la cópula entre hembras ( $n = 12$ ) machos ( $n = 12$ ) y se consideró ese día como el día cero de la gestación. Las ratas control ( $n = 12$ ) se colocaron en cajas de acrílico individuales, donde se llevó a cabo todo el proceso de gestación. Las ratas del grupo de estrés ( $n = 12$ ) fueron sometidas a estrés por inmersión en agua fría.

### **8.2.2 Estrés prenatal**

Durante la última semana de gestación (día 15 al 21) las hembras gestantes del grupo de estrés se colocaron individualmente en un tanque de agua a una temperatura de  $15^{\circ}\text{C}$ , a una altura de 15 cm, en donde las ratas permanecieron

durante periodos de 15 minutos, dos veces al día (9:00 am y 3:00 pm) (Figura 10). Las hembras del grupo control se mantuvieron en sus cajas con cuidados rutinarios de bioterio. Después del nacimiento, las crías de cada grupo experimental fueron sexadas, pesadas y se homogenizaron las camadas de cada grupo. Las crías fueron destetadas en el día 22 postnatal. Los machos fueron separados de las hembras y sólo se utilizaron a los machos para llevar a cabo las pruebas experimentales de este trabajo.

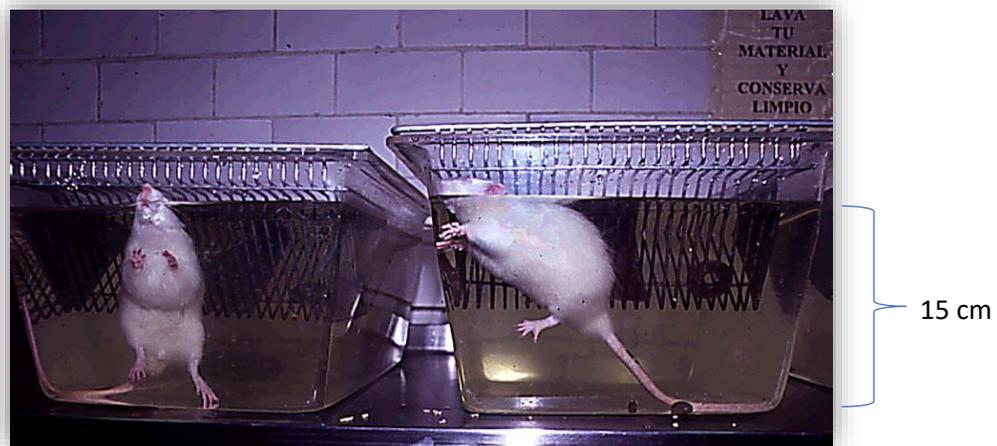


Figura 10. Estrés por inmersión en agua fría. Las ratas se introdujeron a las jaulas de acrílico y permanecieron en el agua (15 °C) por un periodo de 15 minutos, dos veces al día.

### 8.2.3 Consumo de sacarosa

Las ratas macho de dos meses, tanto del grupo control como del de estrés prenatal, se sometieron a la prueba de sacarosa para evaluar la conducta anhedónica en las ratas. A las ratas se les colocó un bebedero con una solución de sacarosa al 3%.

En diferentes trabajos el porcentaje concentración de sacarosa cambia 1% (Muscat y Willner, 1992), 2% (Amchova et al., 2014), 2.5% (Tang et al., 2013), 3% (Kalueff et al., 2006), 4% (Barr y Phillips, 1999) y 7% (Vollmayr et al., 2004). En este trabajo se utilizó una concentración de 3%, la solución de sacarosa se preparó un día antes, se almacenó en el mismo cuarto donde la prueba de sacarosa se llevó a cabo, para equilibrar la temperatura de los bebederos y evitar fuga de líquido, debido al cambio de temperatura y presión interna de los bebederos, cuando el líquido es más frío que el aire del cuarto en donde se hace la prueba. Primero, las ratas tuvieron acceso a los bebederos que contenían sacarosa al 3% por un tiempo de 2 días continuos, en lugar de agua. En los siguientes 3 días, se realizaron pruebas de 1h; las ratas tuvieron acceso a dos bebederos, uno con agua y el otro con sacarosa al 3%. Los bebederos se intercambiaron a los 30 min, para evitar la preferencia de lugar. Antes del último día de la prueba de ingesta de sacarosa, las ratas fueron privadas de agua y alimento por 21 h. En el sexto día, al inicio de la fase oscura, las ratas tuvieron acceso a ambos bebederos con 50 mL de cada líquido (Figura 11). Se evaluó el consumo de cada uno en mL y se expresó en porcentaje (Tang et al., 2013). De acuerdo con el consumo de sacarosa, las ratas se clasificaron en anhedónicas (aquellas que consumieron menos de 32 mL,  $\leq 65\%$ ) y en no anhedónicas (aquellas que consumieron la solución de sacarosa en una proporción similar al consumo en las ratas control, más de 32 mL ( $\geq 65\%$ ), como ha sido definido previamente por varios autores (Bergström et al., 2007; Strekalova et al., 2011). Después de la prueba de sacarosa, los machos fueron eutanizados por decapitación, se obtuvo el hipocampo ventral, se pesó y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta la evaluación del contenido o liberación de 5-HT y de su metabolito, el ácido 5-

hidroxiindolacético, por cromatografía de líquidos con detección electroquímica (HPLC-ED).



Figura 11. Representación esquemática de la prueba de ingesta de sacarosa. Las ratas tuvieron acceso a dos cilindros de agua de 50 ml, uno con sacarosa al 3%, después de media hora se cambió el cilindro de posición en la jaula y evitar la preferencia por un solo lugar.

#### 8.2.4 Prueba de nado forzado (FST)

En otros machos de 2.5 meses de edad, control (n=15) y estresados prenatalmente (n=15), se efectuó la FST (Porsolt et al., 1977) después de la prueba de consumo de sacarosa. Las pruebas se realizaron durante la etapa oscura del ciclo de luz/oscuridad. Las ratas se colocaron de manera individual en un cilindro acrílico de 60 cm de alto por 30 cm de diámetro lleno con agua a una altura de 25 cm. a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C, (Sunal et al., 1994) (Figura 12). Se realizó una primera sesión de 15 minutos, al día siguiente se hizo una sesión experimental de 5 min.

Una vez dentro del cilindro se cuantificó la inmovilidad (considerada cuando la rata flota pasivamente de manera horizontal en el agua y sólo hace los movimientos necesarios para mantener la cabeza por arriba del agua), el tiempo que pasaron nadando y el escalamiento. La conducta de la rata se grabó durante las pruebas con una cámara de video para su posterior análisis. Después de la prueba, las ratas fueron sacrificadas por decapitación para obtener muestras de sangre, se diseccionó el hipocampo ventral para evaluar el contenido de 5-HT. También se colectó sangre del tronco para la evaluación de corticosterona.



Figura 12. Prueba de nado forzado (FST). Se colocan a las ratas en un cilindro lleno con agua a 25° C. Se lleva a cabo una pre-prueba de 15 minutos, al otro día se lleva a cabo la prueba de 5 minutos en donde se cuantifica el tiempo de inmovilidad, nado y escalamiento.

### **8.2.5 Contenido de 5-HT**

Al final de la prueba de 5 minutos de FST las ratas fueron sacrificadas, se removió el hipocampo ventral y se almacenó a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente las muestras se descongelaron, se agregaron  $300\ \mu\text{L}$  de ácido perclórico y se homogenizó el tejido, se colocó en todo momento en hielo y se mantuvo cubierto, después se centrifugaron por 15 minutos a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  a 8000 revoluciones por minuto. El sobrenadante se filtró con una membrana de  $0.45\ \mu\text{L}$  (Sigma) y se inyectaron  $10\ \mu\text{L}$  de la muestra filtrada al sistema cromatográfico (HPLC) para la cuantificación de 5-HT y de su metabolito.

### **8.2.6 Microdiálisis**

Se utilizaron ratas del grupo control ( $n = 10$ ), anhedónicas ( $n = 10$ ) y no anhedónicas ( $n = 5$ ) con un peso inicial de aproximadamente 250 a 350 g. de acuerdo con el manual de coordenadas estereotáxicas (Paxinos et al., 1980) del cerebro de rata es el peso ideal para evitar errores de colocación de la cánula guía. Se anestesió a la rata con ketamina ( $80\ \text{mg/kg}$ , i.p.) y xilazina ( $20\ \text{mg/kg}$ , i.m.). Se utilizó un aparato estereotáxico para fijar a la rata, se utilizaron las coordenadas con respecto a la sutura craneal bregma: anteroposterior  $-5.3\ \text{mm}$ , lateral  $-5.2\ \text{mm}$  y profundidad de  $-7.5\ \text{mm}$  (Paxinos et al., 1980). Se colocó la cánula guía y tornillos, los cuales se fijaron con acrílico dental. Después de 7 días de recuperación se inició la microdiálisis, (Figura 13). Se introdujo una cánula de microdiálisis la cual sobresale  $3\ \text{mm}$  por debajo de la cánula guía y se orientó hacia el hipocampo ventral, después

se fijó la cánula al cráneo con acrílico dental. La parte activa de la cánula de microdiálisis (3mm) consistió en una membrana de poliacrilonitrilo cuyo tamaño de poro es de 40,000 D. Esta membrana permitió la difusión de los compuestos a través de ella por medio de la difusión pasiva, lo cual hace posible la recuperación del contenido intracelular y estimar con exactitud la liberación de neurotransmisores y la concentración de sus metabolitos. Una vez que se introdujo la cánula de microdiálisis en la cánula guía se dejó un periodo de dos horas para permitir la estabilización de ambiente celular en el hipocampo ventral. Se tomaron 2 muestras cada hora (10  $\mu$ L cada muestra) y se inyectaron al sistema cromatográfico (HPLC-ED). En otro grupo de ratas control (n=10) y de estrés prenatal (n=15), se sometieron a la prueba de ingesta de sacarosa y se clasificaron en ratas anhedónicas y no anhedónicas. Posteriormente a las ratas de ambos grupos se les colocó cánulas dirigidas hacia el hipocampo ventral para posteriormente llevar a cabo la microdiálisis. Después de un periodo de 10 días de recuperación, las ratas de los dos grupos se sometieron a una sesión FST de 15 minutos. Al día siguiente se hizo una sesión de FST de 5 minutos, se colocó una cánula de microdiálisis sobresaliendo 3 mm de la cánula guía en el hipocampo ventral y fue asegurada con acrílico dental, se tomaron dos muestras cada hora. Después de la sesión de 5 minutos de FST, dos muestras fueron colectadas cada hora y 10  $\mu$ L de cada muestra fue inyectado en el sistema de cromatografía.

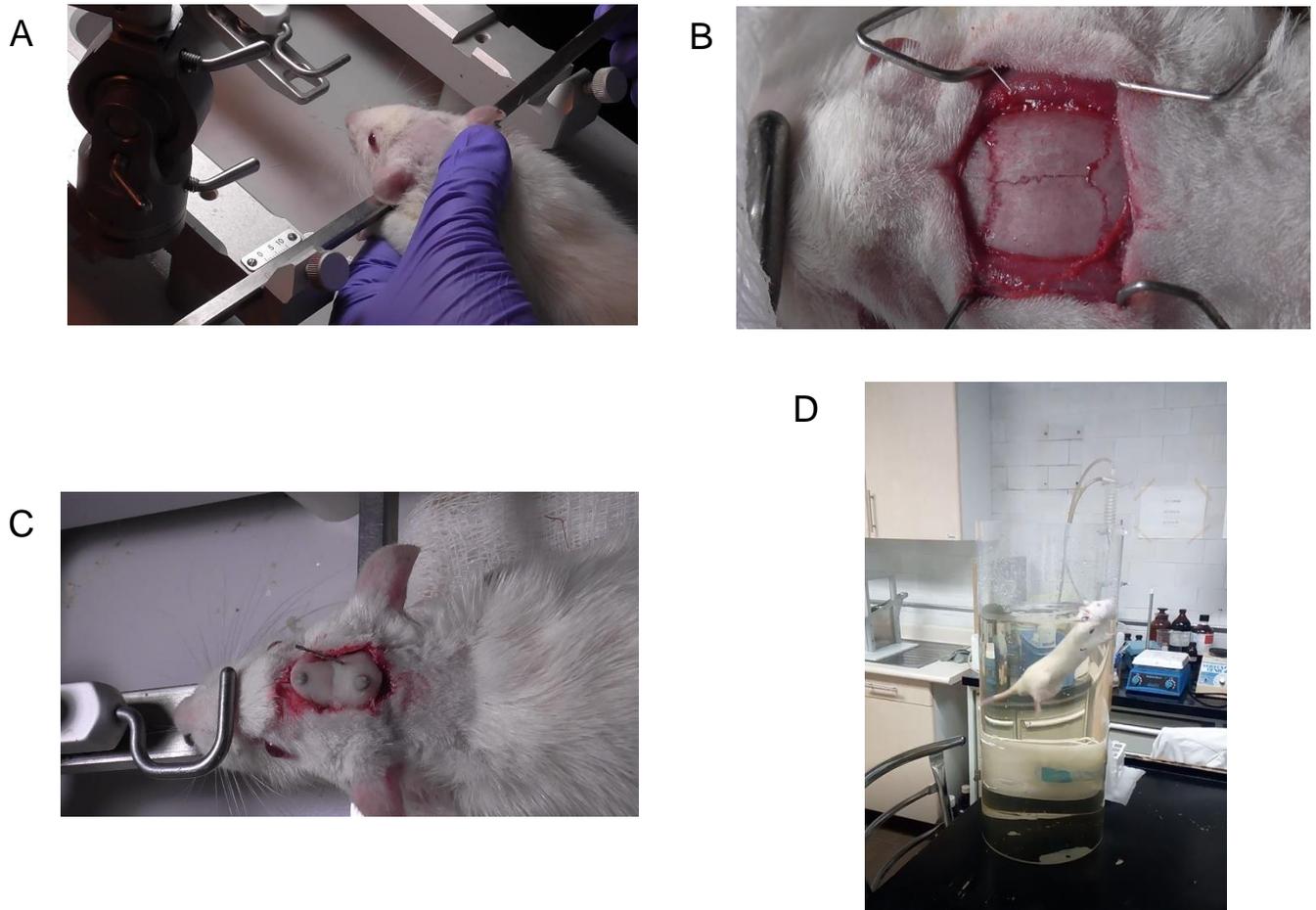


Figura 13. Microdiálisis. Las ratas se anestesiaron y se fijaron en el aparato estereotáxico siguiendo las coordenadas del manual de Paxinos (A). Se retiró la piel y el tejido del cráneo (B) y se hizo una trepanación para colocar la cánula dirigida hacia el hipocampo ventral (C). La cánula se fijó al cráneo mediante tornillos y acrílico dental colocados en el cráneo (D).

### 8.2.7 Evaluación del contenido y la concentración extracelular de 5-HT

La evaluación del contenido y la concentración extracelular de 5-HT se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ED). Para ello se utilizó una bomba marca Waters modelo 515, acoplada a

un detector electroquímico Waters modelo 2465, un inyector manual Rheodyne. Se empleó una columna symmetry C18, tamaño de partícula 2.5  $\mu$ m x 25 mm; Waters Corp., Milford, MA, USA. Se utilizó una fase móvil de fosfatos a un pH de 3.1 a un flujo de 0.3 ml/minuto, a una sensibilidad de 2 nA, potencial +800 mV. Los resultados fueron analizados usando el programa Milenium 32, (Waters Milford, MA, USA).

### **8.3. Contenido del transportador de 5-HT**

El tejido del hipocampo ventral del grupo control (n=3), anhedónicas (n=3) y no anhedónicas (n=3) se homogeneizó en un buffer de lisis (50mM Tris-HCL, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, pH 7.5). El contenido de proteína en los homogenados se determinó de acuerdo con el método de Bradford. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12 % y se llevó a cabo la electroforesis a 120 V durante 90 minutos. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 2 horas a 350 miliampers. Después, la membrana se bloqueó en PBS-Tween que contenía leche Svelty al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Después de los lavados, las membranas fueron incubadas durante toda la noche con anticuerpos policlonales (Genetex) para el transportador de 5-HT a una dilución final de 1:1000. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario 1: 2000 (Vector Laboratories Inc.) durante dos horas. Las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia mediante la solución HRP -Luminata Crescendo Western (WBLURO500 Merck), las bandas se analizaron con el fotodocumentador (Molecular Imager Fusion FX, Vilber, France). La densitometría se realizó con el programa Western Blot Image Studio.

## **8.4 Extracción de corticosterona**

La corticosterona sérica se evaluó en las ratas antes y después de la FST en las ratas control, en las anhedónicas y en las no anhedónicas. Para la extracción de la hormona, el suero (1ml) se mezcló con 100  $\mu$ l de una solución de 19-nortestosterona (5  $\mu$ g/ml en metanol) como control interno. La corticosterona se extrajo en 5 ml de dietil éter-diclorometano (60:40 v/v) y se centrifugo por 5 minutos a 8000 revoluciones por minuto. La fase orgánica fue centrifugada por un minuto con 1 ml de agua grado HPLC. Después de la segunda centrifugación, la fase orgánica (3 ml) se evaporó a temperatura ambiente. Los residuos fueron disueltos en 100  $\mu$ l de metanol-agua (60:40 v/v). La precolumna (Symmetry C18, tamaño de partícula 3.5  $\mu$ m, 2.1 10 mm; Waters Corp., Milford, MA, USA) y la columna fue calibrada usando agua y acetonitrilo grado HPLC (65:35 v/v) a un flujo de 0.4 ml/min. La separación fue hecha a 40°C en una columna Waters Symmetry C18 (tamaño de partícula 5  $\mu$ m; tamaño de columna de 2.0 x 150 mm; Waters Corp., Milford, MA, USA). Se utilizó un sistema controlador 600-MS para transportar la fase móvil y los esteroides usando un detector UV Waters 486 (250 nm). Los resultados fueron analizados usando el programa Milenium 32 (Waters Corp., Milford, MA, USA).

## **9. Análisis estadístico**

El peso de las ratas gestantes se analizó mediante regresión lineal y comparación de las pendientes de las curvas. El peso de las crías al nacimiento se evaluó con

una t-Student. La ingesta, la preferencia y el consumo de sacarosa en relación con el peso, la prueba de la FST se evaluó con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey. Las concentraciones de corticosterona, el contenido y concentración extracelular de 5-HT y de su metabolito, así como las tasas metabólicas, se evaluaron con una ANOVA de dos vías, con la condición y el tiempo como factores. Se utilizó una correlación de Pearson para la corticosterona vs el contenido y la concentración extracelular de 5-HT, así como con la ingesta de sacarosa; también se evaluó la correlación entre el contenido y la concentración extracelular de 5-HT vs la inmovilidad, el nado y la ingesta de sacarosa. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . Se utilizó el programa estadístico GraphPad PRISM versión 6.01 (GraphPad Software Inc. USA).

## 10 Resultados

### 10.1 Ganancia de peso de las hembras gestantes

Las hembras gestantes que se sometieron a estrés por inmersión en agua fría mostraron menor ganancia de peso en comparación con las hembras gestantes del grupo control. La pendiente de la curva del grupo control  $10.66 \pm 0.8477$ , fue diferente en comparación con la pendiente de la curva del grupo de estrés materno  $7.784 \pm 0.6725$  ( $p = 0.018$ ). La ganancia de peso en gramos a través de los días de la gestación fue menor en las ratas del grupo de estrés en comparación con las hembras control y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) para el grupo control fue de 0.9816 y para el grupo de estrés prenatal 0.9749 (Figura 14).

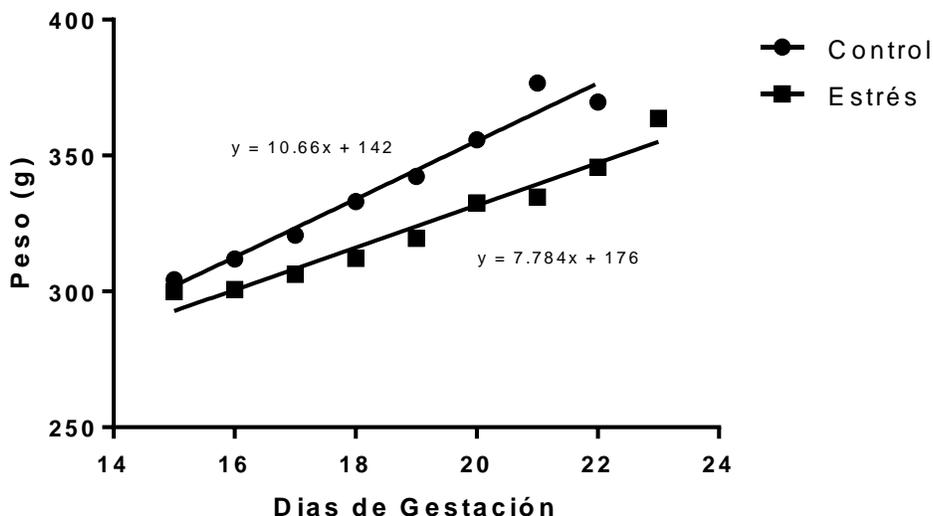


Figura 14. Ganancia de peso de las ratas gestantes del día 15 al 23. El estrés por inmersión en agua fría causó menor ganancia de peso durante la gestación. El coeficiente de correlación del grupo control fue de 0.9898. El coeficiente de correlación para el grupo de estrés prenatal fue de 0.9749. La pendiente del grupo de estrés fue menor en comparación con el grupo control,  $p = 0.018$ .  $n = 10$  por grupo.

## 10.2 Peso de las crías al nacimiento

El peso al nacimiento de las crías machos estresadas prenatalmente fue menor al de las ratas control,  $p = 0.0033$ . (Figura 15). No se observaron diferencias en la duración de la gestación ni en el número de crías machos y entre los grupos.

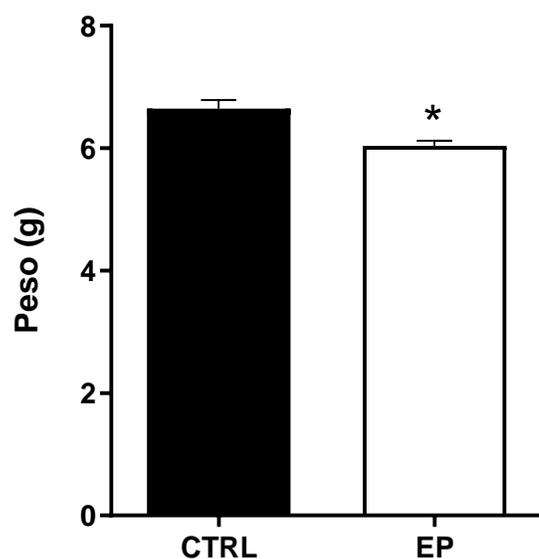


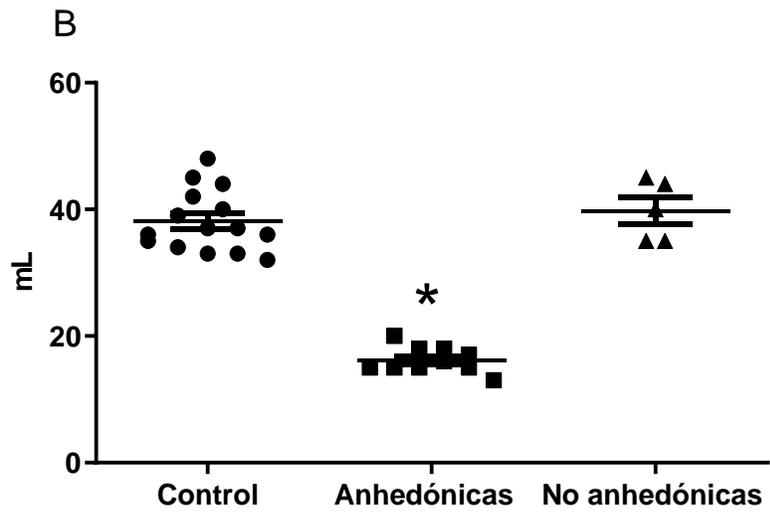
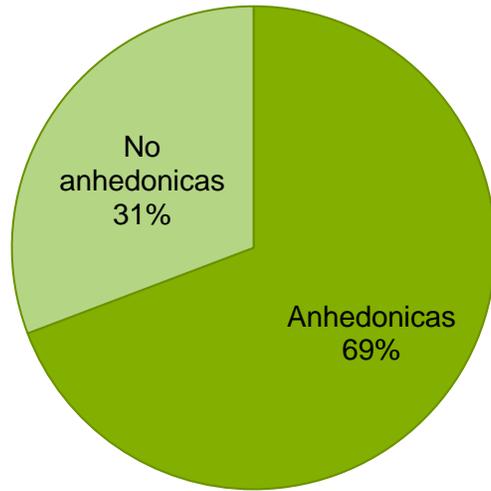
Figura 15. Peso de las crías macho en el nacimiento. El peso de los machos estresados prenatalmente (EP) ( $n = 15$ ) fue menor que el de los machos control (CTRL) ( $n = 15$ ). Los datos se muestran como la media  $\pm$  E.E. Los resultados se analizaron con la prueba de t-Student. \* $p = 0.0033$  respecto al grupo control.

## 10.3 Consumo y preferencia de sacarosa

Se llevó a cabo la prueba de sacarosa en las ratas del grupo control y de estrés prenatal para medir la conducta de anhedónica en las ratas. Como resultado de la prueba del consumo de sacarosa, se observó que el 69% de las ratas estresadas prenatalmente eran anhedónicas, ya que tuvieron un menor consumo de sacarosa.

El 31% restante se consideró no anhedónicas, ya que su consumo y preferencia de sacarosa fue similar al de las ratas control (Figura 16A). El consumo total de la solución con sacarosa en las ratas anhedónicas fue menor en comparación con el grupo control y con las ratas no anhedónicas (Figura 16B). El consumo de sacarosa se reporta en mililitros; sin embargo, una gran cantidad de trabajos recomienda la preferencia de sacarosa para medir la conducta anhedónica, ya que el consumo de sacarosa puede ser influenciado por la restricción de alimento y de agua, así como por de la intensidad de los estresores utilizados. Al evaluar el porcentaje de preferencia de sacarosa, se observó que éste también fue menor en las ratas anhedónicas (Figura 16C). También se ha observado que hay una variación mayor en los valores obtenidos del consumo de sacarosa en comparación con la preferencia de sacarosa, por lo que el uso de la preferencia de sacarosa como parámetro para evaluar la conducta anhedónica disminuye la variación observada en el consumo de sacarosa individual de cada animal (Strekalova et al., 2011). En este trabajo, se observó que el porcentaje de la preferencia de sacarosa en las ratas control y no anhedónicas fue de 60%, mientras que la preferencia de sacarosa en las ratas anhedónicas fue del 30% aproximadamente. También se midió el consumo de sacarosa respecto al peso ya que algunos autores proponen que el estrés no provoca la disminución en el consumo de sacarosa cuando se calcula el total de la sacarosa consumida por gramo de peso (Matthews et al., 1995). En este estudio se observó que el consumo de sacarosa respecto al peso también fue menor en las ratas anhedónicas, en comparación con el grupo control (ANOVA  $p = 0.0001$ ) (Figura 16D).

A



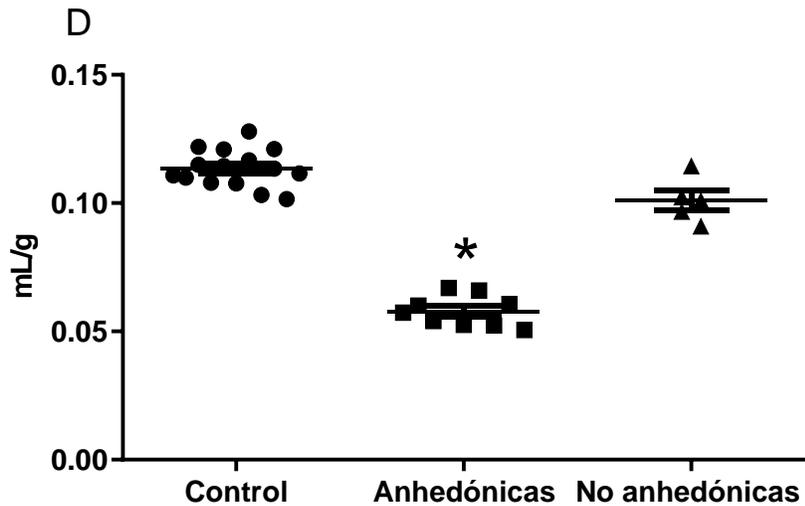
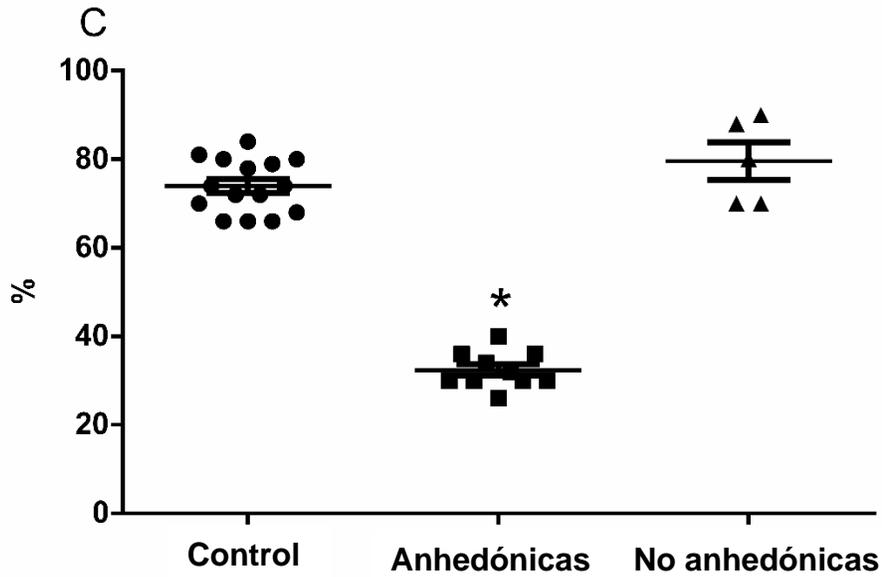
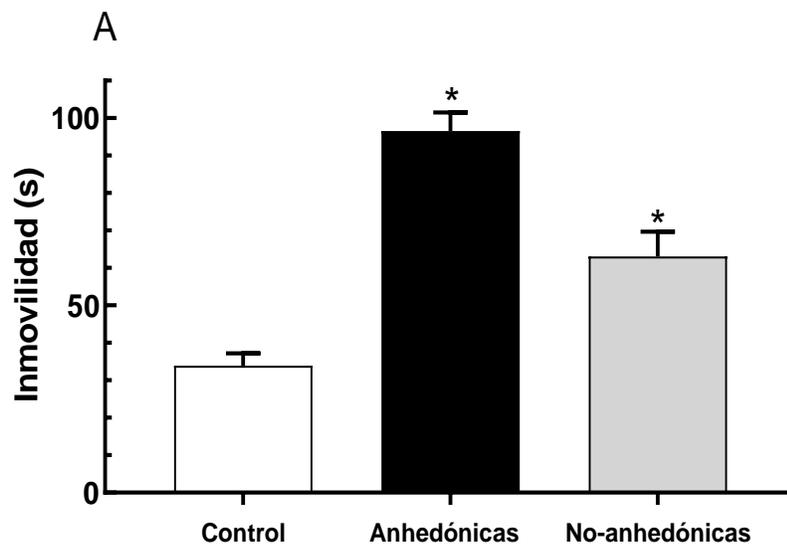


Figura 16. A) Porcentaje de ratas estresadas prenatalmente, anhedónicas y no anhedónicas. B) Ingesta de sacarosa. El consumo de sacarosa en mililitros fue menor en las ratas anhedónicas y fue similar entre los machos control y las ratas no anhedónicas. C) La preferencia de sacarosa fue menor en las ratas anhedónicas. D) El consumo de sacarosa por peso también fue menor en las ratas anhedónicas, en comparación con las no anhedónicas y con los controles. Control (n = 15), Anhedónicas (n = 10) y no anhedónicas (n= 5). Los datos se muestran como la media  $\pm$  E.E. Los datos se analizaron con ANOVA seguida de Tukey. \*  $p = 0.0001$ , comparado con el control y con las no anhedónicas.

## 10.4 Prueba de nado forzado (FST)

Se llevó a cabo la FST en las ratas de los grupos control, anhedónicas y no anhedónicas, se contabilizó en segundos el tiempo que pasaban las ratas inmóviles, nadando o tratando de escapar (escalamiento). El tiempo de inmovilidad en las ratas estresadas prenatalmente, tanto anhedónicas como no anhedónicas, se incrementó significativamente con respecto a las del grupo control (Figura 17A). En contraste, el tiempo de nado disminuyó en las ratas anhedónicas y no anhedónicas (Figura 17B), pero la conducta de escalamiento no se modificó durante la prueba de 5 minutos (ANOVA  $p = 0.001$ ) (Figura 17C).



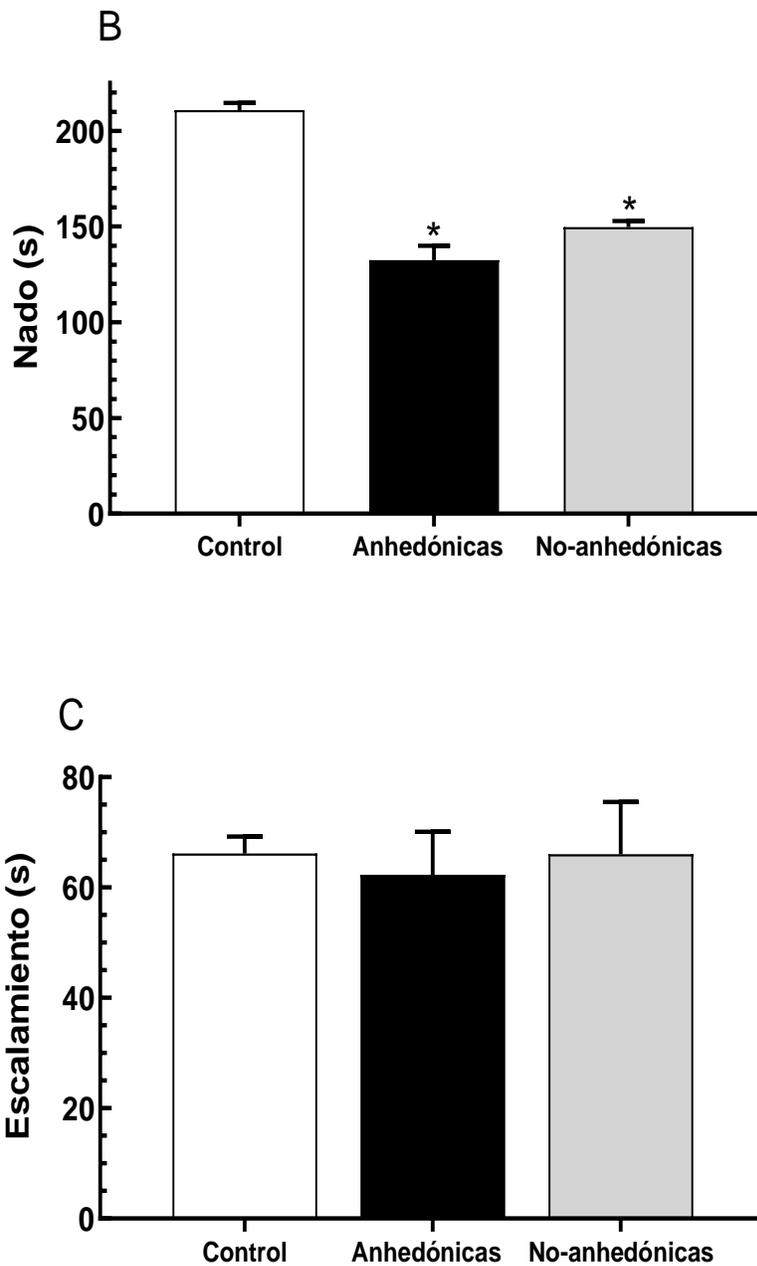


Figura 17. Parámetros evaluados en la prueba de nado forzado (FST). A) La inmovilidad se incrementó en las ratas estresadas prenatalmente anhedónicas y no anhedónicas. B) El tiempo de nado fue menor en las ratas estresadas prenatalmente. C) El tiempo de escalamiento fue similar en los grupos control y el grupo de ratas estresadas prenatalmente. Control (n= 15), Anhedónicas (n = 10) y no anhedónicas (n= 5). Los datos se muestran como la media  $\pm$  E.E. Cada parámetro se analizó con ANOVA de una vía, seguida de Tukey. \*  $p = 0.0001$ , comparado con el control.

## 10.5 Contenido de 5-HT y 5HIAA en el hipocampo ventral

El contenido de 5-HT se midió en el hipocampo ventral, en las ratas de los grupos control, anhedónicas y no anhedónicas, después de las pruebas de sacarosa y de la FST para determinar los cambios en esta estructura cerebral. El contenido de 5-HT después de la prueba de sacarosa en el hipocampo ventral fue similar en las ratas de los tres grupos: control, anhedónicas y no anhedónicas. Después de la FST, el contenido de 5-HT disminuyó en el hipocampo ventral de las ratas control, pero no en las ratas anhedónicas (en las cuales incluso se incrementó) y en las no anhedónicas (Figura 18A). El contenido del metabolito 5-HIAA después de la prueba de sacarosa fue mayor en el hipocampo ventral de las ratas anhedónicas, con respecto al control y las no anhedónicas. Después de la FST, el contenido del metabolito aumentó en las ratas control, pero no hubo cambios en las ratas anhedónicas y no anhedónicas, con respecto a los niveles después de la prueba de sacarosa (Figura 18B). ANOVA  $p = 0.0001$ . El contenido hipocampal de 5-HT en las ratas anhedónicas correlacionó positivamente con la mayor inmovilidad en estos animales ( $r = 0.08398$ ,  $p = 0.0364$ ).

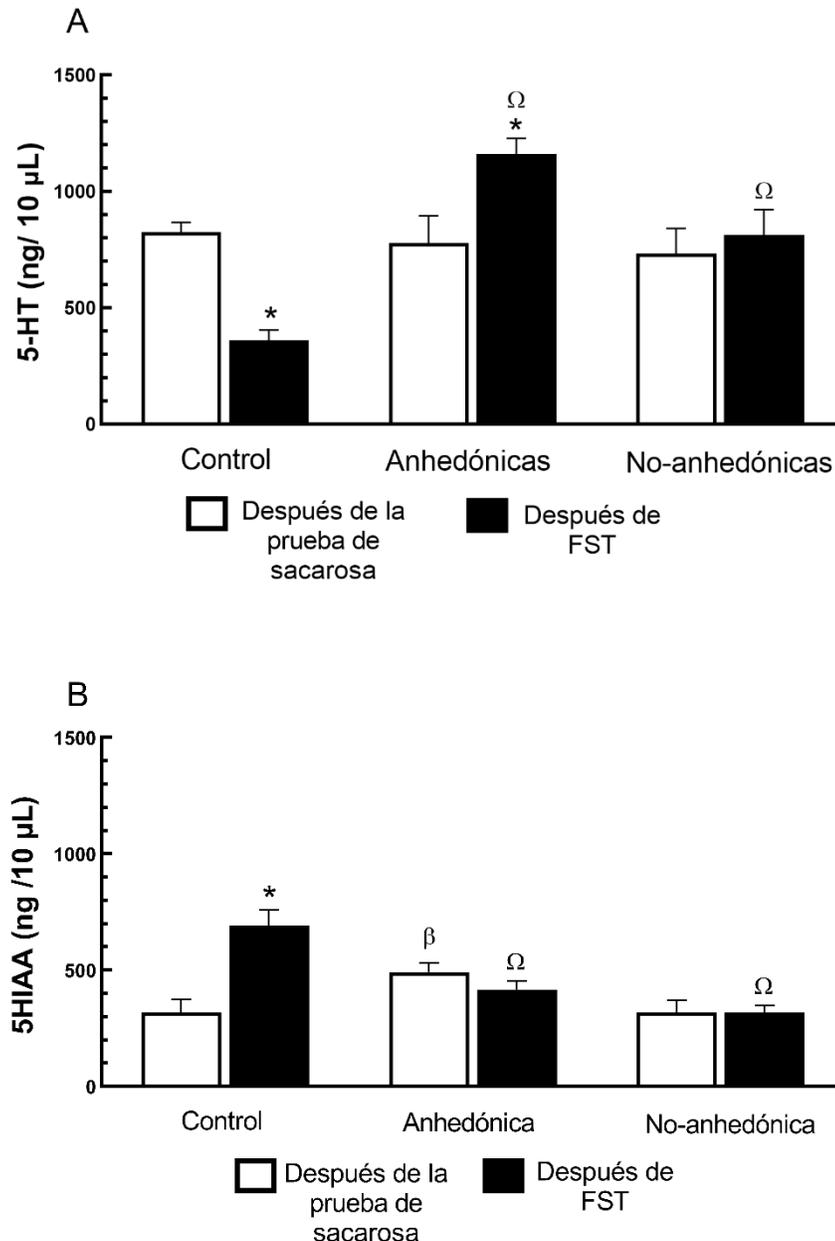


Figura 18. (A) Contenido de serotonina (5-HT) después de la prueba de sacarosa y después de la prueba de nado forzado (FST). El contenido de 5-HT disminuyó en el grupo control después de la FST, pero en las ratas anhedónicas y no anhedónicas no se modificó. B) Contenido tisular de 5-HIAA después de la prueba de sacarosa y después de la prueba de FST. La concentración del metabolito aumentó en el grupo control después de la prueba de FST, pero no se modificó en los grupos de animales estresados prenatalmente. Control (n = 15), Anhedónicas (n = 10) y no anhedónicas (n = 5). Los datos se muestran como la media  $\pm$  E.E. ANOVA de dos vías, seguida de Tukey. \* p = 0.01, comparado con el control después de la prueba de sacarosa;

$\Omega$   $p = 0.0001$  comparado con los niveles después de FST.  $\beta$   $p = 0.01$  comparado con el control y las ratas no anhedónicas, después de la prueba de sacarosa.

## 10.6 Tasa metabólica (5HIAA/5HT)

La tasa metabólica del contenido de 5-HT en el hipocampo ventral de los animales control se incrementó después de FST. En los animales estresados prenatalmente, anhedónicos, la tasa metabólica después de la prueba de sacarosa fue mayor que en los controles, pero disminuyó significativamente después de la prueba de FST. En los animales no anhedónicos, la tasa metabólica de 5-HT también fue menor que en los controles después de la FST. ANOVA de dos vías  $p = 0.0001$  (Tabla 1).

**Tabla 1. Tasas metabólicas de 5-HT en el hipocampo ventral, después de la prueba de sacarosa y después de la prueba de nado forzado**

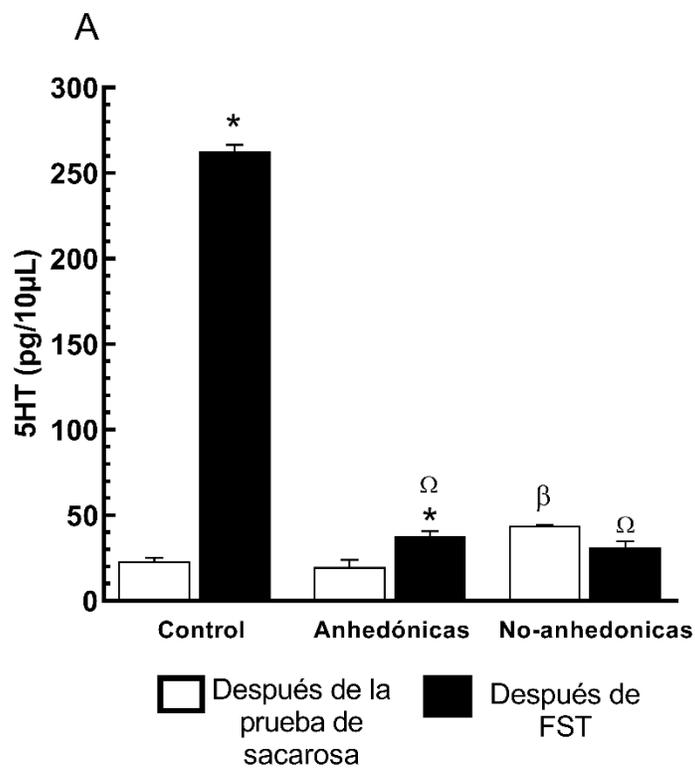
	5HIAA/5HT			
	Contenido		Microdiálisis	
	Después de la prueba de sacarosa	Después de la prueba de nado forzado	Después de la prueba de sacarosa	Después de la prueba de nado forzado
Control	0.44±0.07	2.18±0.35*	3.91±0.41 <sup>©</sup>	0.68±0.01*
Anhedónicas	0.85±0.21*	0.35±0.04 $\Omega\beta$	9.11±1.75*	1.13±0.12 $\Omega\beta$
No anhedónicas	0.60±0.07	0.39±0.03 $\beta$	4.74±1.42 <sup>©</sup>	1.56±0.15 $\Omega\beta$

Los datos se muestran como media  $\pm$  EEM. ANOVA de dos vías. Control (n= 15), Anhedónicas (n = 10) y no anhedónicas (n= 5). \*  $p = 0.0001$ , comparado con el control después de la prueba de sacarosa;  $\Omega$   $p = 0.0001$  comparado con el anhedónico después de la prueba de sacarosa.  $\beta$   $p = 0.0001$  comparado con el control después de FST. <sup>©</sup>  $p = 0.01$  comparado con las anhedónicas después de la prueba de sacarosa.

## 10.7 Concentración extracelular de 5-HT en el hipocampo ventral

La concentración extracelular de 5-HT en el hipocampo ventral se midió después de las pruebas de sacarosa y de la FST en las ratas de los grupos control, anhedónicas y no anhedónicas y se determinó si la concentración correlaciona con el desempeño en las pruebas conductuales. La concentración extracelular de 5-HT después de la prueba de sacarosa en el hipocampo ventral fue similar entre las ratas de los grupos control y anhedónicas, pero mayor en las ratas no anhedónicas. Después de la FST, la concentración extracelular de 5-HT aumentó en el hipocampo ventral de las ratas del grupo control, aumentó ligeramente en las ratas anhedónicas, pero no se modificó en las ratas no anhedónicas (Figura 19A). Con respecto a la concentración del metabolito después de la prueba de sacarosa, ésta fue mayor en el hipocampo ventral de las ratas estresadas prenatalmente en comparación con las ratas control. Sin embargo, después de la FST, la concentración extracelular de 5HIAA en el grupo control aumentó con respecto a la concentración después de la prueba de sacarosa. En contraste, la concentración del metabolito en el hipocampo de las ratas estresadas prenatalmente disminuyó con respecto al nivel después de la prueba de sacarosa y fue menor que en el control después de FST (Figura 19B).  $p = 0.0001$ . En el grupo control, el aumento en la concentración extracelular de 5-HT después de la FST se correlacionó negativamente con la menor inmovilidad ( $r = -0.8651$ ,  $p = 0.0119$ ) y positivamente con el aumento en el nado ( $r = 0.9702$ ,  $p = 0.0003$ ). En las ratas anhedónicas, la baja concentración extracelular de 5-HT se correlacionó negativamente con la mayor

inmovilidad en la FST ( $r=-0.8066$ ,  $p = 0.0284$ ) y positivamente con el menor tiempo de nado durante la prueba conductual ( $r= 0.8226$ ,  $p = 0.0231$ ). En el caso de las ratas no anhedónicas, también se encontró correlación negativa entre la baja concentración extracelular con una mayor inmovilidad ( $r=-0.9295$ ,  $p = 0.0024$ ) y el nado ( $r=0.7729$ ,  $p = 0.0416$ ).



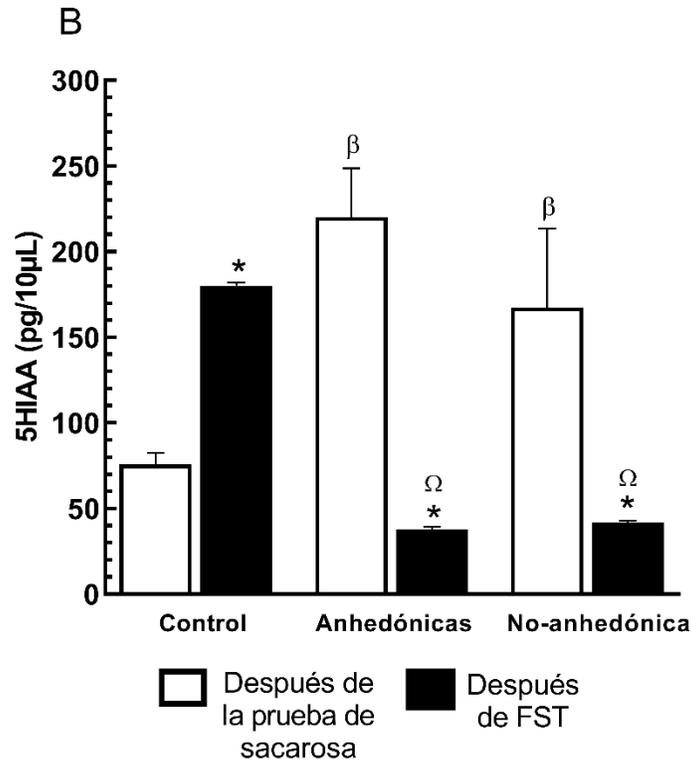


Figura 19. (A) Concentración extracelular de serotonina (5-HT) después de la prueba de sacarosa y de la prueba de nado forzado (FST) en el hipocampo ventral. En las ratas control la concentración extracelular de 5-HT aumentó después de la prueba de la FST, pero no en las ratas estresadas prenatalmente. (B) Concentración de 5-HIAA en el hipocampo ventral en ratas control y estresadas prenatalmente. Después de la prueba de la FST, la concentración del metabolito fue mayor en ratas control en comparación las ratas anhedónicas y no anhedónicas. Control (n= 15), Anhedónicas (n = 10) y no anhedónicas (n= 5). Los datos se muestran como media  $\pm$  EE. ANOVA de dos vías, seguida de Tukey. \* p=0.01, comparado con los niveles después de la prueba de preferencia de sacarosa;  $\beta$  p=0.01 comparado con el grupo control después de la prueba de sacarosa;  $\Omega$  p=0.01, comparado con el grupo control después de la FST.

## 10.8 Transportador de 5-HT

La evaluación del contenido del transportador en el hipocampo ventral de las ratas en los grupos control, anhedónicas y no anhedónicas, mostró que el transportador fue similar en los tres grupos después de la prueba de sacarosa. Después de la

FST, el contenido del transportador aumentó en el grupo control, pero no se modificó en las ratas anhedónicas y no anhedónicas (Figura 20).

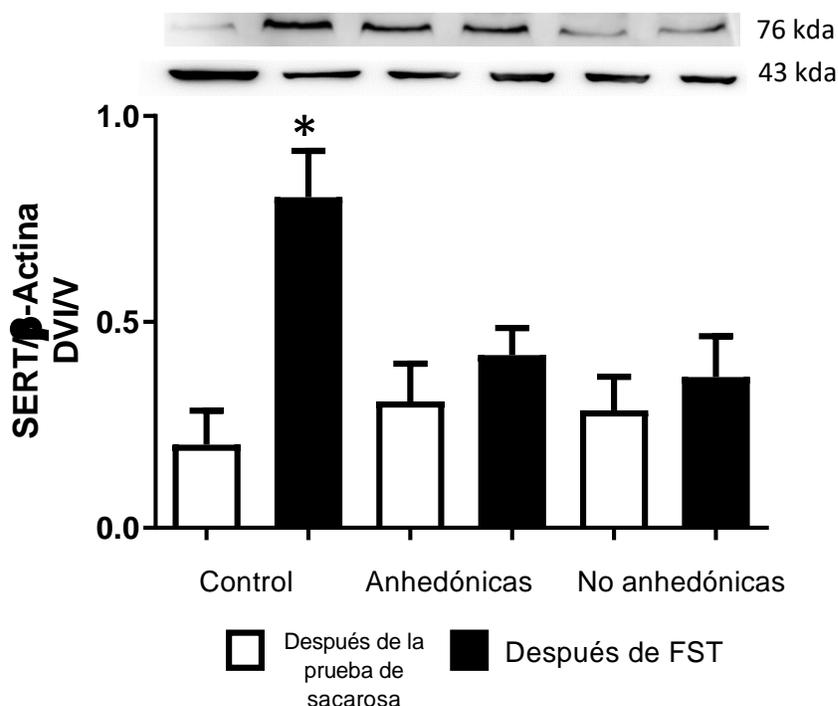


Figura 20. Concentración del transportador de serotonina en el hipocampo ventral en ratas control y estresadas prenatalmente. El contenido del transportador de serotonina en hipocampo ventral aumentó en las ratas control después de la prueba de nado forzado (FST). Control (n= 3), Anhedónicas (n = 3) y no anhedónicas (n= 3) Los datos se muestran como la media  $\pm$  E.E. ANOVA de dos vías, seguida de Tukey. \*  $p = 0.0001$ , comparado con el control después de la prueba de sacarosa, anhedónicas y no anhedónicas.

### 10.9 Concentración sérica de corticosterona

La concentración de corticosterona se midió en los grupos control anhedónicas y no anhedónicas para evaluar la actividad del eje adrenal después de la prueba de sacarosa y de la FST. Las concentraciones de corticosterona después de la prueba

de sacarosa en el plasma de los machos estresados prenatalmente, anhedónicos, fueron significativamente mayores que las de los machos control. Después de la FST, la concentración de corticosterona se incrementó en todas las ratas, siendo mayores los niveles en las ratas anhedónicas que en las ratas control. Las concentraciones séricas de corticosterona en el grupo de las ratas no anhedónicas fue similar a las del grupo control después de la FST (Figura 21) (ANOVA  $p = 0.0001$ ). El mayor aumento de corticosterona en las ratas anhedónicas correlacionó positivamente con el incremento en la inmovilidad, en la FST ( $r = 0.9578$ ,  $p = 0.0001$ ), así como correlación negativa con la disminución en el nado ( $r = -0.9645$ ,  $p = 0.0001$ ). En los animales no anhedónicos, no se observó correlación entre los parámetros anteriores. La elevada concentración de corticosterona en los animales anhedónicos también correlacionó de manera negativa con su consumo de sacarosa ( $r = -0.9463$ ,  $p = 0.0001$ ).

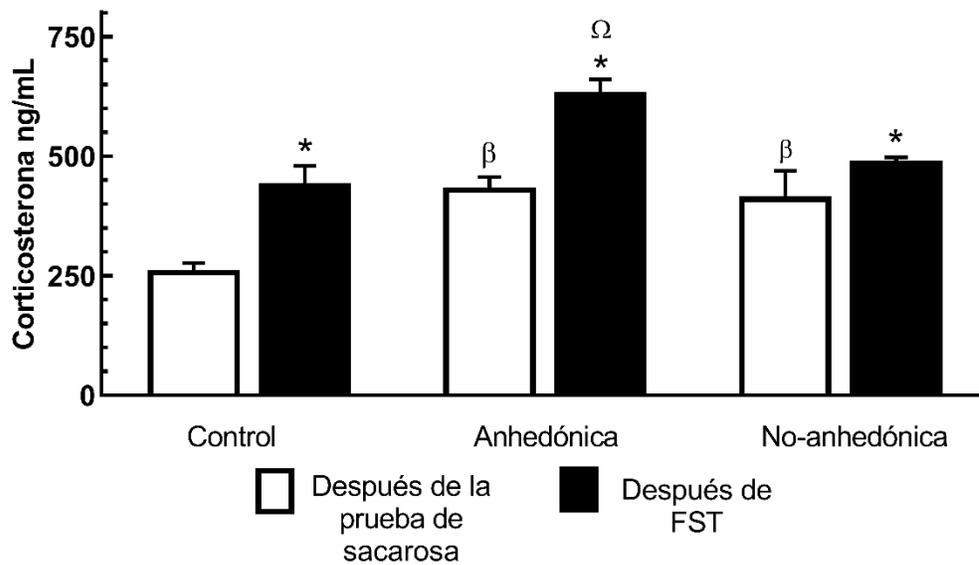


Figura 21. Concentración sérica de corticosterona después de la prueba de sacarosa y posterior a la FST (prueba de nado forzado). Control (n= 15), Anhedónicas (n = 10) y no anhedónicas (n= 5). Después de la prueba de la FST, la corticosterona se incrementó en las ratas anhedónicas en comparación con las ratas control. Las ratas no anhedónicas no mostraron cambios significativos. Los datos se muestran como la media  $\pm$  E.E. ANOVA de dos vías seguida de Tukey. \*  $p = 0.0018$  comparado con el control después de la prueba de sacarosa;  $\Omega$   $p = 0.0004$ , comparado con los niveles después de la prueba de sacarosa en las Anhedónicas;  $\beta$   $p = 0.0008$  comparado con el control después de la FST.

## **11 Discusión**

Los datos de este trabajo sugieren que el estrés prenatal no modifica los niveles de 5-HT y de su metabolito después de la prueba de ingesta de sacarosa, pero incrementa el metabolismo en las ratas anhedónicas. El estrés prenatal causa el desarrollo de conductas tipo depresivas en las ratas y dichas conductas están relacionadas con alteraciones en el contenido, la concentración extracelular de 5-HT y el metabolismo en el hipocampo ventral. Estos efectos están relacionados con los elevados niveles de corticosterona en la descendencia anhedónica, pero no en la no anhedónica (Amugongo y Hlusko, 2014).

### **11.1 Ganancia de peso en las hembras gestantes**

En el caso de las hembras gestantes, las que fueron sometidas a estrés tuvieron menor ganancia de peso corporal durante la última semana de gestación. Estos resultados coinciden con los de otros trabajos, en los que la aplicación de estresores como la inmovilización de las ratas por 45 minutos tres veces al día (Amugongo y Hlusko, 2014) y la exposición a luz muy brillante (Van den Hove et al., 2014) produjo menor ganancia de peso en la última semana de gestación. De manera similar, la inyección de solución salina del día 15 al 19 de la gestación, también disminuyó la ganancia de peso de las hembras gestantes (Franko et al., 2017). Estos resultados podrían explicarse por la disminución en la ingesta de alimento y agua, como se ha reportado anteriormente en hembras gestantes sometidas a estrés (Ward y Wainwright, 1988). La activación del eje HHA durante el estrés puede interferir con

ganancia de peso corporal debido a que la hormona liberadora de corticotropina (CRH), además de estimular la liberación de ACTH en la hipófisis, actúa también como un péptido anorexigénico en el hipotálamo, suprimiendo el apetito y la ingesta de alimento en los sujetos estresados (Charmandari et al., 2005). Además, la CRH está relacionada con la leptina que es una hormona producida por el tejido adiposo, la cual reduce el consumo de alimento y reduce el peso corporal (Rahmouni y Haynes, 2001). Esta hormona se incrementa en respuesta al estrés por inmersión (Konishi et al., 2006), con lo que el efecto anorexigénico de ambas hormonas se ve potenciado.

## **11.2 Peso de las crías al nacimiento**

El menor peso al nacimiento observado en las crías estresadas prenatalmente es consistente con otros protocolos de estrés que se han reportado anteriormente (Van den Hove et al., 2014). Otros trabajos, sin embargo, no observaron cambios en el peso de las crías al nacimiento, utilizando estresores como choques eléctricos en las patas (Abe et al., 2007), inmovilización de la FST y colocación del roedor en una plataforma elevada (Zohar y Weinstock, 2011) o administrando inyecciones de solución salina (Amugongo y Hlusko, 2014). Las diferencias en los resultados probablemente se deben al tipo de estresor utilizado en cada estudio. Durante el desarrollo fetal, la placenta provee de oxígeno y nutrientes al feto: mediante difusión y otros tipos de transporte regulado y estos procesos pueden ser influenciados por los GC (Burton et al., 2010). El estrés por inmersión en agua fría incrementa de manera significativa el nivel de los GC hasta en un 200 % durante la gestación (Guerrero et al., 2016; García-Vargas et al., 2019), probablemente este exceso de

GC modificó la funcionalidad de la placenta, lo que puede disminuir el transporte de nutrientes hacia los fetos. Los elevados niveles de GC maternos durante el estrés gestacional podrían inducir un menor transporte de nutrientes hacia los fetos, a través de disminuir el transportador de glucosa GLUT1 y, consecuentemente, el transporte de glucosa a los fetos (Villart y Vabesien-Mailliot, 2007). Esto podría explicar el menor peso al nacimiento observado en los machos estresados prenatalmente. El bajo peso al nacimiento también podría relacionarse con el bajo consumo de alimento por parte de la madre durante el estrés gestacional, lo que contribuye a la disminución en el transporte de nutrientes a los fetos, debido a los GC maternos.

### **11.3 Consumo de sacarosa y conducta anhedónica**

El bajo consumo de sacarosa observado en los animales anhedónicos concuerda con lo reportado en otros trabajos (Alonso et al., 1991; Zhang et al., 2017). En otros estudios, sin embargo, no se hizo la diferenciación entre las ratas anhedónicas y las no anhedónicas. En el presente trabajo, el 69% de las ratas estresadas prenatalmente presentó menor preferencia de sacarosa, en comparación con las ratas control, por lo que se les consideró anhedónicas. El 31% restante de las ratas estresadas prenatalmente, mostraron un consumo de sacarosa similar al de los machos control, por lo que se les consideró no anhedónicas (Bergström et al., 2007; Strekalova et al., 2011). Diversos trabajos sugieren que cuando se utilizan modelos animales de depresión por estrés, hay una importante variación en la respuesta al estrés entre los individuos (Scharf y Schmidt, 2012; Schmidt et al., 2010). Las ratas que se someten a un protocolo de estrés prenatal, pueden separarse en dos grupos,

los animales que son vulnerables (anhedónicos) y los resilientes (no anhedónicos) (Krishnan y Nestler, 2011). Esta separación permite un análisis más preciso de la conducta tipo depresiva generada por el estrés prenatal. Esta diferencia podría explicarse por la expresión diferencial de genes en el hipocampo de las ratas anhedónicas y las no anhedónicas (Strekalova et al., 2011). El hecho de que no todos los individuos expuestos a estrés prenatal desarrollen problemas relacionados con el estrés indica resiliencia, por lo que muestran mejor desempeño, a pesar de su exposición al estrés (Russo et al., 2012). La metilación del ADN es un mecanismo epigenético en la reprogramación del genoma después de la exposición a estrés en la vida temprana, como el desarrollo fetal. Recientemente se ha reportado que el estrés prenatal en los niños puede moldear epigenéticamente la resiliencia mediante la metilación de genes que codifican el GR (*NR3C1*) y su represor (*FKBP41*). La metilación de estos genes indica un aumento en la capacidad para terminar la respuesta de estrés en niños estresados prenatalmente. Más aún, se ha observado mayor metilación del DNA en regiones de la heterocromatina asociadas con la resiliencia al estrés y la enfermedad (Serpeloni et al., 2019). Esto podría explicar la menor hiperactividad e hiperreactividad del eje HHA observadas en las ratas no anhedónicas después de la FST en comparación con las ratas anhedónicas. La conducta anhedónica está asociada con la disminución en la actividad del sistema de recompensa (placer); las áreas cerebrales involucradas en la generación de la conducta anhedónica se encuentran en el sistema mesolímbico. Las principales proyecciones son las dopaminérgicas, que van del área tegmental ventral hacia el núcleo accumbens, en el estriado ventral (Wise, 2008). La conducta anhedónica, mostrada por la disminución de la respuesta a los estímulos de

recompensa, está asociada con menor liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Di Chiara et al., 1999) y en el núcleo basal de la estría terminal (Soares-Cunha et al, 2018), lo que explicaría la conducta anhedónica de las ratas anhedónicas, estresadas prenatalmente. La 5-HT modula la liberación de dopamina (Yan, 2000) y podría ser un regulador en el proceso de recompensa y en la conducta anhedónica (Der-Avakian y Markou, 2012). El tratamiento crónico con inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT incrementa la preferencia de sacarosa en ratones (El Yacoubi et al., 2011) y el bloqueo de la síntesis de 5-HT causa una deficiencia parcial en la respuesta de recompensa (Liu et al., 2014). El ligero aumento en la concentración extracelular de 5-HT en el hipocampo ventral de las ratas no anhedónicas, después de la prueba de ingesta de sacarosa, en comparación con el grupo control, es consistente con la evidencia anterior. En las ratas anhedónicas, la baja ingesta de sacarosa se ha intentado explicar por otros mecanismos, como la disminución del transportador de 5-HT, que se ha asociado con el estado anhedónico inducido por estrés, mientras que el incremento del transportador se ha asociado con un estado no-anhedónico inducido por estrés (Tang et al, 2013). Sin embargo, los datos obtenidos sobre el contenido del transportador de 5-HT no confirman esta posibilidad, ya que no se observaron cambios en esa proteína ni después de la prueba de sacarosa ni después de la FST en las ratas anhedónicas y en las no-anhedónicas.

La correlación negativa observada entre la concentración de corticosterona y el consumo de sacarosa en los animales anhedónicos sugiere que esa hormona también estar involucrada en las alteraciones del sistema de recompensa.

## 11.4 Prueba de nado forzado (FST)

Los mayores tiempos de inmovilidad y menores tiempos de nado son observados en las ratas anhedónicas y no anhedónicas en la FST, son consistentes con otros estudios, a pesar de las diferencias en los protocolos de estrés, como es la inmovilización y exposición a luz intensa (Maccari et al., 2003; Morley-Fletcher et al., 2004). Otros estudios han reportado que el estrés prenatal solo afecta la inmovilidad en las hembras pero no en los machos (Alonso et al., 2000; Frye y Wawrzycki, 2003). Las discrepancias podrían explicarse por el protocolo de estrés utilizado. En esos reportes se empleó restricción bajo luz solamente en el día 18 de la gestación. En contraste, en este trabajo, el estresor se aplicó en los días 15 al 21 de gestación y consistió en la inmersión en agua fría, el cual es más intenso que otros estresores, ya que provoca una drástica elevación de corticosterona en la gestación (Guerrero et al., 2016) y no causa habituación al estresor (Retana-Márquez et al., 2003). En muchos estudios, la inmovilidad es la variable que se cuantifica en la FST para confirmar una conducta tipo depresiva, como es la desesperanza aprendida (Porsolt et al., 1977; 1979). Ésta es una conducta que presentan las personas que experimentan situaciones estresantes de manera repetida, llegando a creer que son incapaces de controlar la situación y no tratan de cambiarla, aun cuando tienen la posibilidad de hacerlo (Nuvvula, 2016). En los modelos animales, debido a que no pueden escapar, dejan de intentarlo y permanecen inmóviles, lo cual se ha interpretado antropomórficamente como “desesperanza”, un fenotipo similar a la depresión. A pesar de que la FST se ha considerado como una conducta tipo depresiva, se considera más una adaptación

para la supervivencia (Porsolt et al, 1978; Cryan y Mombereau, 2004; Molendijk y Kloet, 2015; Campus et al, 2015; De Kloet y Moledijk, 2016) y es una prueba conductual útil para la evaluación de la respuesta serotoninérgica y del eje HHA al estrés agudo, ya que esta prueba evalúa las estrategias para enfrentar un estresor agudo del que no se puede escapar (Commons et al, 2017). Los resultados de este trabajo sugieren que el estrés prenatal altera la funcionalidad del sistema serotoninérgico y esto se ve reflejado en el incremento de la inmovilidad y la disminución del nado en la FST. Estos datos son consistentes con evidencia que indica que el estrés durante la gestación causa cambios neuroquímicos que afectan al sistema serotoninérgico hipocampal (Charil et al, 2010) modificando el contenido de 5-HT (Hayashi et al, 1998). El contenido elevado de 5-HT, y su baja liberación en las ratas anhedónicas observadas en este trabajo, correlacionan negativamente con la duración de la inmovilidad y el menor tiempo de nado.

### **11.5 Contenido de 5-HT y su metabolito.**

En contraste con otros trabajos que reportan bajo contenido de 5-HT y alta concentración de 5-HIAA en el hipocampo ventral de ratas estresadas prenatalmente (Hayashi et al., 1998; Soares-Cunha et al., 2018), en este trabajo no se observaron cambios en el contenido de 5-HT después de la prueba de sacarosa, pero si en el contenido de 5-HIAA, el cual se incrementó después de la prueba de ingesta de sacarosa. Después de la FST se incrementó el contenido de 5-HT, sin cambios en el 5-HIAA.

Estas diferencias podrían deberse al tipo de estresor utilizado: hacinamiento e inyección de solución salina (Hayashi et al, 1998) o estrés crónico leve impredecible

(Sohares-Cunha et al., 2018), contra estrés por inmersión en agua fría en este estudio, por lo que los diferentes estresores podrían activar al eje HHA de manera distinta, causando diferente liberación de corticosteroides maternos y, por lo tanto, distintas alteraciones en el sistema de la 5-HT. Otras diferencias son la diferencia de edad a la cual se evaluó la 5-HT: tres semanas (Hayashi et al, 1998), dos meses (Soares-Cunha, et al, 2016) y tres meses en este estudio, por lo que es probable que la tasa metabólica de la 5-HT difiera con la edad. En este estudio se observó una mayor tasa metabólica después de la prueba de sacarosa en las ratas anhedónicas que en las ratas control. A pesar de que el contenido de 5-HT después de la prueba de preferencia de sacarosa fue similar en los animales control y anhedónicos, el contenido de 5-HIAA fue mayor en las ratas anhedónicas que en las ratas control. De la misma forma, en el estudio de microdiálisis se observó una mayor tasa metabólica en los animales anhedónicos que en los controles y en los no anhedónicos después de las pruebas de preferencia de sacarosa. Estos datos son consistentes con lo reportado previamente (Hayashi et la, 1998), donde se observó una mayor tasa metabólica basal en los animales estresados prenatalmente en comparación con los controles. Después de la FST, la tasa metabólica en los animales control se incrementó, a diferencia de los estresados prenatalmente, en los cuales la tasa metabólica disminuyó, lo que sugiere que los niveles de 5-HT no se modificaron con la FST en los animales anhedónicos y no anhedónicas, lo cual fue comprobado con la microdiálisis.

## 11.6 Concentración extracelular de 5-HT

Los resultados de la microdiálisis mostraron que la concentración extracelular de 5-HT y de su metabolito se incrementaron en respuesta a FST en los animales control, lo que indica que, en condiciones normales, la 5-HT se libera en respuesta a dicha prueba. Las conductas de inmovilidad y nado se han relacionado con la liberación de 5-HT (Porsolt et al, 1979), por lo que el incremento en los niveles de 5-HT en las ratas control explica su menor inmovilidad y mayor tiempo de nado. En comparación, en las ratas anhedónicas, sólo se observó un ligero, pero significativo incremento en la 5-HT después de la FST. En las ratas no-anhedónicas no se observaron cambios en el neurotransmisor, pero sí una disminución en su metabolito después de la FST. Estos resultados muestran que el estrés prenatal altera al sistema serotoninérgico, ya que la inmovilidad y la 5-HT en las ratas estresadas prenatalmente correlacionaron negativamente. Además de la baja liberación de 5-HT, podría ser que el transportador de 5-HT incrementara la recaptura de 5-HT en las ratas estresadas prenatalmente, ya que su contenido se incrementa (Bielas et al., 2014). Sin embargo, en este trabajo se observó que el transportador aumenta en las ratas control después de la FST, pero no en las ratas estresadas prenatalmente. Hasta donde sabemos, éste es el primer trabajo que reporta la concentración extracelular de 5-HT en el hipocampo ventral y sus cambios después de la FST en animales estresados prenatalmente.

## **11.7 Contenido del transportador de 5-HT**

El contenido del transportador de 5-HT fue similar las ratas control y en las estresadas prenatalmente después de la prueba de ingesta de sacarosa. Después de la FST, el transportador de 5-HT se incrementó en las ratas control, pero no en las estresadas prenatalmente, lo que indica que la recaptura de 5-HT se incrementa, junto con el aumento en la liberación y metabolismo de 5-HT en condiciones normales. En contraste, en las ratas estresadas prenatalmente, además de no incrementarse la liberación ni el metabolismo de la 5-HT después de la FST, el transportador tampoco se incrementa. Estos resultados difieren de lo reportado en otros estudios, en los que el estrés prenatal causa aumento en el transportador de serotonina en ratones (Bielas et al., 2014). Estos resultados indican que, al liberarse poca 5-HT en las ratas anhedónicas, su metabolismo también es bajo y el transportador no se incrementa, al menos en su contenido. Estos resultados indican que el estrés prenatal altera aspectos de la transmisión serotoninérgica en el hipocampo ventral, como son la liberación y el metabolismo de la 5-HT, pero no la recaptura. Sin embargo, son necesarios más estudios en los que se evalúe la actividad del transportador de serotonina o bien la expresión de su RNAm.

## **11.8 Concentración de corticosterona**

La naturaleza estresante de la FST, dado su componente de agua, permite la evaluación de la respuesta del eje HHA. Los altos niveles de corticosterona observados en las ratas anhedónicas, después de la prueba de sacarosa y después de la FST, confirman que el estrés prenatal causa hiperactividad (elevados niveles

basales de corticosterona) e hiperreactividad (alta respuesta al estresor) en dicho eje, lo que es similar a lo reportado previamente (Koehl et al, 1999). Se ha demostrado que las altas concentraciones del esteroide interfieren con la transmisión serotoninérgica, causando mayor tiempo de inmovilidad y menor tiempo de nado (Mitchel y Meaney, 1991; Morley-Fletcher et al., 2003). La elevada actividad y reactividad del eje HHA ha sido atribuida a una menor cantidad de GR en el hipocampo ventral, causando altas concentraciones de corticosterona en los animales estresados prenatalmente (Jöels et al, 2008). En este estudio, las ratas no-anhedónicas o resilientes mostraron una respuesta del eje adrenal similar a los animales control, lo que podría tener relación con cambios epigenéticos en la expresión del gen para MR (Serpeloni et al, 2019), lo que confirma las diferencias en la respuesta de estrés entre los individuos (Huizink et al., 2004; Bergström et al., 2007; Schmidt et al., 2008). Es probable que los MR y GR no estén disminuidos en los animales no-anhedónicos, permitiendo una respuesta del eje adrenal similar a la de los animales control. Esto queda por ser demostrado en estudios posteriores.

## **12 Conclusiones**

Los resultados de este trabajo confirman que el estrés prenatal causa conducta anhedónica en el 69% de los animales estresados prenatalmente y conducta no-anhedónica o resiliencia en el 31% de ellos. Asimismo, el estrés prenatal causa alteración en las conductas de inmovilidad y de nado en la FST, las cuales se han considerado como un tipo de conducta depresiva, aunque podría ser también una estrategia para hacer frente a un estresor del que no pueden escapar. Estas alteraciones conductuales correlacionan con el bajo contenido y liberación de 5-HT,

menor metabolismo y alteraciones en su recaptura en el hipocampo ventral, lo que muestra una perturbación del sistema serotoninérgico. Estas alteraciones neuroquímicas correlacionan también con la hiperactividad e hiperreactividad del eje adrenal.

## 13 Referencias

Abe, H., Hidaka, N., Kawagoe, C., Odagiri, K., Watanabe, Y., Ikeda, T., Ishizuka, Y., Hashiguchi, H., Takeda, R., Nishimori, T., y Ishida, Y. (2007). Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience Research*, 59(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.06.1465>

Akins, M. R., y Garcia, A. D. R. (2016). Neurogenesis in the Adult Brain. In *Encyclopedia of Cell Biology* (Vol. 4, pp. 134–140). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.40021-0>

Alonso, S. J., Arevalo, R., Afonso, D., y Rodríguez, M. (1991). Effects of maternal stress during pregnancy on forced swimming test behavior of the offspring. *Physiology and Behavior*, 50(3), 511–517. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90538-Y](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90538-Y)

Alonso, S. J., Damas, C., y Navarro, E. (2000). Behavioral despair in mice after prenatal stress. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 56(2), 77–82. <https://doi.org/10.1007/BF03179902>

American Psychological Association (APA). (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Depressive Disorders. In *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition*. American Psychiatric Publishing, Inc. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.dsm04>

Amchova, P., Kucerova, J., Giugliano, V., Babinska, Z., Zanda, M. T., Scherma, M., Dusek, L., Fadda, P., Micale, V., Sulcova, A., Fratta, W., y Fattore, L. (2014). Enhanced self-administration of the CB1 receptor agonist WIN55,212-2 in olfactory bulbectomized rats: Evaluation of possible serotonergic and dopaminergic underlying mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*, 5 MAR. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00044>

Amugongo, S. K., y Hlusko, L. J. (2014). Impact of maternal prenatal stress on growth of the offspring. *Aging and Disease*, 5(1), 1–16. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.05001>

Anacker, C., Cattaneo, A., Luoni, A., Musaelyan, K., Zunszain, P. A., Milanese, E., Rybka, J., Berry, A., Cirulli, F., Thuret, S., Price, J., Riva, M. A., Gennarelli, M., y Pariante, C. M. (2013). Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, 38(5), 872–883. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.253>

Artigas, F. (2013). Future directions for serotonin and antidepressants. In *ACS Chemical Neuroscience* (Vol. 4, Issue 1, pp. 5–8). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cn3001125>

Basta-Kaim, A., Szczesny, E., Glombik, K., Slusarczyk, J., Trojan, E., Tomaszewski, K. A., Budziszewska, B., Kubera, M., y Lason, W. (2014). Prenatal stress leads to changes in IGF-1 binding proteins network in the hippocampus and frontal cortex of adult male rat. *Neuroscience*, 274, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.010>

Baram, T. Z., y Lerner, S. P. (1991). Ontogeny of corticotropin releasing hormone gene expression in rat hypothalamus - comparison with somatostatin. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 9(5), 473–478. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(91\)90033-l](https://doi.org/10.1016/0736-5748(91)90033-l)

Barker, D. J. P., Osmond, C., Winter, P. D., Margetts, B., y Simmonds, S. J. (1989). WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. *The Lancet*, 334(8663), 577–580. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)90710-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)90710-1)

Barr, A. M., y Phillips, A. G. (1999). Withdrawal following repeated exposure to d-amphetamine decreases responding for a sucrose solution as measured by a progressive ratio schedule of reinforcement. *Psychopharmacology*, 141(1), 99–106. <https://doi.org/10.1007/s002130050812>

Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., y Zhang, X. (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *NeuroToxicology*, 14(1), 83–144. <https://europepmc.org/article/MED/8361683>

Bergström, A., Jayatissa, M. N., Thykjær, T., y Wiborg, O. (2007). Molecular Pathways Associated with Stress Resilience and Drug Resistance in the Chronic Mild Stress Rat Model of Depression—a Gene Expression Study. *Journal of*

Molecular Neuroscience, 33(2), 201–215. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-0065-9>

Bernal-Morales, B., Contreras, C. M., & Cueto-Escobedo, J. (2009). Acute restraint stress produces behavioral despair in weanling rats in the forced swim test. *Behavioural Processes*, 82(2), 219–222. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2009.06.006>

Behan, Á. T., van den Hove, D. L. A., Mueller, L., Jetten, M. J. A., Steinbusch, H. W. M., Cotter, D. R., y Prickaerts, J. (2011). Evidence of female-specific glial deficits in the hippocampus in a mouse model of prenatal stress. *European Neuropsychopharmacology*, 21(1), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.07.004>

Bhagwagar, Z., Hinz, R., Taylor, M., Fancy, S., Cowen, P., y Grasby, P. (2006). Increased 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding in euthymic, medication-free patients recovered from depression: A positron emission study with [<sup>11</sup>C]MDL 100,907. *American Journal of Psychiatry*, 163(9), 1580–1587. <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.9.1580>

Bhagwagar, Z., Murthy, N., Selvaraj, S., Hinz, R., Taylor, M., Fancy, S., Grasby, P., y Cowen, P. (2007). 5-HTT Binding in Recovered Depressed Patients and Healthy Volunteers: A Positron Emission Tomography Study With [<sup>11</sup>C]DASB. *American Journal of Psychiatry*, 164(12), 1858–1865. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.06111933>

Bielas, H., Arck, P., Bruenahl, C. A., Walitza, S., y Grünblatt, E. (2014). Prenatal stress increases the striatal and hippocampal expression of correlating c-FOS and serotonin transporters in murine offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 38, 30–35. <https://doi.org/10.1016/J.IJDEVNEU.2014.07.006>

Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W., y Price, D. L. (2012). *Basic Neurochemistry*. In *Basic Neurochemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-00066-X>

Burton, G. J., Barker, D. J. P., Moffett, A., y Thornburg, K. (2010). *The Placenta and Human Developmental Programming* (G. J. Burton, D. J. P. Barker, A. Moffett, y K. Thornburg (Eds.)). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511933806>

Cannon, W. B. (1929). ORGANIZATION FOR PHYSIOLOGICAL HOMEOSTASIS. *Physiological Reviews*, 9(3), 399–431. <https://doi.org/10.1152/physrev.1929.9.3.399>

Campus, P., Colelli, V., Orsini, C., Sarra, D., y Cabib, S. (2015). Evidence for the involvement of extinction-associated inhibitory learning in the forced swimming test. *Behavioural Brain Research*, 278, 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.009>

Coe, C. L., Kramer, M., Czéh, B., Gould, E., Reeves, A. J., Kirschbaum, C., y Fuchs, E. (2003). Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile Rhesus monkeys. *Biological Psychiatry*, 54(10), 1025–1034. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00698-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00698-X)

Commons, K. G., Cholanians, A. B., Babb, J. A., y Ehlinger, D. G. (2017). The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. In *ACS Chemical Neuroscience* (Vol. 8, Issue 5, pp. 955–960). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00042>

Charil, A., Laplante, D. P., Vaillancourt, C., y King, S. (2010). Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews*, 65(1), 56–79. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2010.06.002>

Charmandari, E., Tsigos, C., y Chrousos, G. (2005). ENDOCRINOLOGY OF THE STRESS RESPONSE. *Annual Review of Physiology*, 67(1), 259–284. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816>

Cintra, A., Solfrini, V., Bunnemann, B., Okret, S., Bortolotti, F., Gustafsson, J.-Å., y Fuxe, K. (1993). Prenatal Development of Glucocorticoid Receptor Gene Expression and Immunoreactivity in the Rat Brain and Pituitary Gland: A Combined in situ Hybridization and Immunocytochemical Analysis. *Neuroendocrinology*, 57(6), 1133–1147. <https://doi.org/10.1159/000126480>

Cooper, S. J. (2008). From Claude Bernard to Walter Cannon. Emergence of the concept of homeostasis. In *Appetite* (Vol. 51, Issue 3, pp. 419–427). <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.06.005>

Coppen, A. (1967). The biochemistry of affective disorders. In *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* (Vol. 113, Issue 504, pp. 1237–1264). Br J Psychiatry. <https://doi.org/10.1192/bjp.113.504.1237>

Coppen, Alec, Swade, C., y Wood, K. (1978). Platelet 5-hydroxytryptamine accumulation in depressive illness. *Clinica Chimica Acta*, 87(1), 165–168. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(78\)90071-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(78)90071-2)

Cowen, P. J., Parry-Billings, M., y Newsholme, E. A. (1989). Decreased plasma tryptophan levels in major depression. *Journal of Affective Disorders*, 16(1), 27–31. [https://doi.org/10.1016/0165-0327\(89\)90051-7](https://doi.org/10.1016/0165-0327(89)90051-7)

Cowen, Philip J. (2008). Serotonin and depression: pathophysiological mechanism or marketing myth? *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(9), 433–436. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.004>

Cryan, J. F., y Mombereau, C. (2004). In search of a depressed mouse: Utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 9, Issue 4, pp. 326–357). <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001457>

Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O., y Simon, M. (2016). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, 293–310. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2015.04.004>

Der-Avakian, A., y Markou, A. (2012). The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 35, Issue 1, pp. 68–77). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.005>

Deussing, J. M. (2006). Animal models of depression. In *Drug Discovery Today: Disease Models* (Vol. 3, Issue 4, pp. 375–383). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2006.11.003>

De Kloet, E. R., y Molendijk, M. L. (2016). Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. In *Neural Plasticity* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/6503162>

Di Chiara, G., Loddo, P., y Tanda, G. (1999). Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. *Biological Psychiatry*, 46(12), 1624–1633. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00236-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00236-X)

Diaz, R., Brown, R. W., y Seckl, J. R. (1998). Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(7), 2570–2580. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-07-02570.1998>

Drevets, W. C., Thase, M. E., Moses-Kolko, E. L., Price, J., Frank, E., Kupfer, D. J., y Mathis, C. (2007). Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. In *Nuclear Medicine and Biology* (Vol. 34, Issue 7, pp. 865–877). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.06.008>

Dwyer, J. M., Platt, B. J., Sukoff Rizzo, S. J., Pulicicchio, C. M., Wantuch, C., Zhang, M. Y., Cummons, T., Leventhal, L., Bender, C. N., Zhang, J., Kowal, D., Lu, S., Rajarao, S. J. R., Smith, D. L., Shilling, A. D., Wang, J., Butera, J., Resnick, L., Rosenzweig-Lipson, S., ... Beyer, C. E. (2010). Preclinical characterization of BRL 44408: Antidepressant- and analgesic-like activity through selective  $\alpha$ 2A-adrenoceptor antagonism. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 13(9), 1193–1205. <https://doi.org/10.1017/S1461145709991088>

Echeverría, P. C., Mazaira, G., Erlejman, A., Gomez-Sanchez, C., Pilipuk, G. P., y Galigniana, M. D. (2009). Nuclear Import of the Glucocorticoid Receptor-hsp90 Complex through the Nuclear Pore Complex Is Mediated by Its Interaction with Nup62 and Importin  $\beta$ . *Molecular and Cellular Biology*, 29(17), 4788–4797. <https://doi.org/10.1128/MCB.00649-09>

El Yacoubi, M., Dubois, M., Gabriel, C., Mocaër, E., y Vaugeois, J. M. (2011). Chronic agomelatine and fluoxetine induce antidepressant-like effects in H/Rouen mice, a genetic mouse model of depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 100(2), 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.08.001>

Fabian, A.-K., März, A., Neimanis, S., Biondi, R. M., Kozany, C., y Hausch, F. (2013). InterAKTions with FKBP - Mutational and Pharmacological Exploration. *PLOS ONE*, 8(2), e57508. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0057508>

Fernstrom, J. D. (1983). Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. In *Physiological Reviews* (Vol. 63, Issue 2, pp. 484–546). *Physiol Rev.* <https://doi.org/10.1152/physrev.1983.63.2.484>

Flier, J. S., Underhill, L. H., y Chrousos, G. P. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 332, Issue 20, pp. 1351–1363). <https://doi.org/10.1056/NEJM199505183322008>

Franko, K. L., Forhead, A. J., y Fowden, A. L. (2017). Effects of stress during pregnancy on hepatic glucogenic capacity in rat dams and their fetuses. *Physiological Reports*, 5(11), e13293. <https://doi.org/10.14814/phy2.13293>

Freemon, F. R. (1980). The Synaptic Organization of the Brain. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 243(18), 1850. <https://doi.org/10.1001/jama.1980.03300440052037>

Frye, C. A., y Wawrzycki, J. (2003). Effect of prenatal stress and gonadal hormone condition on depressive behaviors of female and male rats. *Hormones and Behavior*, 44(4), 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(03\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(03)00159-4)

Gassen, N. C., Hartmann, J., Zannas, A. S., Kretschmar, A., Zschocke, J., Maccarrone, G., Hafner, K., Zellner, A., Kollmannsberger, L. K., Wagner, K. V., Mehta, D., Kloiber, S., Turck, C. W., Lucae, S., Chrousos, G. P., Holsboer, F., Binder, E. B., Ising, M., Schmidt, M. V, y Rein, T. (2015). FKBP51 inhibits GSK3 $\beta$  and augments the effects of distinct psychotropic medications. *Molecular Psychiatry* 2016 21:2, 21(2), 277–289. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.38>

García-Vargas, D., Juárez-Rojas, L., Rojas Maya, S., y Retana-Márquez, S. (2019). Prenatal stress decreases sperm quality, mature follicles and fertility in rats. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 65(3), 223–235. <https://doi.org/10.1080/19396368.2019.1567870>

Gemmel, M., Rayen, I., Lotus, T., van Donkelaar, E., Steinbusch, H. W., de Lacalle, S., Kokras, N., Dalla, C., y Pawluski, J. L. (2016). Developmental fluoxetine and

prenatal stress effects on serotonin, dopamine, and synaptophysin density in the PFC and hippocampus of offspring at weaning. *Developmental Psychobiology*, 58(3), 315–327. <https://doi.org/10.1002/dev.21372>

Gerner, R. H., y Hare, T. A. (1981). CSF GABA in normal subjects and patients with depression, schizophrenia, mania, and anorexia nervosa. *American Journal of Psychiatry*, 138(8), 1098–1101. <https://doi.org/10.1176/ajp.138.8.1098>

Gjerstad, J. K., Lightman, S. L., y Spiga, F. (2018). Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. In *Stress* (Vol. 21, Issue 5, pp. 403–416). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1470238>

Gray, J. D., Kogan, J. F., Marrocco, J., y McEwen, B. S. (2017). Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nature Publishing Group*, 13. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.97>

Grigoryan, G., y Segal, M. (2016). Lasting Differential Effects on Plasticity Induced by Prenatal Stress in Dorsal and Ventral Hippocampus. In *Neural Plasticity* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2540462>

Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R., y Joëls, M. (2011). Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *Journal of Endocrinology*, 209(2), 153–167. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0472>

Guerrero, M., del Carmen, R. O. M., Wendy, P. M., y Socorro, R. M. (2016). Tactile stimulation effects on hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory in prenatally stressed rats. *Brain Research Bulletin*, 124, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.003>

Harro, J. (2019). Animal models of depression: pros and cons. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 377, Issue 1, pp. 5–20). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2973-0>

Hayashi, A., Nagaoka, M., Yamada, K., Ichitani, Y., Miake, Y., y Okado, N. (1998). Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring.

International Journal of Developmental Neuroscience, 16(3–4), 209–216.  
[https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(98\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(98)00028-8)

Henke, P. G. (1990). Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. *Brain Research Bulletin*, 25(5), 691–695.  
[https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90044-Z](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90044-Z)

Henry, C., Kabbaj, M., Simon, H., Moal, M., y Maccari, S. (1994). Prenatal Stress Increases the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Response in Young and Adult Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 6(3), 341–345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1994.tb00591.x>

Hill, M. N., y Tasker, J. G. (2012). Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In *Neuroscience* (Vol. 204, pp. 5–16). Pergamon.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.030>

Hock, B. J., y Bunsey, M. D. (1998). Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions. *Journal of Neuroscience*, 18(17), 7027–7032.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-17-07027.1998>

Holt, N. F., y Haspel, K. L. (2010). Vasopressin: A Review of Therapeutic Applications. *YJCAN*, 24(2), 330–347. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2009.09.006>

Honig, A., Bartlett, J. R., Bouras, N., y Bridges, P. K. (1988). Amino acid levels in depression: A preliminary investigation. *Journal of Psychiatric Research*, 22(3), 159–164. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(88\)90001-5](https://doi.org/10.1016/0022-3956(88)90001-5)

Huang, Y., Xu, H., Li, H., Yang, H., Chen, Y., y Shi, X. (2012). Pre-gestational stress reduces the ratio of 5-HIAA to 5-HT and the expression of 5-HT<sub>1A</sub> receptor and serotonin transporter in the brain of foetal rat. *BMC Neuroscience*, 13(1).  
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-22>

Huizink, A. C., Mulder, E. J. H., y Buitelaar, J. K. (2004). Prenatal Stress and Risk for Psychopathology: Specific Effects or Induction of General Susceptibility? *Psychological Bulletin*, 130(1), 115–142. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.1.115>

Ishiwata, H., Shiga, T., y Okado, N. (2005). Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction. *Neuroscience*, 133(4), 893–901. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2005.03.048>

Jacobs, B. L., y Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. In *Physiological Reviews* (Vol. 72, Issue 1, pp. 165–230). American Physiological Society Bethesda, MD . <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>

Johnson, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P., y Gold, P. W. (1992). Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16(2), 115–130. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80175-7](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80175-7)

Joëls, M., Karst, H., DeRijk, R., y de Kloet, E. R. (2008). The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends in Neurosciences*, 31(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2007.10.005>

Kadmiel, M., y Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 34, Issue 9, pp. 518–530). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.003>

Kalueff, A. V., Gallagher, P. S., y Murphy, D. L. (2006). Are serotonin transporter knockout mice “depressed”? Hypoactivity but no anhedonia. *NeuroReport*, 17(12), 1347–1351. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000230514.08962.76>

Kapoor, A., Dunn, E., Kostaki, A., Andrews, M. H., y Matthews, S. G. (2006). Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *The Journal of Physiology*, 572(1), 31–44. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.105254>

Kara, N. Z., Stukalin, Y., & Einat, H. (2018). Revisiting the validity of the mouse forced swim test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 84, pp. 1–11). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.11.003>

Karst, H., Berger, S., Turiault, M., Tronche, F., Schütz, G., y Joëls, M. (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19204–19207. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507572102>

Kastin, A. J., y Akerstrom, V. (2002). Differential Interactions of Urocortin/Corticotropin-Releasing Hormone Peptides with the Blood-Brain Barrier. *Neuroendocrinology*, 75(6), 367–374. <https://doi.org/10.1159/000059433>

Kinney, G. G., Vogel, G. W., & Feng, P. (1997). Decreased dorsal raphe nucleus neuronal activity in adult chloral hydrate anesthetized rats following neonatal clomipramine treatment: Implications for endogenous depression. *Brain Research*, 756(1–2), 68–75. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00119-4)

Kino, T., y Chrousos, G. P. (2004). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and associated diseases. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 40, pp. 137–155). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/bse0400137>

Kirschke, E., Goswami, D., Southworth, D., Griffin, P. R., & Agard, D. A. (2014). Glucocorticoid Receptor Function Regulated by Coordinated Action of the Hsp90 and Hsp70 Chaperone Cycles. *Cell*, 157(7), 1685–1697. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.04.038>

Kjelstrup, K. G., Tuvnes, F. A., Steffenach, H. A., Murison, R., Moser, E. I., y Moser, M. B. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10825–10830. <https://doi.org/10.1073/pnas.152112399>

Koehl, M., Darnaudéry, M., Dulluc, J., Van Reeth, O., Moal, M. Le, y Maccari, S. (1999). Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *Journal of Neurobiology*, 40(3), 302–315. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(19990905\)40:3<302::AID-NEU3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(19990905)40:3<302::AID-NEU3>3.0.CO;2-7)

Konishi, N., Otaka, M., Odashima, M., Jin, M., Wada, I., Komatsu, K., Sato, T., Kato, S., Matsushashi, T., & Watanabe, S. (2006). Systemic stress increases serum leptin

level. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(7), 1099–1102.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04132.x>

Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., y Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 35, Issue 5, pp. 1291–1301).  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>

Kornum, B. R., Weikop, P., Moller, A., Ronn, L. C. B., Knudsen, G. M., & Aznar, S. (2006). Serotonin depletion results in a decrease of the neuronal activation caused by rivastigmine in the rat hippocampus. *Brain Research*, 1073–1074(1), 262–268.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.030>

Kram, M. L., Kramer, G. L., Steciuk, M., Ronan, P. J., y Petty, F. (2000). Effects of learned helplessness on brain GABA receptors. *Neuroscience Research*, 38(2), 193–198. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00157-7](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00157-7)

Krishnan, V., y Nestler, E. J. (2011). *Animal Models of Depression: Molecular Perspectives* (pp. 121–147). Springer, Berlin, Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/7854\\_2010\\_108](https://doi.org/10.1007/7854_2010_108)

Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., y Abrous, D. N. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), 11032–11037. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.11032>

Liu, Z., Zhou, J., Li, Y., Hu, F., Lu, Y., Ma, M., Feng, Q., Zhang, J. en, Wang, D., Zeng, J., Bao, J., Kim, J. Y., Chen, Z. F., ElMestikawy, S., y Luo, M. (2014). Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron*, 81(6), 1360–1374. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.010>

Lolak, S., Suwannarat, P., y Lipsky, R. H. (2014). Epigenetics of depression. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 128, Issue C, pp. 103–137). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800977-2.00005-X>

Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A. R., Cinque, C., y Van Reeth, O. (2003). Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00014-9)

Mairesse, J., Lesage, J., Breton, C., Bréant, B., Hahn, T., Darnaudéry, M., Dickson, S. L., Seckl, J., Blondeau, B., Vieu, D., Maccari, S., y Viltart, O. (2007). Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 292(6). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00574.2006>

Mann, J. J. (1999). Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology*, 21(1), 99S-105S. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00040-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00040-8)

Martin, P., Pichat, P., Massol, J., Soubrié, P., Lloyd, K. G., y Puech, A. J. (1989). Decreased GABA B Receptors in Helpless Rats: Reversal by Tricyclic Antidepressants. *Neuropsychobiology*, 22(4), 220–224. <https://doi.org/10.1159/000118620>

Matthews, K., Forbes, N., y Reid, I. C. (1995). Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. *Physiology and Behavior*, 57(2), 241–248. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)00286-E](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)00286-E)

McCormick, C. M., Smythe, J. W., Sharma, S., y Meaney, M. J. (1995). Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Developmental Brain Research*, 84(1), 55–61. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)00153-Q](https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)00153-Q)

Meana, J., Barturen, F., y Garcia-Sevilla, J. A. (1992).  $\alpha$ 2-Adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression. *Biological Psychiatry*, 31(5), 471–490. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(92\)90259-3](https://doi.org/10.1016/0006-3223(92)90259-3)

Mirescu, C., y Gould, E. (2006). Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*, 16(3), 233–238. <https://doi.org/10.1002/hipo.20155>

Mitani, F. (2014). Functional zonation of the rat adrenal cortex: The development and maintenance. In *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences* (Vol. 90, Issue 5, pp. 163–183). Japan Academy. <https://doi.org/10.2183/pjab.90.163>

Mitchell, J. B., y Meaney, M. J. (1991). Effects of corticosterone on response consolidation and retrieval in the forced swim test. *Behavioral Neuroscience*, 105(6), 798–803. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.105.6.798>

Miyagawa, K., Tsuji, M., Fujimori, K., Saito, Y., y Takeda, H. (2011). Prenatal stress induces anxiety-like behavior together with the disruption of central serotonin neurons in mice. *Neuroscience Research*, 70(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.02.002>

Molendijk, M. L., y de Kloet, E. R. (2015). Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. In *Psychoneuroendocrinology* (Vol. 62, pp. 389–391). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.08.028>

Mombereau, C., Kaupmann, K., Froestl, W., Sansig, G., Van Der Putten, H., y Cryan, J. F. (2004). Genetic and pharmacological evidence of a role for GABAB receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, 29(6), 1050–1062. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300413>

Morley-Fletcher, S., Darnaudery, M., Koehl, M., Casolini, P., Van Reeth, O., y Maccari, S. (2003). Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test: Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Research*, 989(2), 246–251. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)03293-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)03293-1)

Morley-Fletcher, S., Darnaudéry, M., Mocaer, E., Froger, N., Lanfumey, L., Laviola, G., Casolini, P., Zvena, A. R., Marzano, L., Hamon, M., y Maccari, S. (2004). Chronic treatment with imipramine reverses immobility behaviour, hippocampal corticosteroid receptors and cortical 5-HT1A receptor mRNA in prenatally stressed rats. *Neuropharmacology*, 47(6), 841–847. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2004.06.011>

Muck-Šeler, D., y Pivac, N. (2011). Serotonin. *Periodicum Biologorum*, 113(1), 29–41. <https://www.bib.irb.hr/513081?rad=513081>

Mueller, B. R., y Bale, T. L. (2008). Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *Journal of Neuroscience*, 28(36), 9055–9065. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1424-08.2008>

Murmu, M. S., Salomon, S., Biala, Y., Weinstock, M., Braun, K., y Bock, J. (2006). Changes of spine density and dendritic complexity in the prefrontal cortex in offspring of mothers exposed to stress during pregnancy. *European Journal of Neuroscience*, 24(5), 1477–1487. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05024.x>

Muscat, R., y Willner, P. (1992). Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: A methodological analysis. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 16(4), 507–517. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80192-7](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80192-7)

Mulder, E. J. H., Robles De Medina, P. G., Huizink, A. C., Van Den Bergh, B. R. H., Buitelaar, J. K., y Visser, G. H. A. (2002). Prenatal maternal stress: Effects on pregnancy and the (unborn) child. In *Early Human Development* (Vol. 70, Issues 1–2, pp. 3–14). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(02\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(02)00075-0)

Nelson, J. C. (1999). A review of the efficacy of serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitors for treatment of major depression. In *Biological Psychiatry* (Vol. 46, Issue 9, pp. 1301–1308). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00173-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00173-0)

Nichols, D. E., y Nichols, C. D. (2008). Serotonin receptors. *Chemical Reviews*, 108(5), 1614–1641. <https://doi.org/10.1021/cr078224o>

Nicolaidis, N. C., Kyratzi, E., Lamprokostopoulou, A., Chrousos, G. P., y Charmandari, E. (2015). Stress, the Stress System and the Role of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22(1–2), 6–19. <https://doi.org/10.1159/000362736>

Nutt, D., Demyttenaere, K., Janka, Z., Aarre, T., Bourin, M., Canonico, P. L., Carrasco, J. L., y Stahl, S. (2007). The other face of depression, reduced positive affect: The role of catecholamines in causation and cure. In *Journal of*

Psychopharmacology (Vol. 21, Issue 5, pp. 461–471). Sage PublicationsSage UK: London, England. <https://doi.org/10.1177/0269881106069938>

Nuvvula, S. (2016). Learned helplessness. In Contemporary Clinical Dentistry (Vol. 7, Issue 4, pp. 426–427). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.194124>

Palucha, A. (2006). Are compounds acting at metabotropic glutamate receptors the answer to treating depression? In Expert Opinion on Investigational Drugs (Vol. 15, Issue 12, pp. 1545–1553). Taylor y Francis. <https://doi.org/10.1517/13543784.15.12.1545>

Paul, S., Jeon, W. K., Bizon, J. L., y Han, J. S. (2015). Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. In Frontiers in Aging Neuroscience (Vol. 7, Issue MAR, p. 43). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00043>

Paxinos, G., Watson, C. R. R., y Emson, P. C. (1980). AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. Journal of Neuroscience Methods, 3(2), 129–149. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(80\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(80)90021-7)

Peters, D. A. V. (1986). Prenatal stress: Effect on development of rat brain serotonergic neurons. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 24(5), 1377–1382. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90198-X](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90198-X)

Petty, F., y Sherman, A. D. (1984). Plasma GABA levels in psychiatric illness. Journal of Affective Disorders, 6(2), 131–138. [https://doi.org/10.1016/0165-0327\(84\)90018-1](https://doi.org/10.1016/0165-0327(84)90018-1)

Petty, Frederick. (1995). GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. Journal of Affective Disorders, 34(4), 275–281. [https://doi.org/10.1016/0165-0327\(95\)00025-1](https://doi.org/10.1016/0165-0327(95)00025-1)

Pittenger, C., Huang, Y. Y., Paletzki, R. F., Bourtchouladze, R., Scanlin, H., Vronskaya, S., y Kandel, E. R. (2002). Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-

dependent spatial memory. *Neuron*, 34(3), 447–462. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00684-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00684-0)

Plaut, S. M., Graham, C. W., y Leiner, K. Y. (1972). Effects of prenatal maternal handling and rearing with aunts on behavior, brain weight, and whole-brain serotonin levels. *Developmental Psychobiology*, 5(3), 215–221. <https://doi.org/10.1002/dev.420050305>

Porsolt, R. D., Bertin, A., Blavet, N., Deniel, M., & Jalfre, M. (1979). Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *European Journal of Pharmacology*, 57(2–3), 201–210. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(79\)90366-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(79)90366-2)

Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1978). “Behavioural despair” in rats and mice: Strain differences and the effects of imipramine. *European Journal of Pharmacology*, 51(3), 291–294. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90414-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90414-4)

Porsolt, R. D., LE PICHON, M., y JALFRE, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730–732. <https://doi.org/10.1038/266730a0>

Porter, R., y Knight, J. (Eds.). (1972). *Ciba Foundation Symposium 8 - Physiology, Emotion and Psychosomatic Illness*. John Wiley y Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470719916>

Potter, W. Z., Grossman, F., y Rudorfer, M. V. (1993). Noradrenergic Function in Depressive Disorders. In *Biology of Depressive Disorders. Part A* (pp. 1–27). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9498-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9498-4_1)

Pratt, W. B., Galigniana, M. D., Harrell, J. M., y DeFranco, D. B. (2004). Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cellular Signalling*, 16(8), 857–872. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2004.02.004>

Price, R. B., Shungu, D. C., Mao, X., Nestadt, P., Kelly, C., Collins, K. A., Murrough, J. W., Charney, D. S., y Mathew, S. J. (2009). Amino Acid Neurotransmitters Assessed by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: Relationship to Treatment

Rahmouni, K., y Haynes, W. G. (2001). Leptin signaling pathways in the central nervous system: interactions between neuropeptide Y and melanocortins. *BioEssays*, 23(12), 1095–1099. <https://doi.org/10.1002/bies.10018>

Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Martínez-García, R., y Velázquez-Moctezuma, J. (2003). Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones and Behavior*, 44(4), 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.04.001>

Riggs, D. L., Roberts, P. J., Chirillo, S. C., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Ratajczak, T., Gaber, R., Picard, D., y Smith, D. F. (2003). The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *The EMBO Journal*, 22(5), 1158–1167. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG108>

Rogatsky, I., Waase, C. L. M., y Garabedian, M. J. (1998). Phosphorylation and Inhibition of Rat Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activation by Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3): SPECIES-SPECIFIC DIFFERENCES BETWEEN HUMAN AND RAT GLUCOCORTICOID RECEPTOR SIGNALING AS REVEALED THROUGH GSK-3 PHOSPHORYLATION \*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14315–14321. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.23.14315>

Ryan, B. C., y Vandenberg, J. G. (2002). Intrauterine position effects. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 26, Issue 6, pp. 665–678). Pergamon. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00038-6)

Russo, S. J., Murrough, J. W., Han, M. H., Charney, D. S., y Nestler, E. J. (2012). Neurobiology of resilience. In *Nature Neuroscience* (Vol. 15, Issue 11, pp. 1475–1484). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nn.3234>

Salm, A. K., Pavelko, M., Krouse, E. M., Webster, W., Kraszpulski, M., & Birkle, D. L. (2004). Lateral amygdaloid nucleus expansion in adult rats is associated with exposure to prenatal stress. *Developmental Brain Research*, 148(2), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2003.11.005>

Samarasinghe, R. A., Di Maio, R., Volonte, D., Galbiati, F., Lewis, M., Romero, G., & DeFranco, D. B. (2011). Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(40), 16657–16662. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102821108>

Sanacora, G., Kendell, S. F., Levin, Y., Simen, A. A., Fenton, L. R., Coric, V., & Krystal, J. H. (2007). Preliminary Evidence of Riluzole Efficacy in Antidepressant-Treated Patients with Residual Depressive Symptoms. *Biological Psychiatry*, 61(6), 822–825. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.08.037>

Sanacora, G., & Saricicek, A. (2008). GABAergic Contributions to the Pathophysiology of Depression and the Mechanism of Antidepressant Action. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 6(2), 127–140. <https://doi.org/10.2174/187152707780363294>

Scheschowitsch, K., Leite, J. A., & Assreuy, J. (2017). New insights in glucocorticoid receptor signaling – more than just a ligand binding receptor. *Frontiers in Endocrinology*, 8(FEB), 16. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2017.00016>

Schmidt, M. V., Scharf, S. H., Sterlemann, V., Ganea, K., Liebl, C., Holsboer, F., & Müller, M. B. (2010). High susceptibility to chronic social stress is associated with a depression-like phenotype. *Psychoneuroendocrinology*, 35(5), 635–643. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2009.10.002>

Schmidt, M. V., Sterlemann, V., & Müller, M. B. (2008). Chronic Stress and Individual Vulnerability. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148(1), 174–183. <https://doi.org/10.1196/annals.1410.017>

Serpeloni, F., Radtke, K. M., Hecker, T., Sill, J., Vukojevic, V., De Assis, S. G., Schauer, M., Elbert, T., & Nätt, D. (2019). Does prenatal stress shape postnatal resilience? An epigenome-wide study on violence and mental health in humans. *Frontiers in Genetics*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00269>

Serretti, A., & Kato, M. (2008). The serotonin transporter gene and effectiveness of SSRIs. In *Expert Review of Neurotherapeutics* (Vol. 8, Issue 1, pp. 111–120). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1586/14737175.8.1.111>

Siiteri, P. K., Murai, J. T., Hammond, G. L., Nisker, J. A., Raymoure, W. J., & Kuhn, R. W. (1982). The serum transport of steroid hormones. In *Recent Progress in*

Hormone Research (Vol. 38, pp. 457–510). Recent Prog Horm Res. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571138-8.50016-0>

Soares-Cunha, C., Coimbra, B., Borges, S., Domingues, A. V., Silva, D., Sousa, N., & Rodrigues, A. J. (2018). Mild prenatal stress causes emotional and brain structural modifications in rats of both sexes. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00129>

Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 9, Issue 3, pp. 206–221). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn2286>

Stechschulte, L. A., Hinds, T. D., Ghanem, S. S., Shou, W., Najjar, S. M., & Sanchez, E. R. (2014). FKBP51 Reciprocally Regulates GR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  Activation via the Akt-p38 Pathway. *Molecular Endocrinology*, 28(8), 1254–1264. <https://doi.org/10.1210/ME.2014-1023>

Strekalova, T., Couch, Y., Kholod, N., Boyks, M., Malin, D., Leprince, P., & Steinbusch, H. M. (2011). Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters. *Behavioral and Brain Functions*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-7-9>

Sunal, R., Gümüşel, B., & Kayaalp, S. O. (1994). Effect of changes in swimming area on results of “behavioral despair test.” *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49(4), 891–896. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90239-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90239-9)

Tang, M., Lei, J., Sun, X., Liu, G., y Zhao, S. (2013). Stress-induced anhedonia correlates with lower hippocampal serotonin transporter protein expression. *Brain Research*, 1513, 127–134. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2013.03.042>

Treadway, M. T., y Zald, D. H. (2011). Reconsidering anhedonia in depression: Lessons from translational neuroscience. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 35, Issue 3, pp. 537–555). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.06.006>

Uno, H., Eisele, S., Sakai, A., Shelton, S., Baker, E., DeJesus, O., y Holden, J. (1994). Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Hormones and Behavior*, 28(4), 336–348. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1994.1030>

Vandevyver, S., Dejager, L., & Libert, C. (2012). On the Trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back. *Traffic*, 13(3), 364–374. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0854.2011.01288.X>

Vallée, M., Maccari, S., Dellu, F., Simon, H., Le Moal, M., y Mayo, W. (1999). Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: A longitudinal study in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 11(8), 2906–2916. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00705.x>

Van den Hove, D. L. A., Lauder, J. M., Scheepens, A., Prickaerts, J., Blanco, C. E., y Steinbusch, H. W. M. (2006). Prenatal stress in the rat alters 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in the ventral hippocampus. *Brain Research*, 1090(1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2006.03.057>

Van den Hove, D. L. A., Leibold, N. K., Strackx, E., Martinez-Claros, M., Lesch, K. P., Steinbusch, H. W. M., Schruers, K. R. J., y Prickaerts, J. (2014). Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional behavior and the serotonergic system. *European Neuropsychopharmacology*, 24(4), 595–607. <https://doi.org/10.1016/J.EURONEURO.2013.09.006>

Viltart, O., y Vanbesien-Mailliot, C. C. A. (2007). Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. *TheScientificWorldJournal*, 7, 1493–1537. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.204>

Vollmayr, B., Bachteler, D., Vengeliene, V., Gass, P., Spanagel, R., & Henn, F. (2004). Rats with congenital learned helplessness respond less to sucrose but show no deficits in activity or learning. *Behavioural Brain Research*, 150(1–2), 217–221. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(03\)00259-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(03)00259-6)

Vom Saal, F. S., y Bronson, F. H. (1980). Sexual characteristics of adult female mice are correlated with their blood testosterone levels during prenatal development. *Science*, 208(4444), 597–599. <https://doi.org/10.1126/science.7367881>

Ward, G. R., y Wainwright, P. E. (1988). Reductions in maternal food and water intake account for prenatal stress effects on neurobehavioral development in B6D2F2 mice. *Physiology y Behavior*, 44(6), 781–786. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90062-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90062-5)

Ward, H. E., Johnson, E. A., Salm, A. K., y Birkle, D. L. (2000). Effects of prenatal stress on defensive withdrawal behavior and corticotropin releasing factor systems in rat brain. *Physiology and Behavior*, 70(3–4), 359–366. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00270-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00270-5)

Watson, J. B., Mednick, S. A., Huttunen, M., y Wang, X. (1999). Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Development and Psychopathology*, 11(3), 457–466. <https://doi.org/10.1017/S0954579499002151>

Werner, F. M., y Covenas, R. (2011). The different brain centres involved in major depression and the derived pharmacological options. *Klinische Neurophysiologie*, 42(01), P285. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1272732>

Wise, R. A. (2008). Dopamine and reward: The anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotoxicity Research*, 14(2–3), 169–183. <https://doi.org/10.1007/BF03033808>

Yan, Q. S. (2000). Activation of 5-HT(2A/2C) receptors within the nucleus accumbens increases local dopaminergic transmission. *Brain Research Bulletin*, 51(1), 75–81. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00208-7)

Yanpallewar, S., Fernandes, K., Marathe, S., Vadodaria, K., Jhaveri, D., Rommelfanger, K., Ladiwala, U., Jha, S., Muthig, V., Hein, L., Bartlett, P., Weinshenker, D., y Vaidya, V. (n.d.). Alpha2-Adrenoceptor Blockade Accelerates the Neurogenic, Neurotrophic, and Behavioral Effects of Chronic Antidepressant Treatment. *The FASEB Journal*, 25, 1003.2-1003.2. [https://doi.org/10.1096/FASEBJ.25.1\\_SUPPLEMENT.1003.2](https://doi.org/10.1096/FASEBJ.25.1_SUPPLEMENT.1003.2)

Zhang, H., Shang, Y., Xiao, X., Yu, M., y Zhang, T. (2017). Prenatal stress-induced impairments of cognitive flexibility and bidirectional synaptic plasticity are possibly associated with autophagy in adolescent male-offspring. *Experimental Neurology*, 298, 68–78. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2017.09.001>

Zohar, I., y Weinstock, M. (2011). Differential Effect of Prenatal Stress on the Expression of Corticotrophin-Releasing Hormone and its Receptors in the Hypothalamus and Amygdala in Male and Female Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(4), 320–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02117.x>

## RESEARCH PAPER

Acta Neurobiol Exp 2020, 80: 331–343  
DOI: 10.21307/ane-2020-029



# Decreased serotonin content and release in the ventral hippocampus of prenatally stressed male rats in response to forced swim test

Felipe de Jesús Jiménez Vásquez<sup>1</sup>, Diana Méndez Guerrero<sup>1</sup>, Moisés Rubio Osornio<sup>2</sup>, María del Carmen Rubio Osornio<sup>2</sup>, Sandra Orozco Suárez<sup>3</sup> and Socorro Retana-Márquez<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate in Experimental Biology, Autonomous Metropolitan University, Iztapalapa Unit (UAM-I), Mexico,

<sup>2</sup>National Institute of Neurology and Neurosurgery (INNN), Mexico,

<sup>3</sup>Neurological Disease Research Unit, Specialty Hospital, C.M.N. XXI<sup>st</sup> Century, Mexico,

<sup>4</sup>Department of Biology of Reproduction, Autonomous Metropolitan University, Iztapalapa, Mexico,

\*Email: rems@xanum.uam.mx

Prenatal stress modifies the serotonergic system by altering the synthesis, metabolism, receptors and serotonin content in the hippocampus. However, it is currently unknown whether serotonin release in the ventral hippocampus of prenatally stressed rats is altered. In this study, serotonin (5-HT) and its metabolite, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) levels were analysed in dialysates (*in vivo*) and in homogenates (*in vitro*) of the ventral hippocampus. This was made after the sucrose preference test and after forced swim test (FST) in male adult progeny from mothers that were stressed by immersion in cold water during the last week of gestation. Serum concentration of corticosterone was also evaluated in control and in prenatally stressed males. Sucrose preference was differently affected in prenatally stressed males: 69% showed decreased sucrose consumption, and were considered anhedonic; 31% exhibited sucrose consumption similar to control and were considered non-anhedonic. During the FST, increased immobility and decreased swimming were observed in prenatally stressed males. After sucrose test, content and release of 5-HT in prenatally stressed rats were similar to those in the control group, with higher metabolite. After the FST, 5-HT content increased, but its release increased slightly in anhedonic rats and did not change in non-anhedonic rats, with lower metabolite. The response of the adrenal axis to the FST was larger in anhedonic prenatally stressed males, than in control and non-anhedonic males. These data show that behavioural disruption caused by prenatal stress is related to low release and lower metabolism of serotonin in the ventral hippocampus in adult male offspring, as well as to hyperactivity and hyperreactivity of the adrenal axis.

**Key words:** prenatal stress, serotonin, depression, ventral hippocampus, corticosterone

## INTRODUCTION

Prenatal brain development is critical for shaping adult behavior (Pallarés and Antonelli, 2017), with growth and differentiation of major brain structures occurring during fetal development (Entringer et al., 2015). Many environmental factors, such as prenatal maternal stress can alter brain structure development, which has been associated to cognitive, behavioral

and psychosocial disturbances, in both animals and humans (St-Pierre et al., 2016). One of the alterations caused in prenatally stressed offspring in animal models is the low capacity to coping with stress due to the de-regulation of the HPA axis, thus increasing susceptibility to adult disorders, such as hyperactivity and hyperreactivity of HPA axis (Fan et al., 2009), metabolic diseases (Tamashiro et al., 2009), cognitive deficits (Guerrero et al., 2016), anxiety-like behavior

Received 20 February 2020, accepted 17 August 2020



(Brunton and Russel, 2010) or depressive-like behavior (Brunton, 2013). The ventral hippocampus is related to the stress response (Herman et al., 2005) and emotional behavior (Fanselow and Dong, 2010; Lee et al., 2017). CA1 ventral hippocampal projections to the bed nuclei of the stria terminalis (BST) are important for neuroendocrine dysfunctions associated with psychiatric disorders, such as depression, anxiety, and post-traumatic stress disorder (PTSD) (Fanselow and Dong, 2010; Sheline et al., 2019). The ventral hippocampus in the rat receives projections from the median raphe nucleus, predominantly innervating CA1 and CA3 regions and the dentate gyrus (Mamounas et al., 1991; Vertes, 1991; Berumen et al., 2012), with the highest density of serotonergic axons in CA3 (Hensler, 2006). Prenatal stress disrupts the hippocampal serotonergic system by decreasing 5-HT content at weaning (Ishiwata et al., 2005) or at day 35 of age (Hayashi et al., 1998) and increasing the concentration of its metabolite, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), thus increasing its metabolic rate (Ishiwata et al., 2005), leading to a depressive-like phenotype (Mueller and Bale, 2008). Other studies however, did not find differences in 5-HT content at weaning (Gemmel et al., 2016) or in adulthood (Ishiwata et al., 2005; Van den Hove et al., 2014). Prenatal stress also increases serotonin transporter (SERT) (Bielas et al., 2014), decreases 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding (Van den Hove et al., 2006) and its expression (Huang et al., 2012) in the ventral hippocampus of male offspring. In contrast, the immunoreactivity of tryptophan hydroxylase in the raphe nucleus increases (Miyagawa et al., 2011; Van del Hove et al., 2014). In association with decreased 5-HT content in the hippocampus, prenatal stress causes anxious- and depressive-like behavior in male and female rats (Soares-Cunha et al., 2018). Similarly, prenatally stressed rats show decreased sucrose consumption, which is known as anhedonic behavior (Basta-Kaim et al., 2014; Glombik et al., 2015; Ślusarczyk et al., 2015), together with what has been defined as learned helplessness behavior, with a longer time of immobility in the forced swim test (FST) (Alonso et al., 1991; Morley-Fletcher et al., 2003; Morley-Fletcher et al., 2004; Soares-Cunha et al., 2018). However, it is not clear whether these behaviors are related to changes in 5-HT release, rather than to its content in the ventral hippocampus of prenatally stressed animals. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of prenatal stress on 5-HT and 5HIAA levels in dialysates (*in vivo*), and in homogenates (*in vitro*) of ventral hippocampus, and its possible correlation with sucrose preference and the FST in adulthood. Serum corticosterone concentration was also evaluated in order to assess adrenal response to the FST.

## METHODS

### Subjects

Three-month-old female Wistar rats weighing 250 grams were provided by the vivarium of the Autonomous Metropolitan University, Iztapalapa. Rats were kept under standard laboratory conditions, under an inverted light/dark cycle (lights off at 09:00), temperature 23°C ±1, food and water *ad libitum*. Animal handling and the experimental protocols were in accordance with Mexican official standards (NOM-062-ZOO-1999), as well as the guidelines for ethical research, teaching and information dissemination at the Biology and Health Sciences Division of Autonomous Metropolitan University (2010). This study was approved by the Ethics Commission of the Biology and Health Sciences Division of Autonomous Metropolitan University.

### Experimental design

Experimental design is shown in Fig. 1. Female rats bred with sexually experienced males. Pregnancy was confirmed by the presence of sperm in females' vagina. That day was considered as day zero of gestation. Pregnant females were placed in individual acrylic boxes and weighed daily throughout gestation. Control pregnant females (n=12) were kept in their boxes with routine care by the vivarium staff and were weighed. Pregnant females in the maternal stress group (n=12) were exposed to stress by immersion in cold water.

### Gestational stress procedure

During the last week of gestation (day 15 to 21), pregnant females from the stress group were taken to another room and placed individually in a tank filled with water to a 15 cm height. Water temperature was 15°C. The rats remained there for 15-min; this process was performed twice a day (09:00 AM and 15:00 PM) (García-Vargas et al., 2019). At birth, litters from each experimental group were sexed, weighed, and standardized in number by cross-fostering within each experimental group. Pups were weaned at postnatal day 22, and males were separated from the females. Male descendants only were used for this study. One male from each of ten litters per group was tested in each experiment, as is appropriate for studies using mammals that have litters (Holson and Pearce, 1992; Williams et al., 2017). Hence, 10 (non-siblings) prenatally stressed or control males were used separately in the behavioral tests at 3 months of age.

## Behavioral tests

### Sucrose preference

Sucrose intake was assessed in males from the control and prenatal stress groups (n=15, each group). Sucrose concentration used are variable in several studies, 1% (Muscat and Willner, 1992); 2% (Amchova et al., 2014); 2.5% (Tang et al., 2013); 3% (Kalueff et al., 2006); 4% (Barr and Phillips, 1999); 7% (Vollmayr et al., 2004). In this study, an average concentration of 3% sucrose was used. First, rats had access to a 50 mL drinking bottle containing a 3% sucrose solution for 2 days continuously, instead of water. For the next 3 days, one-hour daily tests were done: rats had access to two drinking bottles, one containing water, and the other containing a 3% sucrose solution. The bottles were exchanged after 30 min to prevent place preference. Before the last day of sucrose intake test, rats were food and water deprived for 21 h. On the 6<sup>th</sup> day, at the beginning of the dark phase, rats had access to bottles containing 50 mL of the sucrose solution. The volume consumed in millilitres was evaluated and expressed as a percentage (Tang et al., 2013). According to the endpoint sucrose intake, rats from the prenatal stress group were classified into anhedonic (those which consumed less than 32 mL,  $\leq 65\%$ ), and non-anhedonic (those which consumed sucrose in a similar way to the control rats, more than 33 mL,  $\geq 65\%$ ), as has been previously defined by other authors (Bergström et al., 2007; Strekalova et

al., 2011). After the sucrose test, males were euthanized by decapitation, the ventral hippocampus was dissected, weighed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until 5-HT and 5-HIAA content evaluation by HPLC-ED. Trunk blood was also collected for corticosterone assessment.

### Forced swim test (FST)

In other control (n=15) and prenatally stressed males (n=15), the FST was performed (Porsolt et al., 1977) 24 h after the sucrose test. Tests were done during the dark phase of the light-dark cycle. Rats were individually placed in an acrylic cylinder (60 cm height, 30 cm diameter) containing water (40 cm height,  $25^{\circ}\text{C}$ ) (Sunal et al., 1994). Before the test, each rat received a first session, during which they were placed in the cylinder for 15 min. 24 h after the pre-test, a 5 min experimental session was done. Rats were individually placed in the cylinder, immobility (rat remained floating making only movements necessary to keep its head above water) was scored, as well as the time it spent swimming and climbing. Rat behavior was video-recorded for further analysis. All tests were carried out by an experimenter blinded to treatment.

### Tissue preparation for serotonin and metabolite concentrations in homogenates

At the end of the 5-min FST session, rats were euthanized by decapitation. The right ventral hippocampus

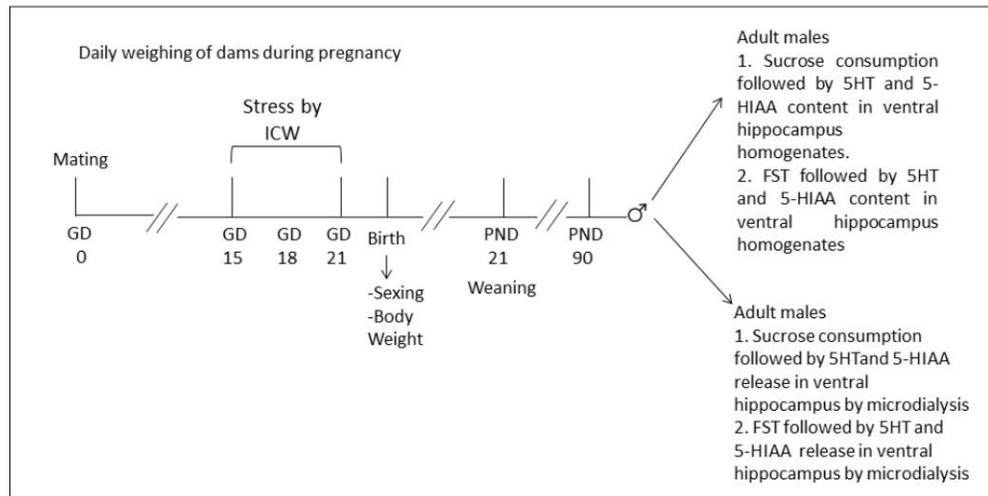


Fig. 1. Timeline of experimental design. GD: Gestational day; ICW: Immersion in cold water; PND: Postnatal day; 5-HT: Serotonin; 5-HIAA: 5-Hydroxyindoleacetic acid; FST: Forced swim test.

was dissected, weighed and stored at a temperature of  $-80^{\circ}\text{C}$  until the samples were evaluated. Weights from ventral hippocampus were 35 mg on average. Subsequently, the samples were thawed and 300  $\mu\text{L}$  of perchloric acid were added, the tissue was homogenized in ice and centrifuged for 15 min at 8000 rpm at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was filtered with a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane (Sigma), and 10  $\mu\text{L}$  of the filtered sample was injected into the chromatographic system (HPLC-ED) for quantification of tissue serotonin and its metabolite. Also, trunk blood samples were obtained for corticosterone evaluation.

#### Microdialysis procedure

In other rats the sucrose test was performed. After identifying anhedonic and non-anhedonic rats, cannulas directed toward the right ventral hippocampus were implanted to perform microdialysis in order to quantify 5-HT release and its metabolite, 5-HIAA. Control ( $n=10$ ), anhedonic ( $n=10$ ), and non-anhedonic ( $n=5$ ) males were anesthetized with a single dose of ketamine (PISA) (80 mg/kg, i.p) and xylazine (PISA) (20 mg/kg, i.m). A stereotaxic apparatus (Stoelting, 51600, Wood Dale, IL, USA) was used to secure the head of the rat. The guide cannula was placed toward the ventral hippocampus with the following coordinates: antero/posterior (A/P) -5.3 mm from bregma, medial/lateral to midline (M/L) -5.2 mm, and dorsal/ventral from dura (D/V) -7.5 mm (Paxinos et al., 1980). It was secured with screws and dental acrylic. A scheme presenting the section of the brain with the probe positioning, as well as a photomicrograph are shown

in Fig. 2. After a 10-day recovery period, the microdialysis probe (polyacrylonitrile membrane, pore size 40,000 D) was introduced, protruding 3 mm below the guide cannula to the ventral hippocampus, then the cannula was secured to the skull with dental acrylic. A period of two hours allowed for stabilization of the cellular environment in the ventral hippocampus. Then, two samples were taken every h (10  $\mu\text{L}$  each) and were injected to HPLC-ED system. In other control ( $n=10$ ) and prenatally stressed males ( $n=15$ ), the sucrose test was performed and prenatally stressed males were identified as anhedonic or non-anhedonic. Subsequently, cannulas directed toward the ventral hippocampus were implanted to perform microdialysis. After a 10-day recovery period, a 15 min session of the FST was carried out in all animals. The following day, two hours before a 5 min session, a microdialysis cannula was introduced, protruding 3 mm below the guide cannula to the ventral hippocampus, and secured to the skull with dental acrylic; two samples were obtained every h. Immediately after the 5 min session of FST, two samples were collected every h, and 10  $\mu\text{L}$  from each sample were injected into the chromatographic system.

#### Biochemical procedures

##### Corticosterone quantification

The steroids extraction was performed according to the method reported by Woodward and Emery (1987). Serum (1 mL) was mixed with 100  $\mu\text{L}$  of a 19-nortestos-

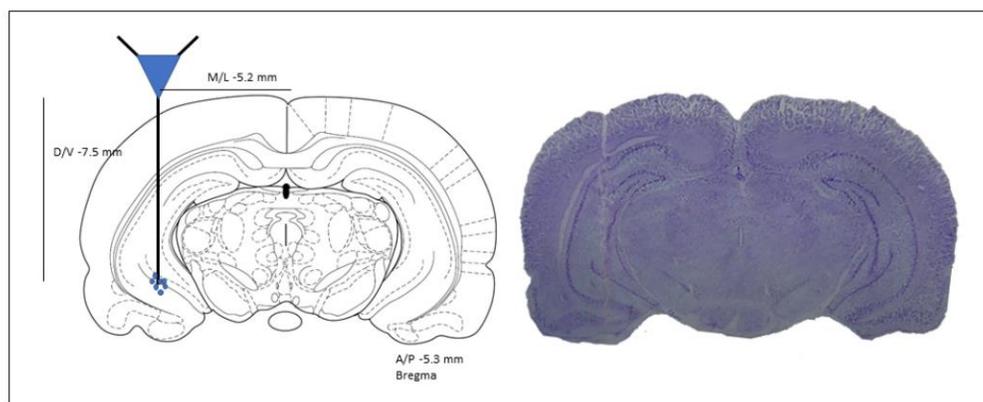


Fig. 2. Scheme and photomicrograph presenting the section of the brain with probe positioning. Coordinates: Antero/Posterior (A/P) -5.3 mm from bregma, Medial/Lateral to midline (M/L) -5.2 mm, and Dorsal/Ventral from dura (D/V) -7.5 mm. Magnification of coronal cut of brain: 4x.

terone (5 µg/mL in methanol) solution as an internal control. Corticosterone was extracted in 5 mL of diethyl ether-dichloromethane (60:40 v/v) and centrifuged for 5 min at 8,000 rpm. The organic phase was obtained and mixed with HPLC-grade water and centrifuged for five min. The organic phase (3 mL) was obtained and evaporated at room temperature. The residue was dissolved in 100 µl of methanol-water (60:40 v/v). Corticosterone was evaluated in a HPLC system with a precolumn (Symmetry C18, particle size 3.5 µm, 2.1 × 10 mm, Waters Corp., Milford, MA, USA). Separation of the analytes was done at 40°C, in a Waters Symmetry C18 column (particle size 5 µm, column size 2.0 × 150 mm, Waters Corp., Milford, MA, USA), with water-acetonitrile HPLC grade (65:35 v/v) at a flow of 0.4 mL/min. A 600-MS controller system was used for the mobile phase and the steroids were detected with a Waters 486 UV detector (250 nm). The results were analysed using the Millennium 32 program (Waters Corp., Milford, MA, USA).

#### Serotonin assessment

A Waters pump model 515 (Waters Corp., Milford, MA, USA) was used for delivery of the mobile phase of phosphates, pH 3.1, at a 0.3 mL/min flow rate. The samples were injected with a Rheodyne manual injector (Waters Corp., Milford, MA, USA). Separation of the analytes was done on a Symmetry C18 column, particle size 2.5 mm × 25 mm (Waters Corp., Milford, MA, USA). The analytes were detected by an electrochemical detector, model 2476 (Waters Corp., Milford, MA, USA) at + 800 mV and a sensitivity of 2 nA. The results were analysed using the Millennium 32 program (Waters Corp., Milford, MA, USA).

#### Statistical analysis

Body weight gain in pregnant dams was analysed by linear regression and the slope of the curves was compared. Length of pregnancy, number in litters, male pups, and body weight at birth were analysed with Student's t-test. The percentage of sucrose preference was analysed by Chi square test. Forced swimming test was analysed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a *post hoc* multiple comparison Tukey test. Corticosterone concentrations, serotonin and its metabolite content and release after sucrose preference test and after FST, as well as the metabolic rates, were analysed by repeated measures two-way ANOVA, followed by a *post hoc* multiple comparison Tukey-Kramer test. Pearson correlation test was used to analyze the correlation between corticosterone vs. serotonin

content and release, as well as vs. sucrose intake. The correlation between content and release of serotonin vs. immobility, swimming and sucrose intake was also evaluated. The differences were considered significant when  $P < 0.05$ . The statistical analysis was performed by a GraphPad PRISM version 6.01 statistical software (GraphPad Software Inc., USA).

## RESULTS

### Body weight gain in pregnant females and offspring birth weight

Stressed pregnant mothers showed lower body weight gain compared to control pregnant females. The slopes were different for control ( $10.66 \pm 0.8477$ ) and maternal stress ( $7.784 \pm 0.6725$ ) groups ( $P = 0.018$ ). Body weight gain was lower in stressed pregnant mothers during the last week of pregnancy compared to non-stressed mothers. The correlation coefficient ( $r^2$ ) for the control group was 0.9816 and for the prenatal stress group it was 0.9749. (Fig. 3). No differences were found in the length of pregnancy in control ( $22.62 \pm 0.17$  d) and stressed dams ( $23.37 \pm 0.17$  d).

Regarding offspring, there were no differences in the litter size between control ( $10.62 \pm 0.34$ ) and prenatally stressed rats ( $9.87 \pm 1.56$ ), nor in the number of males in the control ( $5.5 \pm 0.99$ ) and prenatally stressed offspring ( $4.62 \pm 1.08$ ). Birth weight of prenatally stressed males was lower ( $6.03 \pm 0.07$  g) than that of control males ( $6.84 \pm 0.13$  g), [ $t_{00} = 5.407$ ,  $P = 0.0001$ ].

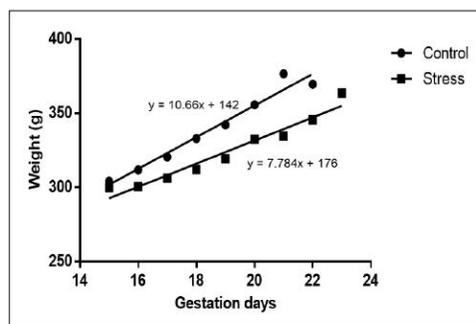


Fig. 3. Body weight gain in pregnant rats from gestational days 15 to 23. Stressed mothers had less body weight gain during pregnancy. Correlation coefficient for control line: 0.9898; Correlation coefficient for stress line: 0.9749. The slopes indicate the average increase in body weight per day, which were significantly lower in stressed dams compared to control dams ( $P = 0.01$ ).  $n = 12$  per group.

### Sucrose preference test

The sucrose consumption test showed that 69% of the prenatally stressed rats were anhedonic, as shown by lower sucrose consumption; 31% were considered non-anhedonic, as their sucrose consumption and preference were similar to that of control rats. Anhedonic rats showed lower sucrose preference (30%) than control and non-anhedonic rats (70%) [ $\chi^2=38.84$ ,  $P=0.003$ ] (Fig. 4).

### Forced swim test

The duration of immobility observed in prenatally stressed rats (both anhedonic and non-anhedonic) during FST was significantly higher than that of con-

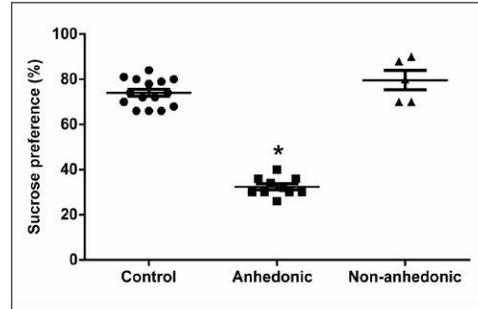


Fig. 4. Sucrose preference in control, anhedonic, and non-anhedonic rats. Percentage of preference was similar in control and non-anhedonic rats. \*  $P=0.01$ , compared to control and non-anhedonic males. Control group:  $n=15$ ; Anhedonic:  $n=10$ ; Non-anhedonic:  $n=5$ .

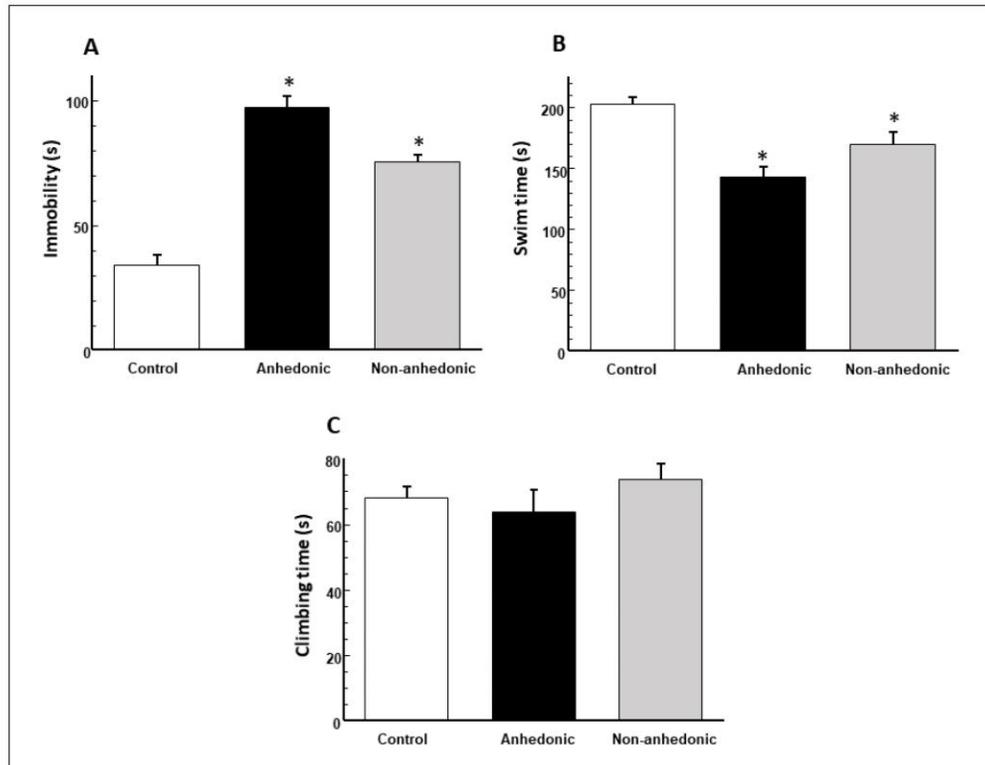


Fig. 5. Forced swim test (FST) parameters. (A) Immobility increased in prenatally stressed anhedonic and non-anhedonic rats. (B) Swim time was shorter in prenatally stressed rats. (C) Climbing time was similar in all groups. Data shown as Mean  $\pm$  S.E.M. \*  $P=0.01$ , compared to the control group. Control group:  $n=15$ ; Anhedonic:  $n=10$ ; Non-anhedonic:  $n=5$ .

control males [ $F_{2,27}=70.09$ ,  $P=0.0001$ ] (Fig. 5A). In contrast, time spent swimming decreased in the anhedonic and non-anhedonic rats [ $F_{2,27}=18.02$ ,  $P=0.0001$ ] (Fig. 5B). No differences were observed in the time for climbing behavior during the 5-min FST [ $F_{2,27}=0.760$ ,  $P=0.476$ ] (Fig. 5C).

### Serotonin release and 5-HIAA

After sucrose preference test, 5-HT release in the ventral hippocampus was similar among control, anhedonic and non-anhedonic males. After FST, 5-HT release increased in the ventral hippocampus of control rats ( $F_{2,45}=713.33$ ,  $P=0.0001$ ). In anhedonic rats, a slight but significant increase was observed, whereas no change in 5-HT release was observed in non-anhedonic rats (Fig. 6A). After sucrose preference test, extracellular 5-HIAA in the ventral hippocampus of prenatally stressed rats was higher, compared to control rats. After FST, extracellular 5-HIAA in the control group increased with respect to extracellular concentration after sucrose preference test. In comparison, the metabolite decreased in the ventral hippocampus of anhedonic and non-anhedonic rats, being lower than in control rats after the FST [ $F_{2,45}=31.17$ ,  $P=0.001$ ] (Fig. 6B). In the control group, 5-HT release correlated negatively with

immobility duration in the FST ( $r=-0.8651$ ,  $P=0.0119$ ) and positively with swim duration ( $r=0.9702$ ,  $P=0.0003$ ). In contrast to controls, low 5-HT release correlated negatively with immobility duration ( $r=-0.8066$ ,  $P=0.0284$ ) and positively with swim duration during the FST in anhedonic rats ( $r=0.8226$ ,  $P=0.0231$ ). In a similar way to anhedonic males, a negative correlation between 5-HT release and immobility duration ( $r=-0.9295$ ,  $P=0.0024$ ) and positive correlation with swim duration ( $r=0.7729$ ,  $P=0.0416$ ) were observed in non-anhedonic rats. 5-HT metabolic rate, obtained of dialysates from microdialysis, showed higher 5-HT metabolism in the ventral hippocampus of anhedonic rats, compared to control and non-anhedonic rats, after sucrose preference test ( $F_{2,45}=9.77$ ;  $P=0.001$ ). After FST, however, metabolic rate decreased in all groups, but was higher in prenatally stressed males compared to controls (Table 1).

### Content of 5-HT and 5HIAA in the ventral hippocampus

5-HT content in ventral hippocampus was similar in the rats of all three groups: control, anhedonic and non-anhedonic after sucrose preference test. After FST, 5-HT content decreased in the ventral hippocampus of control rats, while in anhedonic rats it increased

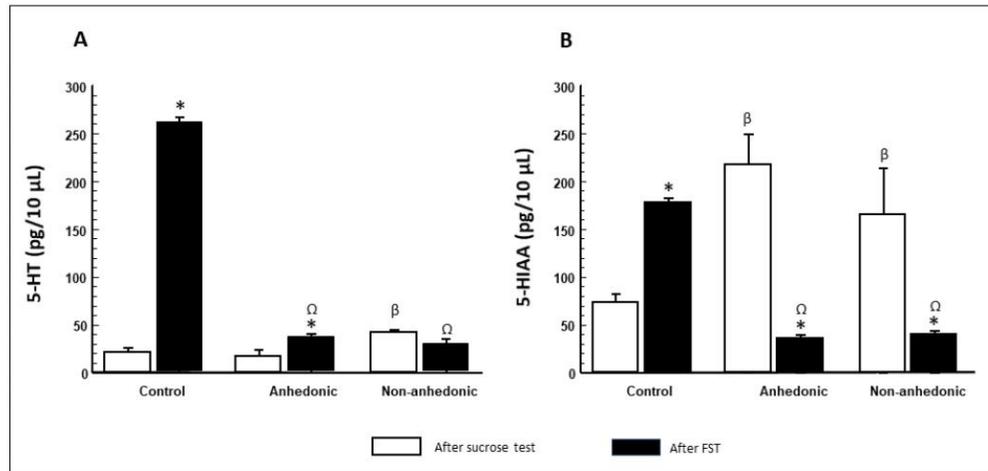


Fig. 6. (A) Serotonin (5-HT) levels in dialysates of ventral hippocampus after sucrose preference test and after the forced swim test (FST). 5-HT release increased in control rats after the FST, but in anhedonic rats a slight increase was observed. 5-HT levels did not modify in non-anhedonic rats. (B) Extracellular 5-HIAA in dialysates of ventral hippocampus. After sucrose preference test, the metabolite was higher in prenatally stressed rats. After the FST, metabolite concentration in anhedonic and non-anhedonic males decreased and were lower than in control males. Data shown as mean  $\pm$  S.E.M. \* $P=0.01$  compared to levels after sucrose preference test;  $^{\beta}P=0.01$  compared to control group after sucrose preference test;  $^{\Omega}P=0.01$ , compared to control group after FST. Control group:  $n=10$ ; Anhedonic:  $n=10$ ; Non-anhedonic:  $n=5$ .

Table I. Serotonin (5-HT) metabolic rates in the ventral hippocampus after sucrose preference test (SPT) and after forced swimming test (FST).

	5HIAA/5HT			
	Homogenates		Dialysates	
	After SPT	After FST	After SPT	After FST
Control	0.44±0.07	2.18±0.35*	3.91±0.41 <sup>Ω</sup>	0.68±0.01*
Anhedonic	0.85±0.21*	0.35±0.04 <sup>Ωβ</sup>	9.11±1.75*	1.13±0.12 <sup>Ωβ</sup>
Non-anhedonic	0.60±0.07	0.39±0.03 <sup>β</sup>	4.74±1.42 <sup>Ω</sup>	1.56±0.15 <sup>Ωβ</sup>

Data shown as mean ± S.E.M. Repeated measures ANOVA. \* $P=0.01$ , compared to control after SPT; <sup>Ω</sup> $P=0.01$  compared to anhedonic after SPT; <sup>β</sup> $P=0.01$  compared to anhedonic or non-anhedonic after SPT; <sup>Ω</sup> $P=0.01$  compared to control after FST.

significantly; in non-anhedonic rats 5-HT did not modified after FST [ $F_{2,55}=44.10$ ;  $P=0.0001$ ], (Fig. 7A). 5-HIAA content in the ventral hippocampus of anhedonic rats was higher than in control rats after sucrose preference test, whereas metabolite content in non-anhedonic rats was similar to controls. After FST, metabolite content increased significantly in control rats ( $F_{2,55}=10.59$ ,  $P=0.001$ ); in anhedonic and non-anhedonic rats, however, there were no changes after FST with respect to their values after sucrose preference test (Fig. 7B). Hippocampal serotonin content in anhedonic rats after sucrose preference test correlated positively with longer immobility times in these rats ( $r=0.8398$ ,  $P=0.0364$ ).

### Metabolic rate (5HIAA / 5HT)

5-HT metabolic rate in homogenates from ventral hippocampus of control animals increased after the FST. In prenatally stressed, anhedonic rats, the metabolic rate was higher than in control rats after sucrose preference test, but decreased significantly after FST [ $F_{2,55}=51.36$ ,  $P=0.0001$ ] (Table I).

### Serum corticosterone

Corticosterone concentrations in prenatally stressed, anhedonic male rats were significantly

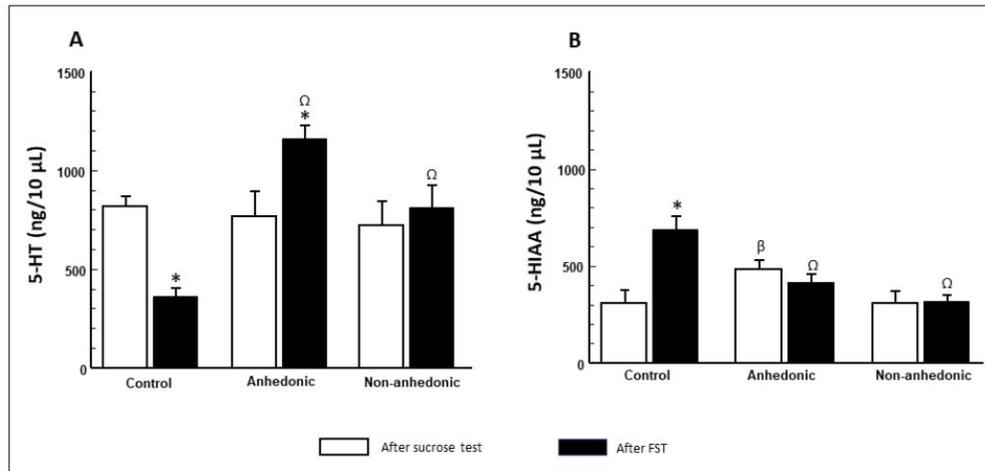


Fig. 7. (A) Serotonin (5-HT) content in homogenates from ventral hippocampus after sucrose preference test and after FST conditions. 5-HT content after sucrose preference test was similar in control and prenatally stressed rat. After the FST, 5-HT levels decreased in control males, but in anhedonic males 5-HT content increased. No changes were observed in non-anhedonic rats. (B) 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) content in homogenates from ventral hippocampus. Metabolite concentration increased after the forced swim test (FST) in the control group, but it did not change in prenatally stressed rats. Data shown as Mean ± S.E.M. \* $P=0.01$ , compared with levels after the sucrose preference test; <sup>β</sup> $P=0.01$  compared to control group after sucrose preference test; <sup>Ω</sup> $P=0.01$  compared to control group after the FST. Control group:  $n=5$ ; Anhedonic:  $n=0$ ; Non-anhedonic:  $n=5$ .

higher than those of control male rats after sucrose preference test. Corticosterone levels increased in all groups after FST, with the highest adrenal axis response in anhedonic rats compared to control rats. [ $F_{2,35}=102.90$ ,  $P=0.0001$ ]. Anhedonic and non-anhedonic males showed higher corticosterone levels than control males, after sucrose preference test and after FST (Fig. 8). Corticosterone levels in anhedonic rats after the FST correlated positively with immobility duration ( $r=0.9578$ ,  $P=0.0001$ ), and negatively with swim duration ( $r=-0.9645$ ,  $P=0.0001$ ). In non-anhedonic animals, no correlation was observed between the above-mentioned parameters. Corticosterone concentration in anhedonic rats also correlated negatively with sucrose consumption ( $r=-0.9463$ ,  $P=0.0001$ ).

## DISCUSSION

The results of the present study show that prenatal stress does not modify 5HT and 5-HIAA levels after sucrose preference test, but it increases serotonin metabolism in anhedonic rats. Behavioral alterations in sucrose preference test and FST in prenatally stressed rats are related to alterations in the content, release, and metabolism of serotonin in the ventral hippocampus. These effects correlate to the high levels of corticosterone in anhedonic offspring, but not in non-anhedonic offspring.

The lower body weight gain observed in stressed mothers during the last week of gestation (Fig. 3) is similar to that reported in other studies (Amugongo and Hlusko 2014; Van den Hove et al., 2014; Franko et al., 2017). This result could be explained by the decrease in food intake, as has been previously reported in pregnant females submitted to stress (Ward and Wainwright, 1988). Activation of the HPA axis during stress can interfere with body weight gain since, in addition to stimulating the release of ACTH in the pituitary gland, corticotropin-releasing hormone (CRH), also acts as an anorexigenic peptide in the hypothalamus, suppressing appetite and food intake in stressed subjects (Charmandari et al., 2005).

The lower birth weight observed in prenatally stressed males compared to control males ( $6.03\pm 0.07$  g vs.  $6.84\pm 0.13$  g), is consistent with other stress protocols that have been previously reported (Van den Hove et al., 2014). Other studies, however, did not find changes in offspring birth weight (Abe et al., 2007; Zohar and Weinstock, 2011; Amugongo and Hlusko 2014). The differences in this result could be explained by the type of stressor used. During fetal development, the placenta provides oxygen and nutrients to the fetus through diffusion and other types of

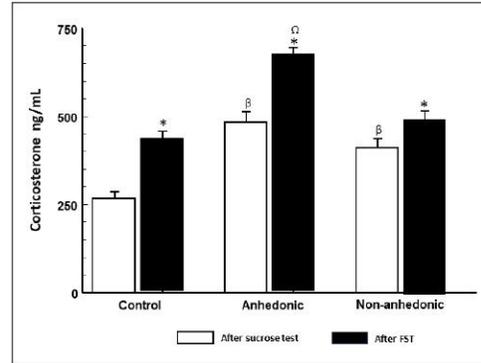


Fig. 8. Serum corticosterone levels after sucrose preference test and after forced swim test (FST). Hormone levels after sucrose preference test were higher in anhedonic and non-anhedonic rats compared to controls. After FST, corticosterone increased to a greater extent in anhedonic rats than in control and non-anhedonic rats. Non-anhedonic rats showed a slight increase in corticosterone after FST. Data shown as Mean  $\pm$  S.E.M. \*  $P=0.01$  compared to corticosterone levels after sucrose preference test; <sup>β</sup>  $P=0.01$  compared to control after the sucrose preference test; <sup>Ω</sup>  $P=0.01$ , compared to levels in control and anhedonic rats after FST. Control group:  $n=15$ ; Anhedonic:  $n=10$ ; Non-anhedonic:  $n=5$ .

regulated transport, and these processes can be disturbed by glucocorticoids (Brunton et al., 2010). Cold water immersion stress significantly increases the level of glucocorticoids during pregnancy by 200%, compared with non-stressed dams (Guerrero et al., 2016; García-Vargas et al., 2019), modifying placental functionality. High maternal glucocorticoids during gestational stress might lead to decreased nutrient transport to the fetus, decreasing glucose transporter GLUT1, and consequently, glucose transport to the fetus (Viltart and Vanbesien-Mailliot, 2007).

The lower sucrose preference observed in prenatally stressed rats (Fig. 4) is in agreement with that reported in other studies (Alonso et al., 1991; Zhang et al., 2017). In those studies, however, no differentiation was made between anhedonic and non-anhedonic rats. In this study, 69% of prenatally stressed rats were considered anhedonic due to their low sucrose preference. The remaining 31% of prenatally stressed males showed sucrose consumption and preference similar to control males, thus being considered as non-anhedonic (Bergström et al., 2007; Strelakova et al., 2011). Several studies indicate that in animal models, there is a significant variation, among individuals, in their response to stress (Schmidt et al., 2010; Scharf and Schmidt, 2012). Rats that have experienced prenatal stress can be separated in those that are

vulnerable (anhedonic) and those that are resilient (non-anhedonic) (Krishnan and Nestler, 2011), allowing a more precise analysis of depression-like behavior generated by prenatal stress. Probably, this difference can be explained by differential gene expression in the hippocampus of anhedonic and non-anhedonic rats (Strekalova et al., 2011). The fact that not all the individuals exposed to stress develop stress-related problems indicates resilience, showing better outcomes despite severe stress exposure (Russo et al., 2012). DNA methylation is an epigenetic mechanism for reprogramming the genome after early life stress. Recently, it has been reported in children that prenatal stress may epigenetically shape resilience by methylating genes such as those encoding the glucocorticoid receptor (*NR3C1*) and its repressor (*FKBP41*). The methylation of these genes indicates an enhanced ability to terminate hormonal stress responses in prenatally stressed children, and more DNA methylation have been observed in heterochromatin regions associated with stress/disease resilience (Serpeloni et al., 2019). This may explain the lower hyperactivity and hyperreactivity of the adrenal axis observed in non-anhedonic rats after the FST, compared to anhedonic rats. Anhedonic behavior is associated with a decrease in the activity of the reward system (pleasure), and brain areas involved in anhedonic behavior are found in the mesolimbic system. The main projections are dopaminergic, which go from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens (NAc), in the ventral striatum (Wise, 2008). Anhedonic behavior, shown by decreased response to reward stimuli, is associated with a lower release of dopamine in the nucleus accumbens (Di Chiara et al., 1999) and in the bed nucleus of the stria terminalis (Soares-Cunha et al., 2018). Serotonin modulates dopamine release (Yan, 2000), and could have a regulatory role in the reward process and in anhedonic behavior (Der-Avakian and Markou, 2012). Chronic treatment with Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) antidepressants increases sucrose preference in mice (El Yacoubi et al., 2011), and 5-HT synthesis blockage results in partial impairment in reward experiments (Liu et al., 2014). The light 5-HT release in the ventral hippocampus of non-anhedonic rats after sucrose preference test, compared to control group, is consistent with that evidence, since they had a sucrose preference similar to control rats. In anhedonic rats, the low sucrose preference could be explained by other mechanisms. For example, it has been reported that a decrease in 5-HT transporter (5-HTT) expression is associated with a stress-induced anhedonic state, whereas an increase in the transporter is associated with stress-induced non-anhedonic state (Tang et al., 2013). Thus,

studies on 5-HTT expression should be done in prenatally stressed animals, anhedonic and non-anhedonic.

The longer duration of immobility observed in adult prenatally stressed, anhedonic and non-anhedonic rats, as well as shorter swimming durations in the FST, are consistent with other studies despite differences in the protocol of prenatal stress: immobilization and exposure to intense light (Morley-Fletcher et al., 2003; 2004). Other studies report effects of prenatal stress in females, but not in males (Alonso et al., 2000; Frye and Wawrzycki, 2003). The discrepancies could be explained by the stress protocol used. In those reports, stress was caused by exposure to bright light while immobilization was used only on day 18 of gestation. In contrast, in this study, the stressor was applied from day 15 to day 21 of gestation and consisted in cold-water immersion, which is a more intense stressor than others, as it causes a drastic elevation of corticosterone in pregnancy (Guerrero et al., 2016; García-Vargas et al., 2019), and it does not allow habituation to the stressor (Retana-Márquez et al., 2003). In many studies, immobility is the variable that is quantified in the FST to confirm depression-like behavior (learned helplessness) (Porsolt et al., 1977; 1979), since the animal cannot escape, it stops trying and remains immobile, which has been anthropomorphically interpreted as “despair”, a depression-like phenotype. In spite of the FST has been considered a depression-like behavior, it is rather a behavioral adaptation for survival (Porsolt et al., 1978; Cryan and Mombereau, 2004; Molendijk and Kloet, 2015; Campus et al., 2015; De Kloet and Molendijk, 2016), and it is a useful behavioral test for the assessment of adrenal and serotonergic response to acute stress, since this test assess coping strategies to an acute inescapable stressor (Commons et al., 2017). The results of the present study indicate that prenatal stress alters the functionality of the serotonergic system, which is consistent with evidence indicating that stress during pregnancy causes neurochemical changes that affect the hippocampal serotonergic system (Charil et al., 2016), modifying the content of serotonin (Hayashi et al., 1998). The high content and low release of serotonin in anhedonic rats correlated negatively with immobility durations and shorter swim durations observed in the FST.

In contrast to other studies reporting low 5-HT and high 5-HIAA content in ventral hippocampus of prenatally stressed rats (Hayashi et al., 1998; Soares-Cunha et al., 2018), no changes were observed in 5-HT, but higher 5-HIAA content was found after the sucrose preference test in our study. After the FST, 5-HT content increased, without changes in 5-HIAA. These differences can be due to differences in the type of stressor used: crowding and saline injection (Hayashi

vulnerable (anhedonic) and those that are resilient (non-anhedonic) (Krishnan and Nestler, 2011), allowing a more precise analysis of depression-like behavior generated by prenatal stress. Probably, this difference can be explained by differential gene expression in the hippocampus of anhedonic and non-anhedonic rats (Strekalova et al., 2011). The fact that not all the individuals exposed to stress develop stress-related problems indicates resilience, showing better outcomes despite severe stress exposure (Russo et al., 2012). DNA methylation is an epigenetic mechanism for reprogramming the genome after early life stress. Recently, it has been reported in children that prenatal stress may epigenetically shape resilience by methylating genes such as those encoding the glucocorticoid receptor (*NR3C1*) and its repressor (*FKBP41*). The methylation of these genes indicates an enhanced ability to terminate hormonal stress responses in prenatally stressed children, and more DNA methylation have been observed in heterochromatin regions associated with stress/disease resilience (Serpeloni et al., 2019). This may explain the lower hyperactivity and hyperreactivity of the adrenal axis observed in non-anhedonic rats after the FST, compared to anhedonic rats. Anhedonic behavior is associated with a decrease in the activity of the reward system (pleasure), and brain areas involved in anhedonic behavior are found in the mesolimbic system. The main projections are dopaminergic, which go from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens (NAc), in the ventral striatum (Wise, 2008). Anhedonic behavior, shown by decreased response to reward stimuli, is associated with a lower release of dopamine in the nucleus accumbens (Di Chiara et al., 1999) and in the bed nucleus of the stria terminalis (Soares-Cunha et al., 2018). Serotonin modulates dopamine release (Yan, 2000), and could have a regulatory role in the reward process and in anhedonic behavior (Der-Avakian and Markou, 2012). Chronic treatment with Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) antidepressants increases sucrose preference in mice (El Yacoubi et al., 2011), and 5-HT synthesis blockage results in partial impairment in reward experiments (Liu et al., 2014). The light 5-HT release in the ventral hippocampus of non-anhedonic rats after sucrose preference test, compared to control group, is consistent with that evidence, since they had a sucrose preference similar to control rats. In anhedonic rats, the low sucrose preference could be explained by other mechanisms. For example, it has been reported that a decrease in 5-HT transporter (5-HTT) expression is associated with a stress-induced anhedonic state, whereas an increase in the transporter is associated with stress-induced non-anhedonic state (Tang et al., 2013). Thus,

studies on 5-HTT expression should be done in prenatally stressed animals, anhedonic and non-anhedonic.

The longer duration of immobility observed in adult prenatally stressed, anhedonic and non-anhedonic rats, as well as shorter swimming durations in the FST, are consistent with other studies despite differences in the protocol of prenatal stress: immobilization and exposure to intense light (Morley-Fletcher et al., 2003; 2004). Other studies report effects of prenatal stress in females, but not in males (Alonso et al., 2000; Frye and Wawrzycki, 2003). The discrepancies could be explained by the stress protocol used. In those reports, stress was caused by exposure to bright light while immobilization was used only on day 18 of gestation. In contrast, in this study, the stressor was applied from day 15 to day 21 of gestation and consisted in cold-water immersion, which is a more intense stressor than others, as it causes a drastic elevation of corticosterone in pregnancy (Guerrero et al., 2016; García-Vargas et al., 2019), and it does not allow habituation to the stressor (Retana-Márquez et al., 2003). In many studies, immobility is the variable that is quantified in the FST to confirm depression-like behavior (learned helplessness) (Porsolt et al., 1977; 1979), since the animal cannot escape, it stops trying and remains immobile, which has been anthropomorphically interpreted as “despair”, a depression-like phenotype. In spite of the FST has been considered a depression-like behavior, it is rather a behavioral adaptation for survival (Porsolt et al., 1978; Cryan and Mombereau, 2004; Molendijk and Kloet, 2015; Campus et al., 2015; De Kloet and Molendijk, 2016), and it is a useful behavioral test for the assessment of adrenal and serotonergic response to acute stress, since this test assess coping strategies to an acute inescapable stressor (Commons et al., 2017). The results of the present study indicate that prenatal stress alters the functionality of the serotonergic system, which is consistent with evidence indicating that stress during pregnancy causes neurochemical changes that affect the hippocampal serotonergic system (Charil et al., 2016), modifying the content of serotonin (Hayashi et al., 1998). The high content and low release of serotonin in anhedonic rats correlated negatively with immobility durations and shorter swim durations observed in the FST.

In contrast to other studies reporting low 5-HT and high 5-HIAA content in ventral hippocampus of prenatally stressed rats (Hayashi et al., 1998; Soares-Cunha et al., 2018), no changes were observed in 5-HT, but higher 5-HIAA content was found after the sucrose preference test in our study. After the FST, 5-HT content increased, without changes in 5-HIAA. These differences can be due to differences in the type of stressor used: crowding and saline injection (Hayashi

et al., 1998) or chronic unpredictable mild stress (Soares-Cunha et al., 2018) in those studies vs. immersion in cold water in the present study, which might activate the HPA axis differently, causing different maternal corticosteroid release. Another difference is the age of rats at which 5-HT was evaluated: 3 weeks (Hayashi et al., 1998) or 2 months (Soares-Cunha et al., 2018), and 3 months in the present study. Possibly, 5-HT turnover rate differs with age. In our study, we observed that the metabolic rate of serotonin was higher ( $0.85 \pm 0.21$ ) in prenatally stressed anhedonic rats than in control male rats ( $0.44 \pm 0.07$ ). Although the content of 5-HT after the sucrose preference test was similar in anhedonic and control rats, higher 5-HIAA content in anhedonic males, compared to controls ( $491.55 \pm 39.82$  ng/10  $\mu$ L, and  $319.96 \pm 55.02$  ng/10  $\mu$ L, respectively) were observed. In microdialysis study, higher metabolic rate was observed in anhedonic males ( $9.11 \pm 1.75$ ), compared to controls ( $3.91 \pm 0.41$ ) and non-anhedonic rats ( $4.74 \pm 1.42$ ) after sucrose preference test. These results are consistent with previous reports studying histological 5-HT and its metabolite (Hayashi et al., 1998), in which a higher baseline metabolic rate was reported in prenatally stressed rats compared to their controls. In the current work, the metabolic rate in control males increased, contrasting with prenatally stressed animals, in which metabolic rate decreased, suggesting that serotonin levels were not modified by the FST. This was confirmed by the microdialysis study.

Microdialysis results show that 5-HT release and extracellular concentration of 5-HIAA increased in response to the FST in control males. These data indicate that, under normal conditions, 5-HT is released in response to the FST. Immobility and swimming behaviors have been related to serotonin release (Porsolt et al., 1979). The increase in 5-HT levels in control rats after FST explains the shorter immobility and longer swim durations. In comparison, only a slight increase in 5-HT levels was observed in anhedonic rats, after FST. In non-anhedonic rats, no change was observed in 5-HT, with decreased levels of 5-HIAA after the FST. These results indicate that prenatal stress disrupts the serotonergic system, as shown by negative correlation between immobility and serotonin release in anhedonic and non-anhedonic rats. In addition to low 5-HT release, it is possible that SERT increases 5-HT recapture in prenatally stressed rats, since an increase in SERT expression has been reported in other studies (Bielas et al., 2014). As far as we know, this is the first study that reports the *in vivo* basal serotonin metabolism in the ventral hippocampus and how it changes after the FST in prenatally stressed rats.

The stressful nature of the FST, due to its water component, allows us to evaluate the adrenal response. High corticosterone levels observed in prenatally stressed, anhedonic males with no FST and after the FST, compared with control animals, confirm that prenatal stress causes adrenal axis hyperactivity (high baseline corticosterone levels) and hyperreactivity (increased response to stressors), which is consistent with what was previously reported with other stressors (Koehl et al., 1999). The high concentration of the steroid interferes with serotonergic transmission, causing longer immobility durations and less time swimming (Mitchel and Meaney, 1991; Morley-Fletcher et al., 2003). The higher activity and reactivity of adrenal axis have been attributed to a lower number of GR in the ventral hippocampus, leading to higher corticosterone concentration in prenatally stressed animals (Joëls et al., 2008). As mentioned before, non-anhedonic or resilient rats showing corticosterone response to the FST, similar to that of controls, might be related with epigenetic changes in the expression of the MR gene (Serpeloni et al., 2019). This confirms the differences in the stress response among individuals (Huizink et al., 2004; Bergström et al., 2007; Schmidt et al., 2008). It is likely that GR and MR are not diminished in non-anhedonic animals, allowing an adrenal axis response similar to control animals. This remains to be proven in later studies.

## CONCLUSION

The results of this work show that prenatal stress causes anhedonic behavior, shown as low sucrose preference in 69% of the male offspring, and 31% were non-anhedonic rats. Also, longer immobility durations and less swimming behavior in the FST are observed in prenatally stressed males. These behavioral alterations correlate with low 5-HT content and release in the ventral hippocampus, suggesting that disruption of the serotonergic system contributes to anhedonic behavior and lower swimming durations. Hyperactivity (higher basal levels of corticosterone) and hyperreactivity (increased levels of corticosterone in response to FST) of the adrenal axis in anhedonic rats seem to be involved in the disturbances in 5-HT metabolism.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors want to express their gratitude to Edith Monroy for her advice in the language of the text.

## REFERENCES

- Abe H, Hidaka N, Kawagoe C, Odagiri K, Watanabe Y, Ikeda T, Ishizuka Y, Hashiguchi H, Takeda R, Nishimori T, Ishida Y (2007) Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurosci Res* 59: 145–151.
- Alonso SJ, Damas C, Navarro E (2000) Behavioral despair in mice after prenatal stress. *J Physiol Biochem* 56: 77–82.
- Alonso SJ, Arevalo R, Afonso D, Rodríguez M (1991) Effects of maternal stress during pregnancy on forced swimming test behavior of the offspring. *Physiol Behav* 50: 511–517.
- Amchova P, Kucerova J, Giugliano V, Babinska Z, Zanda MT, Scherma M, Dusek L, Fadda P, Micale V, Sulcova A, Fratta W, Fattore L (2014) Enhanced self-administration of the CB1 receptor agonist WIN55, 212-2 in olfactory bulbectomized rats: evaluation of possible serotonergic and dopaminergic underlying mechanisms. *Front Pharmacol* 5: 1–15.
- Amugongo SK, Hlusko J (2014) Impact of maternal prenatal stress on growth of the offspring. *Aging Dis* 5: 1–16.
- Barr AM, Phillips AG (1999) Withdrawal following repeated exposure to d-amphetamine decreases responding for a sucrose solution as measured by a progressive ratio schedule of reinforcement. *Psychopharmacology* 141: 99–106.
- Basta-Kaim A, Szczesny E, Glombik K, Ślusarczyk J, Trojan E, Tomaszewski KA, Budziszewska B, Kubera M, Lason W (2014) Prenatal stress leads to changes in IGF-1 binding proteins network in the hippocampus and frontal cortex of adult male rat. *Neuroscience* 274: 59–68.
- Bergström A, Jayatissa MN, Thykjaer T, Wiborg O (2007) Molecular pathways associated with stress resilience and drug resistance in the chronic mild stress rat model of depression – a gene expression study. *J Mol Neurosci* 33: 201–215.
- Berumen LC, Rodríguez A, Milei R, García-Alcocer G (2012) Serotonin receptors in hippocampus. *Sci World J* 2012: 1–15.
- Bielas H, Arck P, Bruenahl CA, Walitzka S, Grünblatt E (2014) Prenatal stress increases the striatal and hippocampal expression of correlating c-FOS and serotonin transporters in murine offspring. *Int J Dev Neurosci* 38: 30–35.
- Brunton PJ (2013) Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: Consequences for mother and offspring. *Reproduction* 146: R175–R189.
- Brunton PJ, Russell JA (2010) Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex specific effects. *J Neuroendocrinol* 22: 258–271.
- Campus P, Colelli V, Orsini C, Sarra D, Cabib S (2015) Evidence for the involvement of extinction-associated inhibitory learning in the forced swimming test. *Behav Brain Res* 278: 348–355.
- Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S (2010) Prenatal stress and brain development. *Brain Res Rev* 65: 56–79.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67: 259–284.
- Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG (2017) The rodent forced swim test measures stress-coping strategy, not depression-like behavior. *ACS Chem Neurosci* 8: 955–960.
- Cryan JF, Mombereau C (2004) In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psych* 9: 326–357.
- de Kloet ER, Molendijk ML (2016) Coping with the forced swim stressor: towards understanding an adaptive mechanism. *Neural Plast* 2016: 1–13.
- Der-Avakian A, Markou A (2012) The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends in Neurosci* 35: 68–77.
- Di Chiara G, Loddio P, Tanda G (1999) Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. *Biol Psychiatry* 46: 1624–1633.
- El Yacoubi M, Dubois M, Gabriel C, Mocaër E, Vaugeois JM (2011) Chronic agomelatine and fluoxetine induce antidepressant-like effects in H/Rouen mice, a genetic mouse model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 100: 284–288.
- Entringer S, Buss C, Wadhwa PD (2015) Prenatal stress, development, health and disease risk: A psychobiological perspective-2015 Curt Richter Award Paper. *Psychoneuroendocrinology* 62: 366–375.
- Fan JM, Chen XQ, Jin H, Du JZ (2009) Gestational hypoxia alone or combined with restraint sensitizes the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and induces anxiety-like behavior in adult male rat offspring. *Neuroscience* 159: 1363–1373.
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65: 7–19.
- Franko KL, Forhead AJ, Fowden AL (2017) Effects of stress during pregnancy on hepatic glucogenic capacity in rat dams and their fetuses. *Physiol Rep* 5: e13293-e13301.
- Frye CA, Wawrzycki J (2003) Effect of prenatal stress and gonadal hormone condition on depressive behaviors of female and male rats. *Horm Behav* 44: 319–326.
- García-Vargas D, Juárez-Rojas L, Rojas S, Retana-Márquez S (2019) Prenatal stress decreases sperm quality, mature follicles and fertility in rats. *Syst Biol Reprod Med* 65: 223–235.
- Gemmel M, Rayen I, Lotus T, van Donkelaar E, Steinbusch HW, De Lacalle S, Kokras N, Dalla C, Pawluski JL (2016) Developmental fluoxetine and prenatal stress effects on serotonin, dopamine, and synaptophysin density in the PFC and hippocampus of offspring at weaning. *Dev Psychobiol* 58: 315–327.
- Glombik K, Stachowicz A, Ślusarczyk J, Trojan E, Budziszewska B, Suski M, Kubera M, Lason W, Wędzony K, Olszanecki R, Basta-Kaim A (2015) Maternal stress predicts altered biogenesis and the profile of mitochondrial proteins in the frontal cortex and hippocampus of adult offspring rats. *Psychoneuroendocrinology* 60: 151–162.
- Guerrero MA, Rubio MC, Portillo W, Retana-Márquez S (2016) Tactile stimulation effects on hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory in prenatally stressed rats. *Brain Res Bull* 124: 1–11.
- Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N (1998) Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int J Dev Neurosci* 16: 209–216.
- Hensler JG (2006) Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 203–214.
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 1201–1213.
- Holson RR, Pearce B (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol Theratol* 14: 221–228.
- Huang Y, Xu H, Li H, Yang H, Chen Y, Shi X (2012) Pre-gestational stress reduces the ratio of 5-HIAA to 5-HT and the expression of 5-HT1A receptor and serotonin transporter in the brain of foetal rat. *BMC Neurosci* 13: 22–32.
- Huizink AC, Mulder EJH, Buitelaar JK (2004) Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychol Bull* 130: 115–142.
- Ishiwata H, Shiga T, Okado N (2005) Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction. *Neuroscience* 133: 893–901.
- Joëls M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER (2008) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* 31: 1–7.
- Kalueff, AV, Gallagher PS, Murphy DL (2006) Are serotonin transporter knockout mice ‘depressed’?: hypoactivity but no anhedonia. *NeuroReport* 17: 1347–1351.
- Koehl M, Darnaudéry M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, Maccari S (1999) Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol* 40: 302–315.

- Krishnan V, Nestler EJ (2011) Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci* 7: 121–147.
- Lee AR, Kim JH, Cho E, Kim M, Park M (2017) Dorsal and ventral hippocampus differentiate in functional pathways and differentially associate with neurological disease-related genes during postnatal development. *Front Mol Neurosci* 10: 331–345.
- Liu Z, Zhou J, Li Y, Hu F, Lu Y, Ma M, Feng Q, Zhang JE, Wang D, Zeng J, Bao J, Kim JY, Chen ZF, El Mestikawy S, Luo M (2014) Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron* 81: 1360–1374.
- Mamounas LA, Mullen CA, O'hearn E, Molliver ME (1991) Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: Morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives. *J Comp Neurol* 314: 558–586.
- Mitchell JB, Meaney MJ (1991) Effects of corticosterone on response consolidation and retrieval in the forced swim test. *Behav Neurosci* 105: 798–803.
- Miyagawa K, Tsuji M, Fujimori K, Saito Y, Takeda H (2011) Prenatal stress induces anxiety-like behavior together with the disruption of central serotonin neurons in mice. *Neurosci Res* 70: 111–117.
- Molendijk ML, de Kloet ER (2015) Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology* 62: 389–391.
- Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Koehl M, Casolini P, Van Reeth O, Maccari S (2003) Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test: Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Res* 989: 246–251.
- Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Mocaer E, Froger N, Lanfumey L, Laviola G, Casolini P, Zuena AR, Marzano L, Hamon M, Maccari S (2004) Chronic treatment with imipramine reverses immobility behaviour, hippocampal corticosteroid receptors and cortical 5-HT1A receptor mRNA in prenatally stressed rats. *Neuropharmacology* 47: 841–847.
- Mueller BR, Bale TL (2008) Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J Neurosci* 28: 9055–9065.
- Muscato R, Willner P (1992) Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: A methodological analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 16: 507–517.
- Pallarés ME, Antonelli MC (2017) Prenatal stress and neurodevelopmental plasticity: Relevance to psychopathology. *Adv Exp Med Biol* 1015: 117–129.
- Paxinos G, Watson CR, Emson PC (1980) AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 3: 129–149.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229: 327–336.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1978) "Behavioural despair" in rats and mice: Strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 51: 291–294.
- Porsolt RD, Bertin A, Blavet N, Deniel M, Jalfre M (1979) Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur J Pharmacol* 57: 201–210.
- Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Domínguez Salazar E, Martínez-García R, Velázquez-Moctezuma J (2003) Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 28: 207–227.
- Russo SJ, Murrrough J, Han M-H, Charney D S, Nestler EJ (2012) Neurobiology of resilience. *Nat Neurosci* 15: 1475.
- Schmidt MV, Sterlemann V, Müller MB (2008) Chronic stress and individual vulnerability. *Ann N Y Acad Sci* 1148: 174–183.
- Scharf SH, Schmidt MV (2012) Animal models of stress vulnerability and resilience in translational research. *Curr Psychiat Rep* 14: 159–165.
- Schmidt MV, Scharf SH, Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Holsboer F, Müller MB (2010) High susceptibility to chronic social stress is associated with a depression-like phenotype. *Psychoneuroendocrinology* 35: 635–643.
- Serpeloni F, Radtke KM, Hecker T, Sill J, Vukojevic V, de Assis SG, Schauer M, Elbert T, Nätt D (2019) Does prenatal stress shape postnatal resilience? – an epigenome-wide study on violence and mental health in humans. *Front Genet* 10: 269–285.
- St-Pierre J, Laurent L, King S, Vaillancourt C (2016) Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta* 48: S66–S71.
- Sheline YI, Liston C, McEwen BS (2019) Parsing the hippocampus in depression: chronic stress, hippocampal volume, and major depressive disorder. *Biol Psychiat* 85: 436–438.
- Ślusarczyk J, Trojan E, Glombik K, Budziszewska B, Kubera M, Lasoń W, Popiołek-Barczyk K, Mika J, Wędzony K, Basta-Kaim A (2015) Prenatal stress is a vulnerability factor for altered morphology and biological activity of microglia cells. *Front Cell Neurosci* 9: 82–96.
- Soares-Cunha C, Coimbra B, Borges S, Domingues AV, Silva D, Sousa N, Rodrigues AJ (2018) Mild prenatal stress causes emotional and brain structural modifications in rats of both sexes. *Front Behav Neurosci* 12: 1–15.
- Strekalova T, Couch Y, Kholod N, Boyks M, Malin D, Leprince P, Steinbusch HM (2011) Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters. *Behav Brain Funct* 7: 9–27.
- Sunal R, Gümüşel B, Kayaalp SO (1994) Effect of changes in swimming area on results of "behavioral despair test". *Pharmacol Biochem Behav* 49: 891–896.
- Tamashiro KL, Terrillon CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH (2009) Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 58: 1116–1125.
- Tang M, Lei X, Sun J, Liu G, Zhao S (2013) Stress-induced anhedonia correlates with lower hippocampal serotonin transporter protein expression. *Brain Res* 1513: 127–134.
- Van den Hove DLA, Lauder JM, Scheepens A, Prickaerts J, Blanco CE, Steinbusch HWM (2006) Prenatal stress in the rat alters 5-HT1A receptor binding in the ventral hippocampus. *Brain Res* 1090: 29–34.
- Van den Hove DLA, Leibold NK, Strackx E, Martínez-Claros M, Lesch KP, Steinbusch HWM, Schruers KRJ, Prickaerts J (2014) Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional behavior and the serotonergic system. *Eur Neuro-psychopharmacol* 24: 595–607.
- Vertes RP (1991) A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313: 643–668.
- Viltart O, Vanbesien-Mailliot CCA (2007) Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. *Sci World J* 7: 1493–1537.
- Vollmayr B, Bachteler D, Vengeliene V, Gass P, Spanagel R, Henn F (2004) Rats with congenital learned helplessness respond less to sucrose but show no deficits in activity or learning. *Behav Brain Res* 150: 217–221.
- Ward GR, Wainwright PE (1988) Reductions in maternal food and water intake account for prenatal stress effects on neurobehavioral development in B6D2F2 mice. *Physiol Behav* 44: 781–786.
- Williams DR, Carlsson R, Bürkner P-C (2017) Between-litter variation in developmental studies of hormones and behavior: Inflated false positives and diminished power. *Front Neuroendocrinol* 47: 154–166.
- Wise RA (2008) Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox Res* 14: 169–183.
- Woodward CJH, Emery PW (1987) Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 419: 280–284.
- Yan QS (2000) Activation of 5-HT2A/2C receptors within the nucleus accumbens increases local dopaminergic transmission. *Brain Res Bull* 51: 75–81.
- Zhang H, Shang Y, Xiao X, Yu M, Zhang T (2017) Prenatal stress-induced impairments of cognitive flexibility and bidirectional synaptic plasticity are possibly associated with autophagy in adolescent male-offspring. *Exp Neurol* 298: 68–78.
- Zohar I, Weinstock M (2011) Differential effect of prenatal stress on the expression of corticotrophin-releasing hormone and its receptors in the hypothalamus and amygdala in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 23: 320–328.

# 15 Acta de disertación pública



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00129

Matrícula: 2143800900

Contenido y liberación de serotonina en el hipocampo ventral de ratas estresadas prenatalmente y su relación con conductas tipo depresivas. Participación de los glucocorticoides.

Con base en la legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 10 del mes de septiembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ  
DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ  
DRA. SONIA GALVAN ARZATE  
DRA. MARIA DEL CARMEN RUBIO OSORNIO



FELIPE DE JESUS JIMENEZ VASQUEZ

ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: FELIPE DE JESUS JIMENEZ VASQUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA BARBANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

VOCAL

DRA. SONIA GALVAN ARZATE

SECRETARIA

DRA. MARIA DEL CARMEN RUBIO OSORNIO

