



UNIDAD IZTAPALAPA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DEL ESTRÉS PRENATAL COMO
INDUCTOR DE LA CONDUCTA DEPRESIVA ASOCIADA
CON LA LIBERACIÓN DE SEROTONINA EN EL
HIPOCAMPO VENTRAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL PRESENTA

BIÓLOGO FELIPE DE JESÚS JIMÉNEZ VÁSQUEZ

CO-DIRECTORAS

DRA. MARÍA DEL SOCORRO IMELDA RETANA MÁRQUEZ

DRA. LUISA LILIA ROCHA ARRIETA

ASESORA

ASESORA: DRA. MARÍA DEL CARMEN RUBIO OSORNIO

CIUDAD DE MÉXICO

25 DE NOVIEMBRE DE 2016

COMITÉ TUTORAL



CO-DIRECTORA

DRA. MARÍA DEL SOCORRO IMELDA RETANA MÁRQUEZ

Profesor titular C, 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.



CO-DIRECTORA

DRA. LUISA LILIA ROCHA ARRIETA

Investigadora Titular, Departamento de Farmacobiología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico (sede sur), lrocha@cinvestav.mx.



ASESORA

DRA. MARÍA DEL CARMEN RUBIO OSORNIO

Investigadora en Ciencias Médicas "D", Departamento de Neurofisiología. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, "Manuel Velasco Suárez", macaru@hotmail.com.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

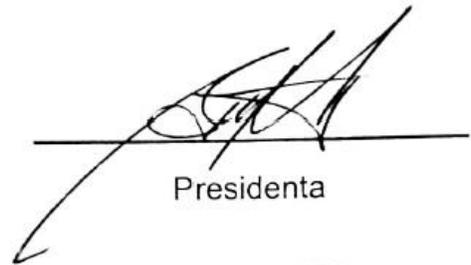
Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca número: 634448.

Miembros del 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 aprobó la Tesis titulada: "EVALUACIÓN DEL ESTRÉS PRENATAL COMO INDUCTOR DE LA CONDUCTA DEPRESIVA ASOCIADA CON LA LIBERACIÓN DE SEROTONINA EN EL HIPOCAMPO VENTRAL", que presentó el Biólogo Felipe de Jesús Jiménez Vásquez, el día 25 de Noviembre del año 2016.

Dra. Beatriz Gómez González

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

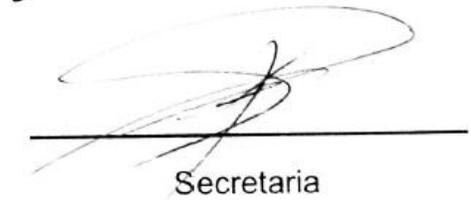


Presidenta

Dra. María del Carmen Rubio Osornio

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

"Manuel Velasco Suárez"



Secretaria

Dr. Moisés Rubio Osornio

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

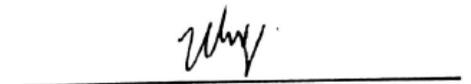
"Manuel Velasco Suárez"



Vocal

Dra. Wendy Portillo Martínez

Universidad Nacional Autónoma de México



Vocal

Agradecimientos

A la Dra. María del Socorro I. Retana Márquez por darme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio, por su apoyo en todo momento durante el proyecto y por sus invaluable consejos.

A la Dra. María del Carmen Rubio Osornio por su ayuda incondicional en todos los aspectos.

Al Dr. Moisés Rubio Osornio por brindarme su apoyo para la terminación de este proyecto.

A la Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta por su apoyo brindado durante el proyecto.

A la Mtra. Esperanza García por aceptarme en su laboratorio y por su ayuda invaluable para la terminación de este proyecto.

A la Mtra. Verónica custodio por aceptarnos como sus alumnos en el INNN.

A mis amigos Mayra, Fabi y Jhovan con los que compartimos momentos inolvidables, gracias por hacer más agradable este ciclo de la vida.

A mis compañeros de laboratorio Ángeles, Eunice, Flor, Fahiel, Sergio, Mónica, Azhalea, Lizbeth, Alejandra, Lupita y Gilberto por todos los momentos que compartimos.

A Diana por todos los momentos compartidos, sin su sentido del humor, sin su calidez humana, sin su apoyo incondicional todo hubiera sido más difícil, no tengo palabras para describir todo lo que siento por ti, te amo.

Dedicatorias

A mis padres por todo el apoyo durante toda la vida, por siempre estar ahí, gracias a ellos he logrado terminar esta etapa de mi vida.

A mis abuelos por su ayuda y su paciencia.

A toda mi familia por su compañía y por compartir todos los triunfos y fracasos.

Resumen

El trastorno de la depresión mayor es una enfermedad psiquiátrica que se caracteriza por la combinación de síntomas a nivel psicológico, fisiológico y conductual, es una enfermedad común que afecta a millones de personas en todo el mundo. Los modelos animales de depresión por estrés prenatal son herramientas esenciales para el entendimiento de la patofisiología de la depresión; por ello, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar si el estrés prenatal provoca conductas tipo depresivas y modifica el contenido y la liberación de serotonina en el hipocampo ventral de ratas adultas. En el presente estudio, se utilizaron ratas hembras gestantes de la cepa Wistar de 250 g, las cuales se asignaron al grupo control o a estrés por inmersión en agua fría del día 15 al día 21 de la gestación. A la edad de dos meses y medio, se identificó la conducta tipo depresiva mediante la prueba de Porsolt y la ingesta de sacarosa en la descendencia masculina. Se seleccionaron a los animales que presentaron conducta tipo depresiva. Antes de realizar la prueba conductal de Porsolt y al finalizar la prueba las ratas se sacrificaron, se diseccionó el hipocampo ventral para evaluar el contenido de serotonina y su metabolito por HPLC-ED (Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección Electroquímica). En otros animales del grupo control y de estrés prenatal se realizaron cirugías estereotáxicas para la implantación de cánulas guías orientadas hacia el hipocampo ventral. Se tomaron microdializados para evaluar la liberación de serotonina basal por HPLC-ED. Los resultados muestran que el estrés prenatal genera aumento de la inmovilidad en la prueba de Porsolt, así como disminución en el consumo de sacarosa (considerado como anhedonia) en las crías en la etapa adulta. Asimismo, el contenido tisular de

serotonina en el hipocampo ventral en las ratas estresadas prenatalmente fue mayor que en las controles, antes de la prueba de Porsolt. El contenido tisular de serotonina no se modificó después de la prueba de Porsolt en las ratas estresadas prenatalmente, pero su metabolito 5-HIAA disminuyó, lo que indica que la serotonina no se liberó.

La liberación de serotonina fue mayor en la descendencia estresada prenatalmente. Estos resultados indican que el estrés aplicado durante la gestación es capaz de producir conductas tipo depresivas en las crías en la etapa adulta y esto puede estar relacionado con alteraciones en el contenido de serotonina en el hipocampo ventral.

Abstract

Major depressive disorder or major depression is a common disorder that affects people worldwide and combines symptoms at psychological, physiological, and behavioural level. This disorder is predicted to be the second cause of disability in 2020. Animal models of major depression caused by stress are relevant for the better understanding the aetiology of depression. Thus, the aim of this work was to evaluate whether prenatal stress induces depressive-like behavior and if this behaviour is related to changes in serotonin content and release in ventral hippocampus of prenatally stressed adult rats. Pregnant female Wistar rats weighing 250 grams were randomly assigned to the control group or stress by immersion in cold water from day 15 to day 21 of pregnancy. At 21 days of age, pups were sexed and males were separated. Depressive-like behaviour was assessed by forced-swim tasks and sucrose intake test in male offspring at 8–12 weeks of age. Rats displaying depressive-like behaviour were selected, and some were sacrificed before and others were sacrificed after forced-swim task. Ventral hippocampus was dissected to evaluate serotonin and its metabolite content. In other animals cannulas were stereotactically implanted into the right ventral hippocampus. The dialysates were collected and basal serotonin release was evaluated HPLC-ED. The results indicate that prenatal stress caused depressive-like behaviour, with increased immobility in Porsolt test, as well as decreased sucrose intake (considered as anhedonia) in adult male offspring. Serotonin content was higher in ventral hippocampus of prenatally stressed rats compared with control males. Serotonin content did not change in prenatally stressed offspring after Porsolt test, but its metabolite decreased, indicating no release of

serotonin. Serotonin release was higher in prenatally stressed animals. These findings suggest that prenatal stress is able to induce depressive-like behaviour in adult male offspring and this could be related to disruption in serotonin release in the ventral hippocampus.

Abreviaciones

ACTH: Hormona adrenocorticotrópica

CA1: Cuerno de amón 1

CA2: Cuerno de amón 2

CA3: Cuerno de amón 3

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

DA: Dopamina

DOPAC: Ácido 3,4 dihidroxifenil acético

DSM-5: Manual estadístico de diagnosis de trastornos mentales 5

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GR: Receptores para glucocorticoides

HHA: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HVA: Ácido homovanílico

SSRI: Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina

SNRI: Inhibidores selectivos de la recaptura de norepinefrina

MR: Receptores para mineralocorticoides

PVN: Núcleo paraventricular

5-HT: Serotonina

5-HAA: Ácido 5-hidroxiindolacético

11 β -HSD2: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 DEPRESIÓN.....	1
1.2 HIPÓTESIS DE LA DEPRESIÓN	2
2. MODELOS ANIMALES.....	4
2.1 VALIDEZ DE CONSTRUCCIÓN	5
2.2 VALIDEZ DE APARIENCIA	6
2.3 VALIDEZ PREDICTIVA	6
3. ESTRÉS.....	8
4. HIPOCAMPO Y NIVELES DE SEROTONINA DURANTE EL ESTRÉS.....	12
5. ANTECEDENTES	14
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
7. JUSTIFICACIÓN	17
8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	17
9. HIPÓTESIS	18
10. OBJETIVO GENERAL.....	18
11. OBJETIVOS PARTICULARES	18
12. MATERIAL Y MÉTODO.....	18
12.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	19
12.2 PRUEBA CONDUCTUAL DE PORSOLT	21
12.3 INGESTA DE SACAROSA	21
12.4 MICRODIÁLISIS	22
12.5 CUANTIFICACIÓN DE MONOAMINAS.....	25
12.6 PREPARACIÓN DE REACTIVOS	25
12.6.1 Fase móvil	25
12.6.2 Solución de Ringer modificada (SRM), 100 mL	26
12.6.3 Solución antioxidante (AOx), 10 mL.....	26
12.6. 4 Solución de alto potasio	27
12.6.5 Hidróxido de sodio (NaOH) .01 N	27
12.6. 6 Estándares	27
12.6.7 Elaboración de la curva estándar.....	28
12.7 MUESTRAS.....	29
12.8 SISTEMA CROMATOGRÁFICO	30
12.8 .1 Columna y flujo.....	30

12.8. 2 <i>Determinación y cuantificación de catecolaminas</i>	30
12.8.3 <i>Columna y flujo para contenido de serotonina</i>	30
12.9 <i>EXTRACCIÓN DE HIPOCAMPO Y HPLC</i>	31
12.10 <i>CURVAS ESTÁNDAR PARA CUANTIFICAR LA 5-HT Y 5-HIAA</i>	31
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
14. RESULTADOS	33
14.1 <i>EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA DEPRESIVA (PRUEBA DE PORSOLT)</i>	33
14.2 <i>PRUEBA DE INGESTA DE SACAROSA</i>	34
14.3 <i>LIBERACIÓN DE SEROTONINA</i>	36
14.4 <i>CONTENIDO DE 5-HT EN EL HIPOCAMPO VENTRAL</i>	39
14.5 <i>CONTENIDO DE 5-HIAA EN EL HIPOCAMPO VENTRAL</i>	40
15. DISCUSIÓN	42
16. CONCLUSIONES	52
17. BIBLIOGRAFÍA	53

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Depresión

El concepto de la depresión ha sido profundamente estudiado en la historia de la ciencia médica y su génesis se remonta a los antiguos griegos con la teoría de la melancolía de Hipócrates. El estudio de la depresión siguió en la época medieval con el uso de la medicina Galénica. El concepto moderno de la depresión apareció con el surgimiento de la psiquiatría durante el siglo XIX (1). La Asociación Americana de Psiquiatría ha publicado el manual estadístico de diagnóstico de trastornos mentales (DSM-5), que ha sido ampliamente reconocido como un sistema de clasificación y define a la depresión con propósitos de investigación básica y clínica (2).

De acuerdo con el DSM-5 para diagnosticar a una persona con depresión debe tener cinco o más de los siguientes síntomas durante un periodo de dos semanas; al menos el estado anímico depresivo y la pérdida de interés en realizar una actividad, deben estar presentes.

1. Estado anímico deprimido durante casi todo el día o casi todos los días, indicado por un informe subjetivo personal (sentimientos de tristeza, vacío o inutilidad) u observaciones hechas por otras personas (aparición llorosa).
2. Pérdida de interés o placer en llevar a cabo casi todas las actividades durante el día. Esto se conoce como anhedonia.

3. Pérdida significativa de peso cuando no hay dieta o ganancia de peso (cambio de más de un 5% en el peso corporal por mes).
4. Insomnio o hipersomnia casi todo el día.
5. Agitación psicomotora o enlentecimiento casi todo el día (observable por otros).
6. Fatiga o pérdida de energía durante el día.
7. Sentimientos de inutilidad, inapropiada o excesiva culpabilidad durante casi todo el día.
8. Disminución en la capacidad para pensar, concentrarse o indecisión (observable por otros).
9. Pensamientos recurrentes de suicidio, generación de ideas suicidas con un plan específico o intento suicida.

El trastorno de la depresión mayor abarca múltiples desórdenes con síntomas superpuestos de diversas etiologías (3). En la actualidad se especula que los síntomas de la depresión son el resultado de una combinación de factores del medio ambiente que alteran de manera recíproca las interacciones múltiples de los circuitos neuronales. Los genes tienen un papel muy importante en el riesgo de desarrollar depresión (4).

1.2 Hipótesis de la depresión

Existen diversas hipótesis para explicar la depresión. La hipótesis monoaminérgica propone que los síntomas de la depresión surgen de los niveles insuficientes de los

neurotransmisores como la serotonina (5-HT), la norepinefrina (NE) y la dopamina (DA). Esta hipótesis fue aceptada por las observaciones derivadas de las terapias antidepresivas que aumentaron la neurotransmisión de 5-HT, NE y DA (5). La deficiencia del ácido γ -aminobutírico (GABA) puede contribuir a los trastornos depresivos, los pacientes depresivos tienen niveles reducidos de GABA en el plasma sanguíneo, en el líquido cerebroespinal y en tejido cortical (6). En particular una primera línea de evidencia clínica sugiere una transmisión GABAérgica reducida en pacientes depresivos que está basada en tomografía de emisión de positrones (7).

De todas las hipótesis formuladas hasta la actualidad, la hipótesis serotoninérgica de la depresión es la que tiene más influencia, además de ser la más estudiada para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para la depresión mayor. Esta hipótesis postula que la reducción en los niveles de 5-HT incrementa el riesgo de ser afectado por la depresión (8). Desde su formulación, una gran cantidad de estudios han validado la conexión entre el sistema serotoninérgico y la depresión. Se ha demostrado que los pacientes depresivos muestran un bajo nivel de 5-HT en la circulación sanguínea, así como también bajos niveles de triptófano que es el precursor para la síntesis de 5-HT. En pacientes depresivos la administración de triptófano provee efectos benéficos, pero una reducción de triptófano en la dieta induce síntomas depresivos recurrentes (9). La mayoría de las investigaciones se han enfocado en el sistema serotoninérgico debido a la eficacia de los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (SSRI) para tratar la depresión, su función principal es incrementar los niveles de 5-HT en la sinapsis neuronal por el bloqueo

del transportador de 5-HT, permitiendo una mejor neurotransmisión y de esta manera mejorar el estado de ánimo (10).

Si bien algunos síntomas clínicos de la depresión no pueden ser evaluados en animales, existen sin embargo, parámetros conductuales que pueden modelar algunos síntomas de la depresión, por ejemplo la supresión de actividad social o la anhedonia. La pérdida de actividad locomotora o inmovilidad es observada en el desarrollo de la desesperanza aprendida que puede ser inducida por el ineludible estrés en la prueba de nado forzado (11). La inducción de la conducta depresiva por el estrés prenatal es asociada con alteraciones en el eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA) (12).

2. MODELOS ANIMALES

En la actualidad es necesario desarrollar nuevos tratamientos antidepresivos que sean efectivos, en este proceso los modelos animales de depresión son herramientas esenciales para el entendimiento de la patofisiología de la depresión, pero muchos de los resultados obtenidos en animales no pueden ser trasladados al humano, sólo algunos pocos permiten progresos en la investigación clínica (13). Idealmente un modelo animal de depresión debería cumplir al menos 3 principales criterios: validez de construcción, validez de apariencia y validez predictiva (14).

2.1 Validez de construcción

Indica que un modelo está basado en mecanismos neurobiológicos similares encontrados en pacientes depresivos que son importantes en la etiología y en su patogénesis (13). La depresión es un trastorno complejo con factores genéticos que determinan la respuesta a las variables ambientales, entre las variables ambientales, los episodios de estrés destacan como un potente factor de riesgo en la depresión (15). Se ha señalado que los efectos generales de estrés son dependientes de la apreciación individual, además que los estímulos ambientales pueden ser incontrolables, de esta manera contribuyen a las emociones negativas. La desesperanza aprendida es derivada de la teoría cognitiva conductual de la depresión, la cual ha permitido que la terapia conductual cognitiva de la depresión sea exitosa y hasta la actualidad la más influyente de la psicoterapia. La teoría cognitiva de la depresión postula que “se refiere a una visión negativa de sí mismo, del entorno y del futuro”(16) (página 1). La persona que sufre de depresión, se ve a sí misma como una persona despreciable o desvalorizada es la idea central en la etiología y el mantenimiento de la depresión mayor (16). Se asume que la desesperanza aprendida es activada por experiencias de estrés incontrolables (16). La desesperanza aprendida se ha observado en humanos y también en ratas (17, 18). La desesperanza aprendida como modelo animal esta únicamente basada en una teoría general que se traslada de la psicología clínica a otras especies como los roedores con excelente validez de construcción (13).

2.2 Validez de apariencia

Describe la similitud de un modelo animal a los síntomas de la depresión en humanos. Muchos de los síntomas de la depresión como los sentimientos de culpa o pensamientos suicidas dependen de la conciencia y de la expresión verbal que no puede ser estudiada en roedores. Otros síntomas como los cambios psicómotores pueden ser fácilmente trasladados de especie a especie, pero con poca especificidad para la diagnosis de la depresión, sin embargo en la desesperanza aprendida disminuye la sensibilidad y la capacidad de respuesta a las propiedades de recompensa de la ingesta de sacarosa, también disminuye la auto-estimulación intracraneal; estos son indicadores de la anhedonia en analogía con la pérdida de interés o placer en actividades cotidianas durante la depresión (19, 20). Además la desesperanza aprendida refleja las alteraciones vegetativas y neuroendocrinas como los cambios asociados a la estructura del sueño en la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) e incrementa los niveles basales de corticosterona (21).

2.3 Validez predictiva

La validez predictiva es alta si un modelo responde de manera efectiva al tratamiento con antidepresivos (22). Se ha mostrado que una amplia variedad de antidepresivos, incluyendo a los antidepresivos tricíclicos, SSRI y los inhibidores de la enzima monoamino oxidasa mejoran la conducta de desesperanza después su administración crónica pero no después de la administración aguda, lo anterior está estrechamente relacionado con el retraso de la acción antidepresiva en los ensayos

clínicos. Por otra parte, otros fármacos como los antipsicóticos y ansiolíticos, no promueven la recuperación de la desesperanza aprendida, lo que indica la excelente especificidad del modelo. El perfil del tratamiento antidepresivo se ha reproducido con notable similitud en modelos animales de desesperanza aprendida (13). La exposición a estresores tiene un fuerte impacto sobre la manifestación de la depresión, la mayoría de los modelos animales de depresión están basados en la exposición a varios estresores que pueden ser agudos o crónicos, estos paradigmas conductuales son capaces de generar conductas tipo depresivas (23).

El hipocampo contiene una gran cantidad de receptores para los glucocorticoides en comparación con otras estructuras cerebrales (24), también es parte de la vía límbica del estrés, la cual incluye a la corteza prefrontal, el septum, la amígdala y el núcleo paraventricular del hipotálamo. La innervación serotoninérgica en el hipocampo está heterogéneamente distribuida (25). El estrés prenatal modifica al sistema serotoninérgico a diferentes niveles, por ejemplo, el metabolismo de 5-HT en el hipocampo se ve afectado por cambios en la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa, cambios en la cantidad del transportador de 5-HT o bien cambios en los receptores serotoninérgicos, tales como los 5HT_{1A} (26), estos cambios en el sistema serotoninérgico incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades psiquiátricas como la depresión en la etapa adulta (26).

3. ESTRÉS

La homeostasis es la capacidad de un organismo para mantener el equilibrio de la temperatura, el balance de fluidos, la concentración de iones hidrógeno (pH) en sangre, los niveles de oxígeno, entre otros, que le permiten sobrevivir (27). Todos los organismos mantienen un complejo equilibrio dinámico, el cual es alterado constantemente por diversos factores externos o internos denominados estresores. Pueden ser físicos como cambios de temperatura, en el medio ambiente, anoxia, hipoglucemia, ejercicio o las heridas. También pueden ser psicológicos que afectan a las emociones y causan miedo, ansiedad o frustración, los cuales son los activadores más potentes de eje HHA. Pueden ser también mixtos y actuar en combinación (28). Cuando los estímulos ambientales exceden la capacidad natural de regulación del organismo, en situaciones que son impredecibles e incontrolables se le denomina estrés (29). La respuesta de estrés está dirigida por el sistema del estrés, el cual está constituido por estructuras del sistema nervioso central y por órganos periféricos. Los dos componentes principales del sistema del estrés son el eje locus coeruleus-sistema nervioso simpático-médula adrenal y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) (figura 1). El sistema del estrés recibe e integra diversas señales cognitivas, emocionales, neurosensoriales y periféricas que llegan a través de las proyecciones límbicas a los sistemas efectores (30). El eje HHA regula la secreción de glucocorticoides por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) que es esencial para los mamíferos para responder a diversos estresores (31). El eje HHA consiste en señales estimuladoras y de retroalimentación negativa para regular su actividad. El

eje neuroendocrino está compuesto por neuronas del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, la hipófisis y la glándula suprarrenal. El estrés por inmersión en agua, inmovilización, hacinamiento y choques eléctricos en las patas de las ratas promueve la síntesis y secreción de hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de arginina vasopresina (AVP) por un grupo de neuronas localizadas en PVN (32). La CRH a través del sistema portahipofisiario se desplaza hacia el lóbulo anterior en donde se une con sus receptores que están acoplados a las proteínas G, permitiendo la síntesis y liberación de ACTH en el sistema circulatorio. Los receptores de la ACTH están acoplados a proteínas G en células adrenocorticales de la *zona fasciculata* en la corteza suprarrenal, una vez que la ACTH interactúa con los receptores, se inicia una cascada de señalización que inicia la síntesis de proteínas y la expresión de genes implicados en la vía de biosíntesis de glucocorticoides(33). Los glucocorticoides (cortisol en humanos y otros mamíferos, corticosterona en roedores) son la respuesta de la estimulación del eje HHA; son hormonas esteroideas con efectos pleiotrópicos en la mayoría de los tejidos y órganos. Los glucocorticoides regulan la actividad basal del eje HHA, activan el complejo amígdala/hipocampo por neuronas adrenérgicas durante la exposición a estresores, las cuales se originan en el tallo cerebral (24). La respuesta al estrés termina por retroalimentación negativa en el hipotálamo y en la glándula hipófisis; de este modo hay una regulación de la respuesta del eje adrenal (34).

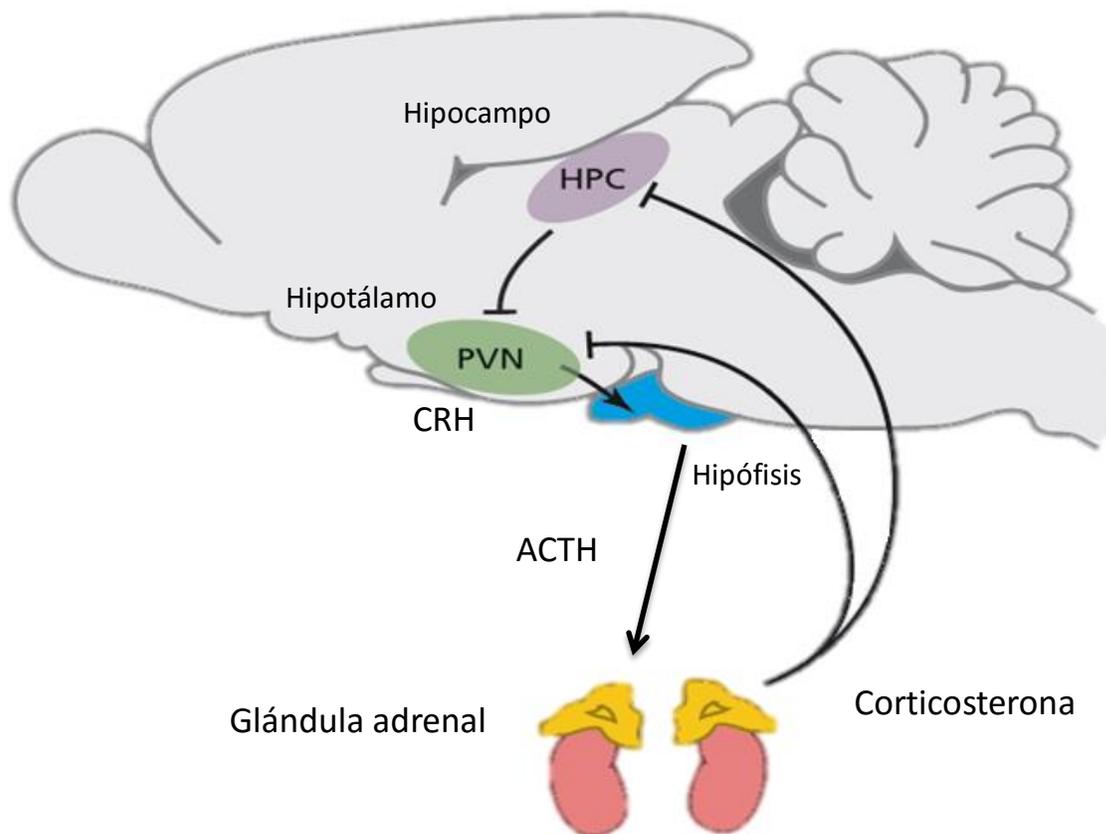


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en los mamíferos. Esquema del cerebro de la rata en donde se muestra la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, la exposición a estresores de manera crónica activa a algunas neuronas de núcleo paraventricular que promueve la liberación de CRH hacia la adenohipófisis, en donde promueve la secreción y liberación de la ACTH que se desplaza hacia el torrente sanguíneo, cuando interactúa con sus receptores en la glándula adrenal promueve la liberación de corticosterona.

El efecto del estrés en los mamíferos depende de la intensidad del estresor, la severidad y la duración (estrés agudo o crónico), además del sexo de los roedores, (si es prenatal, en edades tempranas del desarrollo, en la edad adulta o en la vejez), así como la respuesta individual al estresor (35). Se ha mostrado que la exposición a

estrés incrementa los niveles de glucocorticoides durante la gestación, y estos pueden atravesar la barrera placentaria de la madre y la barrera hematoencefálica del feto, modificando la función de estructuras cerebrales como la corteza cerebral e hipocampo (figura 2) (36).

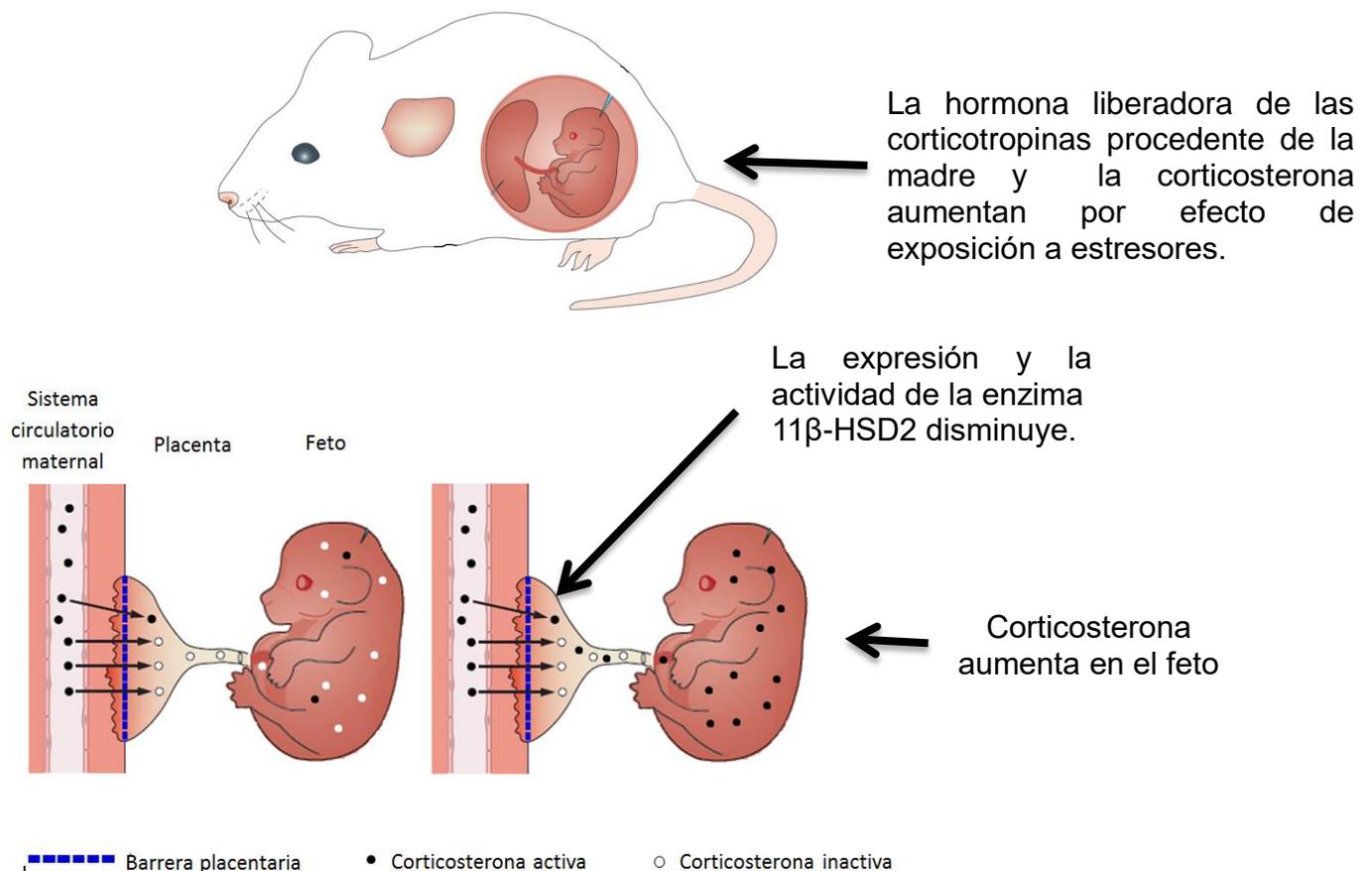


Figura 2. Efecto de la exposición crónica a niveles elevados de glucocorticoides. La aplicación de un estresor de manera crónica aumenta la concentración de CRH materno. Debido a la naturaleza lipofílica de la corticosterona puede atravesar la barrera placentaria. En la placenta se encuentra la enzima 11β -HSD2 que inactiva a la corticosterona. El aumento de esta hormona disminuye la actividad y expresión de la enzima 11β -HSD2 y la corticosterona puede atravesarla, permitiendo el paso de corticosterona activa al feto y de esta manera aumenta la concentración de esta hormona. (Modificado de Chapman, et al., 2012 y Bale, 2015).

4. HIPOCAMPO Y NIVELES DE SEROTONINA DURANTE EL ESTRÉS

El hipocampo es parte de la vía límbica del estrés, el cual incluye a la corteza prefrontal, el septum, la amígdala y el núcleo paraventricular del hipotálamo. La inervación serotoninérgica en el hipocampo esta heterogéneamente distribuida, las zonas que tienen una mayor concentración de inervaciones serotoninérgicas son la capa molecular del subiculum y la capa molecular-lacunosum del cuerno de Amón 1 (CA1) y la capa del oriens a través del cuerno de Amón 3 (CA3) (25). En la fase inicial de la respuesta al estrés, el flujo de glutamato en la corteza prefrontal y en las regiones del cerebro anterior provocan el incremento de neurotransmisores monoaminérgicos en otras regiones clave del cerebro como el estriado ventral, amígdala, y la misma corteza prefrontal, estas estructuras están asociadas a la repuesta de miedo y de toma de decisiones (37). En la segunda fase, el hipocampo modula el eje HHA por la proyección dentro de las regiones celulares neuroendocrinas del PVN, el área central responsable de la regulación del estrés. Los niveles elevados de glucocorticoides durante la respuesta al estrés pueden causar daño hipocampal (38). Esta hipótesis es llamada “hipótesis de la cascada de glucocorticoides” y es apoyada por diversas investigaciones que muestran que el estrés excesivo o la exposición a glucocorticoides pueden dañar el hipocampo (39). El hipocampo es el principal blanco de los glucocorticoides, ya que contiene una gran cantidad de receptores a glucocorticoides en comparación con otras estructuras cerebrales, se ha demostrado que concentraciones altas están relacionadas con el

envejecimiento y pérdida de neuronas en el hipocampo, esta pérdida ocurre preferencialmente en CA1 y neuronas del giro dentado (figura 3) (24). Diversos estudios han mostrado que el estrés prenatal tiene efecto en los niveles de 5-HT en el hipocampo (40). El estrés prenatal disminuye los niveles de 5-HT y la densidad sináptica en el hipocampo (40).

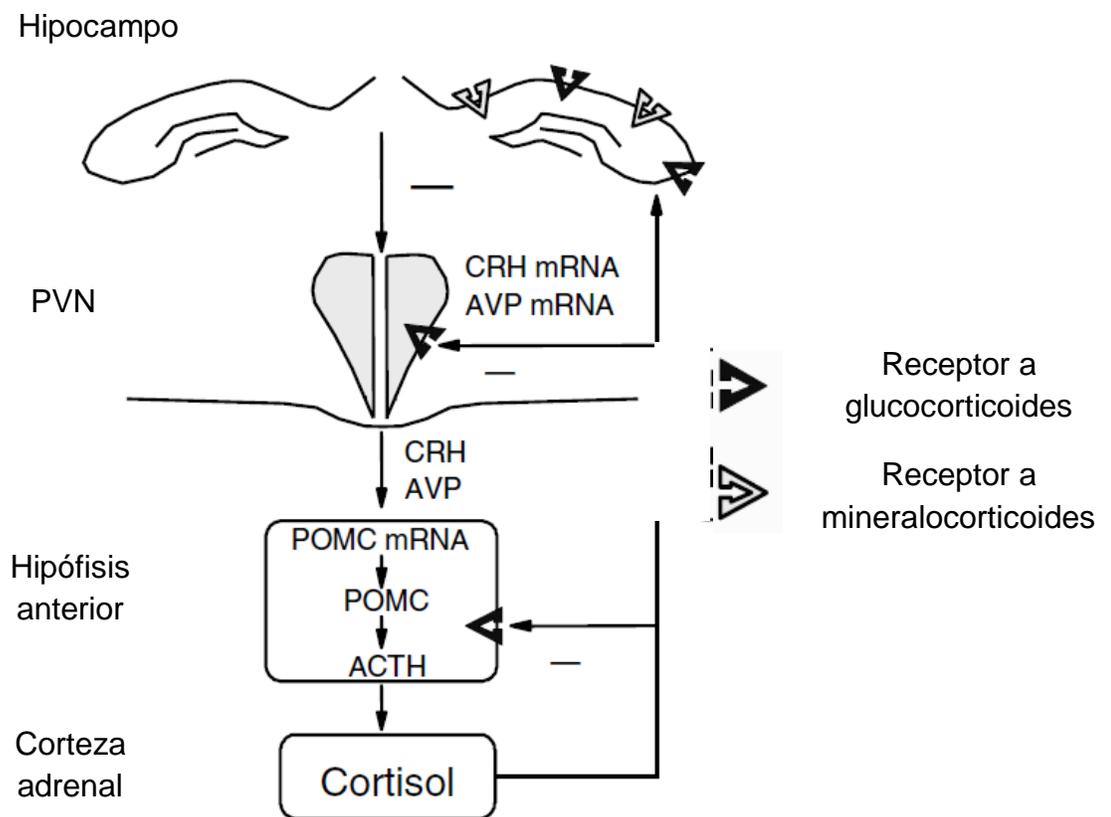


Figura 3. Eje HHA, receptores a glucocorticoides y mineralocorticoides en el hipocampo. Los receptores tipo I o MR tienen mayor afinidad por la corticosterona. Los receptores tipo II o GR tienen baja afinidad de unión por la corticosterona. Estos receptores se complementan uno a otro, modulan al HHA. Cuando las concentraciones de corticosterona son altas los MR se saturan y se activan los GR para reestablecer la homeostasis, ayuda a que la corticosterona regrese a sus niveles basales mediante la inhibición del eje HHA. Inhibe a nivel de hipocampo, PVN e hipófisis(30).

5. ANTECEDENTES

La investigación tanto en roedores como en humanos ha acumulado evidencia de que el estrés durante la gestación puede tener efectos en el desarrollo a largo plazo en la descendencia. Este proceso es referido como programación fetal, porque sus efectos son profundos a largo plazo y es transmitido a la descendencia estresada prenatalmente (41). Investigaciones en humanos han evidenciado que los efectos de la exposición a condiciones adversas ambientales, problemas psicosociales, exposición a diversas enfermedades durante el embarazo y desastres naturales causan alteraciones en el metabolismo, trastornos relacionados con el sistema inmunológico y un alto riesgo en desarrollar desordenes afectivos (42). Los modelos animales han arrojado amplia evidencia de que el estrés en hembras preñadas tiene efectos a largo plazo en la descendencia, por ejemplo deterioro cognitivo, disminución en la capacidad de aprendizaje, cambios en el sistema inmunológico, en el metabolismo y así como alteraciones conductuales, incluyendo la ansiedad y la depresión(43). Una herramienta disponible para el estudio de la depresión es el uso de modelos animales para entender los mecanismos moleculares, genéticos y epigenéticos que participan y que pueden provocar esta enfermedad (44). En las ratas, la conducta de ansiedad y depresión ha sido asociada con alteraciones en el eje HHA provocado por el estrés prenatal, el cual incrementa el tiempo de inmovilidad y deambulación en ratones hembra y se incrementa el riesgo de desarrollar conductas depresivas (45). La inducción de la conducta depresiva por el estrés prenatal se ha asociado con la hiperactividad del eje HHA cuando se estresó a

la madre gestante durante la última semana de gestación (12). Cuando la madre está expuesta a estresores durante el embarazo no sólo se incrementa la concentración circulante de cortisol, también se reduce la expresión y la actividad de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo dos (11 β -HSD2) en la placenta, dejando al feto menos protegido de los efectos del glucocorticoide, causando alteraciones en el desarrollo de las neuronas en el cerebro y la disminución en el tamaño del hipocampo (46, 47). El estrés prenatal aplicado a las ratas aumenta los niveles de triptófano en los fetos en el día 19 y 20 de gestación, también aumenta los niveles de 5-HT y 5-HAA en los días 20 y 21 de gestación. El aumento de en la concentración de 5-HT es elevado cuando nacen las crías, en los días 2, 5 y 10 (48). En roedores el estrés prenatal causa disminución del volumen del hipocampo y reducción en el número de células granulares dentro del giro dentado en el día 28 de vida posnatal; a las 22 semanas, la disminución en la producción de células granulares, fue de un 55% (49). El hipocampo es una región que recibe inervaciones por neuronas serotoninérgicas (50). La 5-HT tiene un papel importante en el desarrollo del cerebro durante el periodo prenatal. Durante el desarrollo temprano la 5-HT actúa como factor estimulante en la diferenciación celular, la migración y la mielinización neuronal. La exposición a estrés prenatal en ratones macho mostró que los transportadores de 5-HT disminuyen en el hipocampo, en el cuerno de Amón 1 y 2 (CA1 y CA2); en la región CA3 del hipocampo disminuye la expresión de los receptores a glucocorticoides. El hipocampo en roedores se divide en hipocampo ventral y dorsal, la región ventral del hipocampo ha sido asociada con procesos relacionados con la depresión (51), el estrés prenatal causa disminución de la

interacción de la 5-HT con el receptor 5HT1A (52). Las ratas macho estresados prenatalmente y posnatalmente muestran disminución en la movilidad en la prueba de Porsolt, baja ingesta de sacarosa y disminución de la enzima triptófano hidroxilasa en el giro dentado, en CA3 y en el giro dentado del hipocampo en machos y hembras (53). El estrés prenatal en ratones causa aumento en el transportador de 5-HT en hipocampo correlacionado con la expresión del gen FOS1 en la misma área cerebral, demostrando la participación de la 5-HT en los efectos del estrés prenatal (54). Las crías de ratas estresadas prenatalmente mostraron bajo peso corporal y disminución de la ingesta de sacarosa; los fetos tuvieron disminución de peso corporal. En las crías los niveles de corticosterona y de la hormona liberadora de corticotropinas se incrementaron (machos y hembras); los niveles de 5-HT, su metabolito el ácido 5-hidroixindolacético y el transportador de 5-HT disminuyeron en el hipocampo (55). Sin embargo hasta la fecha no se ha cuantificado el contenido ni la liberación de 5-HT en el hipocampo ventral *in vivo* en modelos animales de depresión.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los trastornos depresivos son un importante tema de salud pública, estos desórdenes son frecuentes, incapacitan a los pacientes y generalmente son enfermedades crónicas, las cuales causan una carga económica para la sociedad (56). Los desórdenes depresivos también influyen significativamente en la comorbilidad de diversas enfermedades como las cardíacas, diabetes y cáncer (57). El desarrollo de fármacos y su aplicación en modelos animales son esenciales para

el desarrollo de terapias efectivas en el tratamiento de dichos desórdenes (44). La evidencia clínica del uso de fármacos antidepresivos que incrementan la neurotransmisión de monoaminas, como los inhibidores selectivos de recaptura de 5-HT (SSRI) o norepinefrina (SNRI), muestra que ésta sólo es efectiva en un tercio de los pacientes (3). Aunque hay gran cantidad de trabajos que utilizan modelos animales, aun no se han descrito los mecanismos celulares y moleculares que participan en la génesis de la depresión.

7. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que existen publicaciones en donde se evalúa la depresión y el contenido de 5-HT en modelos animales de estrés prenatal, los trabajos publicados hasta la fecha no han evaluado la liberación con relación al contenido de 5-HT en el hipocampo de ratas estresadas prenatalmente y estos cambios no se han considerado como un posible factor desencadenante de la conducta depresiva en la descendencia, lo cual aportaría más información respecto a la participación de las neuronas serotoninérgicas en el hipocampo de animales con trastorno de depresión.

8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿De qué manera en la etapa prenatal de la rata se modifica el contenido y la liberación de 5-HT en el hipocampo y cuál es su relación con la conducta depresiva?

9. HIPÓTESIS

El estrés prenatal en la rata gestante causará conducta depresiva y disminuirá los niveles de 5-HT en el hipocampo ventral de la descendencia en la etapa adulta.

10. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del estrés prenatal en la rata sobre el contenido de 5-HT hipocampal y su relación con el desencadenamiento de la depresión en la descendencia de las ratas en la edad adulta.

11. OBJETIVOS PARTICULARES

- Comprobar si la descendencia adulta de la rata estresada prenatalmente presenta conducta depresiva.
- Determinar la relación de la liberación de 5-HT con la conducta depresiva en ratas estresadas prenatalmente.
- Determinar si hay correlación entre la liberación y el contenido de 5-HT con la conducta depresiva en ratas estresadas prenatalmente.

12. MATERIAL Y MÉTODO

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).

Se utilizaron 20 ratas hembra de la cepa Wistar con un peso de 250 g. que fueron 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 (la luz se apaga a las 9:00), temperatura de 23° C \pm 1, con alimento y agua a libre demanda. Se permitió la cópula entre hembras y machos y se consideró el día cero de la gestación. Las madres se colocaron en cajas individuales, donde se llevó a cabo todo el proceso de gestación.

12.1 Diseño experimental

Durante la última semana de gestación (del día 15 al 21) las hembras gestantes se colocaron individualmente en un tanque de agua a una temperatura de 15 °C, a una altura de 15 cm, en donde las ratas nadaron durante periodos de 15 minutos, dos veces al día (9:00 am y 3:00 pm) por 7 días (58, 59). Las hembras del grupo control se mantuvieron en sus cajas con cuidados rutinarios de laboratorio. Cuando las crías del grupo control y de estrés nacieron al día 21 se eligieron a los machos y se formaron dos grupos. A la edad de dos meses y medio ambos grupos se sometieron a la prueba de ingesta de sacarosa y a la prueba de Porsolt. Inmediatamente después de que las ratas fueron sometidas a la prueba de Porsolt se sacrificaron para extraer el hipocampo ventral. Se cuantificó el contenido de serotonina y su metabolito por HPLC. En otras ratas se colocó una cánula de

microdiálisis dirigida a hipocampo ventral, se tomaron dializados y se cuantificó la liberación basal de serotonina y la concentración de su metabolito por HPLC (figura 4).

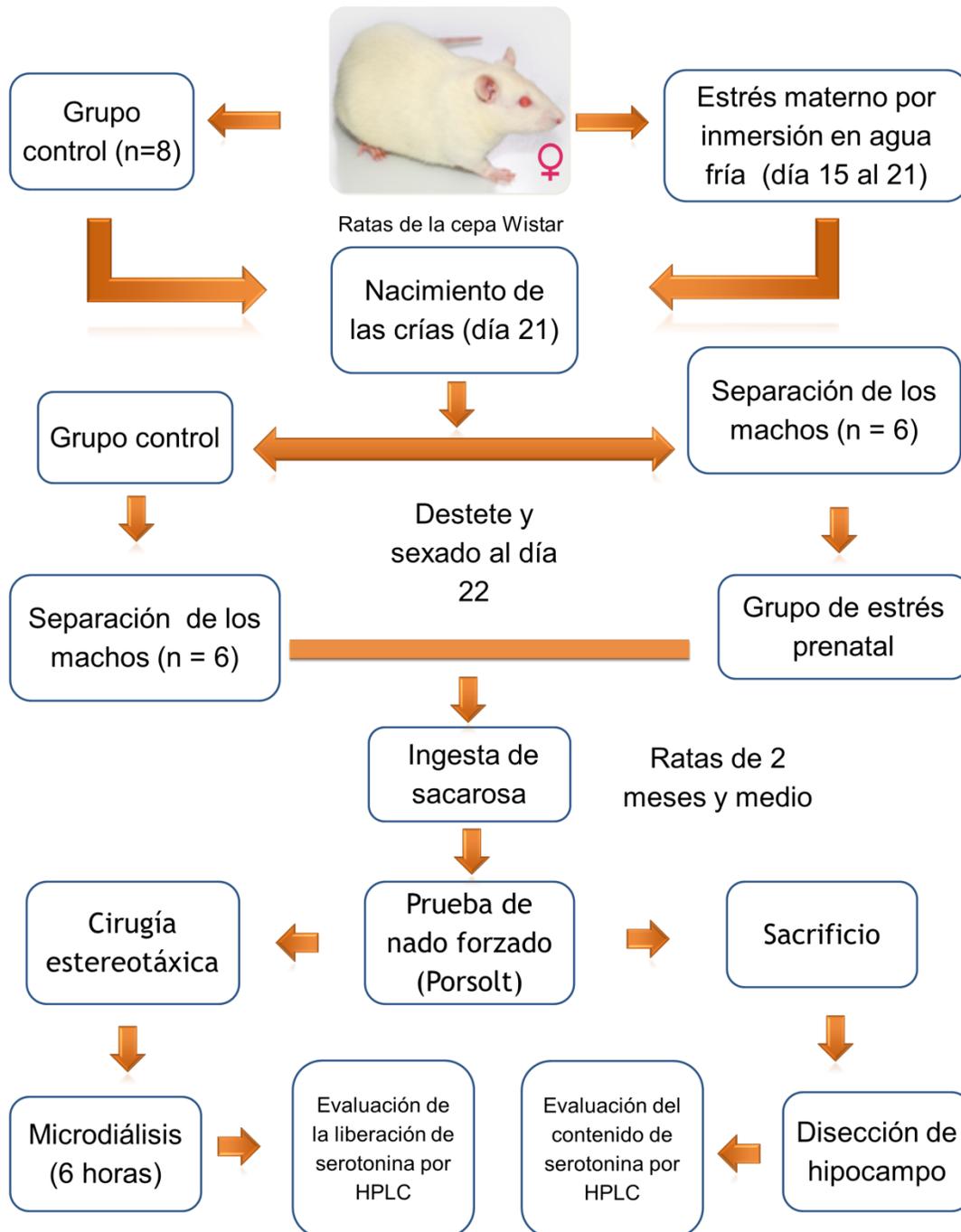


Figura 4. Diseño experimental. Secuencia de la aplicación de las pruebas conductuales, extracción de hipocampo ventral y evaluación del contenido de serotonina y su metabolito.

12.2 Prueba conductual de Porsolt

La descendencia en la edad adulta (2.5 meses) se sometió a la prueba de nado forzado (prueba de Porsolt) para evaluar la conducta anhedónica (60). Todos los experimentos empezaron a las 10:00 am, 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 ± 1 °C (61). 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 en segundos (considerada cuando la rata flota pasivamente de manera horizontal en el agua y sólo hace los movimientos necesarios para mantener la cabeza por debajo del agua). La conducta de la rata durante las pruebas se grabó con una cámara de video. Después de la prueba las ratas se removieron del cilindro de acrílico, se secaron y se colocaron nuevamente en su jaula.

12.3 Ingesta de sacarosa

Se midió la ingesta de sacarosa para corroborar la conducta anhedónica en las ratas depresivas (62). A las ratas se les colocó un bebedero con una solución de sacarosa (1%) por un tiempo continuo de 48 horas en lugar de agua, posteriormente se

hicieron tres pruebas con una duración de una hora utilizando una solución de sacarosa al 1%, en donde se colocaron dos cilindros uno con solución de sacarosa y la otra con agua, los cilindros se cambiaron de lugar después de 30 minutos para evitar la preferencia de un solo lugar. Un día antes de hacer la prueba de ingesta de sacarosa, a las ratas se les restringió el acceso a la comida y el agua por 21 horas. Se colocaron dos bebederos a la mañana siguiente entre las 8:00 am y las 9:00 am. Se midió el consumo de sacarosa en mililitros (63).

12.4 Microdiálisis

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de un peso inicial de aproximadamente de 250 g. de acuerdo con el manual de coordenadas estereotáxicas del cerebro de rata es el peso ideal para evitar errores de colocación de una cánula y tomar microdializados de una estructura cerebral que no es de interés al momento de implantar a un animal (64). Se siguió el protocolo establecido para implantar la cánula guía hacia el hipocampo ventral, Se anestesió a la rata con ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilazina (20 mg/kg, i.m.) (figura 5) se utilizó un aparato estereotáxico para fijar a la rata, se utilizaron las coordenadas con respecto a la sutura craneal bregma: anteroposterior - 5.3 mm, lateral -5.2mm y profundidad de -7.5 mm (figura 6) (64). Se colocó la cánula guía y se fijó con acrílico dental (figura 7). Después de 7 días de recuperación se inició la microdiálisis.

Se introdujo una cánula de microdiálisis la cual sobresale 3 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 de 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 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, donde se encuentra la membrana de poliacrilonitrilo. Se tomaron 3 muestras basales, una por cada hora. Después se administró una solución de alto potasio por 10 minutos. Se tomaron tres muestras cada hora. Cuando se tomó la última muestra la rata se sacrificó por decapitación y se extrajo el hipocampo y se almacenó. Se verificó que la cánula llegara a hipocampo ventral, se perfundió al animal con solución salina y paraformaldehído, después se decapitó a la rata para extraer el cerebro. Posteriormente se hicieron cortes coronales del cerebro de rata en un criostato a una temperatura de -20° C. Se obtuvieron cortes de 30 μ m que se colocaron en porta objetos gelatinizados, se llevó a cabo la técnica de tinción (Violeta de cresilo) para verificar si el electrodo llegó al hipocampo ventral (figura 8).



Figura 5. Se anestesió a la rata con ketamina y se administró un relajante muscular (xilazina), se rasuro la parte superior del cráneo, después se fijó el cráneo de la rata con los lápices estereotáxicos.



Figura 6. Se removió todo el tejido que estaba sobre el cráneo, después se alineó el electrodo con la sutura craneal bregma y basándose en las coordenadas estereotáxicas de manual del cerebro de rata se colocaron las coordenadas en el aparato para localizar al hipocampo ventral.



Figura 7. Se colocó el electrodo en el hipocampo ventral, después se fijaron dos tornillos en la superficie del cráneo, se colocó acrílico dental para fijar el electrodo y los tornillos.

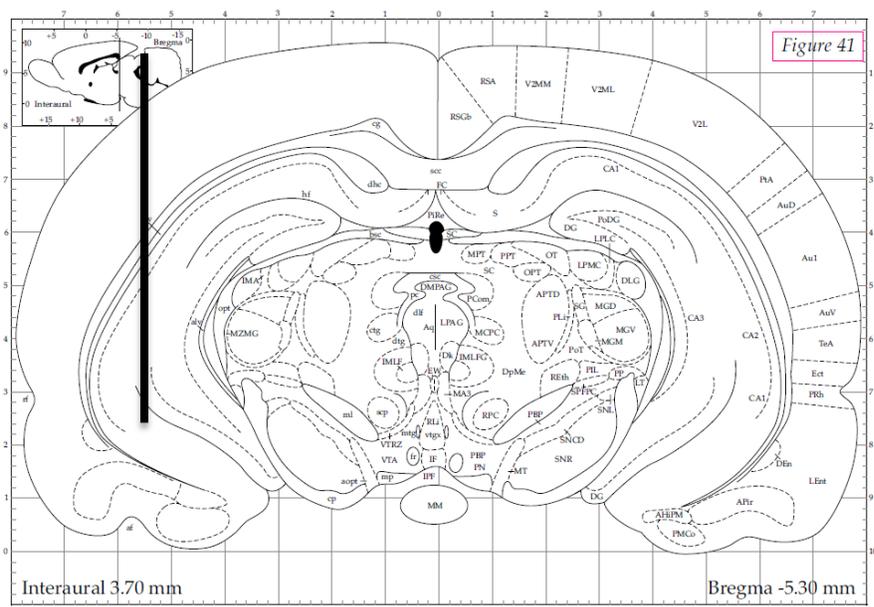


Figura 8. Esquema de un corte coronal de cerebro de rata tomado del atlas de Paxinos y Watson (65). Se indica con la barra de color negro el lugar en donde deberá llegar la cánula guía en el cerebro de la rata.

12.5 Cuantificación de monoaminas

La cuantificación de noradrenalina, ácido homovanílico, dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC), 5-HT y ácido 5-hidroxiindol 3-acético (5-HIAA) se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica.

12.6 Preparación de reactivos

12.6.1 Fase móvil

Buffer: acetonitrilo (90:10); pH 3.35, 1 L.		
Acetato de sodio	25 mM	2.05 g

Ácido cítrico	25mM	4.80 mL
EDTA	0.01	0.003 g
Ácido 1-octanosulfónico	1mM	0.216 g
Se disuelven todas las sales en 700 mL de agua Milli-Q. Se ajusta el pH a 3.35 con ácido acético concentrado. Adicionar 50 mL de acetonitrilo y se afora y se filtra.		

12.6.2 Solución de Ringer modificada (SRM), 100 mL

Cloruro de Sodio (NaCl)	147 mM	0.859 g
Cloruro de Potasio (KCL)	4 mM	0.030 g
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	2.3 mM	0.026 g
Ácido ascórbico		0.55 mL de sol. 2.27 mM
Agua Milli-Q	100 mL (cbp)	
Se ajusta el pH: 7.4 con NaOH 0.1N y se filtra la solución (0.22 µm)		

12.6.3 Solución antioxidante (AOx), 10 mL

L-cisteína	3.3 mM	0.0041
EDTA	0.27 mM	0.0010
Ácido ascórbico	12.5 µM	55 µL de sol. 2.27 mM
Ácido acético glacial	100 mM	57 µL de Ácido acético glacial

Agua Milli-Q	10 mL (cbp)	
Filtrar solución (0.22 µm)		

12.6. 4 Solución de alto potasio

Cloruro de Sodio (NaCL)	147 mM	0.453 g
Cloruro de Potasio (KCL)	4 mM	0.038 g
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	2.3 mM	0.026 g
Ácido ascórbico		0.55 mL de sol. 2.27 mM
Agua Milli-Q	100 mL (cbp)	
Se ajusta el pH: 7.4 con NaOH 0.1N y se filtra la solución (0.22 µm)		

12.6.5 Hidróxido de sodio (NaOH) .01 N

Hacer una dilución de 1:50 a partir de NaOH 5N. Se toman 0.2 mL de NaOH 5N + 9.8 ml H₂O.

12.6. 6 Estándares

5-HT
Sigma H9523

PM 212.68
Ácido 5-hidroxiindol 3- acético (5-HIAA)
Sigma H8876
PM 191.18

12.6.7 Elaboración de la curva estándar

Se preparó una solución stock de 100 μM de cada compuesto. Se pesó 0.05 mg de cada uno de los estándares y se solubilizaron en una mezcla de SRm + AOx la cual se colocó en el tubo ependorf.

Los estándares quedaron a una concentración para cada uno y se diluyen con SRm + AOx para tener una concentración de 100 μM y con un volumen final de 1 mL.

Catecolaminas	Primera concentración
5-HT	2.351
5-HIAA	2.615

Dilución	Vol. A tomar (μL) para obtener [100 μM]
1:23.51	42.54
1:26.15	38.24

A partir de esta solución de 100 μM se hizo una dilución 1:100 [100 μM] + 990 μL SRm+AOx) para obtener [1000nM]. Con esto se preparon las diluciones para obtener el resto de las concentraciones para realizar la curva de calibración, las cuales son de 1, 5 y 10.

12.7 Muestras

Las muestras obtenidas de los dializados se les agregaron 10% de la solución AOX y se inyectaron 30 μL en viales de vidrio que se colocaron en el automuestreador. El orden de aparición de los picos de los analitos, así como su tiempo de retención (figura 9).

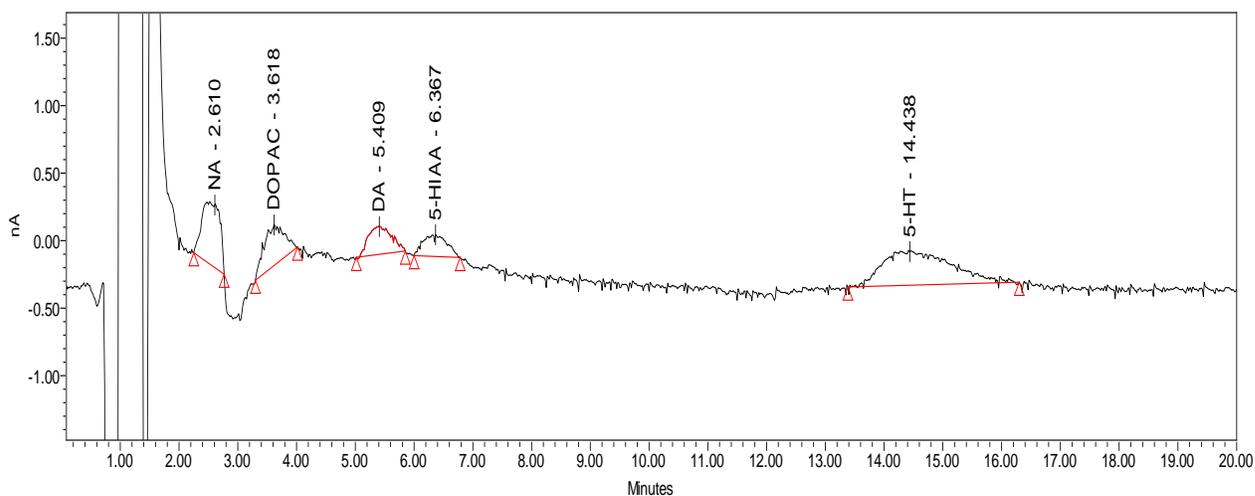


Figura 9. Cromatograma en donde se observan los picos de NA, DOPAC, DA, 5-HIAA y 5-HT y el tiempo de retención de cada una de ellas.

12.8 Sistema cromatográfico

12.8.1 Columna y flujo

Se deja estabilizar el equipo dos horas antes de realizar el análisis. Se utiliza un sistema de fase reversa consistente de una columna dC18, 3 µm; 2.1 x 50 mm; Atlantis (waters[®], U.S.) acoplado a una precolumna (Nova-Pack, Waters[®]) por la cual pasa la fase móvil, utilizando bombas Waters 515 a una velocidad de flujo de 0.35 mL/min.

12.8.2 Determinación y cuantificación de catecolaminas

La detección de monoaminas se realizó mediante un detector electroquímico amperométrico de un solo canal (Waters[®] modelo 2465, U.S.) a un potencial de 450 mV y una sensibilidad de detector de 5 nA, a una temperatura de 30°C.

12.8.3 Columna y flujo para contenido de serotonina

Se dejó estabilizar el equipo por un día, se utilizó un sistema Perkin-Elmer LC-250 de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector electroquímico, se utilizó una columna Alltec (C18 100 x 4.8 mm con un tamaño de entre partículas de 3 µm), la velocidad de flujo fue de 1 µL por minuto.

12.9 Extracción de hipocampo y HPLC

Las ratas adultas fueron decapitadas para la extracción del encéfalo, después se removió el hipocampo y se almacenó a una temperatura de -80°C . Posteriormente se descongeló la muestra que contenía el hipocampo ventral, se agregaron $300\ \mu\text{L}$ de ácido perclórico y se homogenizó el tejido, el tejido homogenizado se colocó en todo momento en hielo y se mantuvo cubierto para evitar que la luz no degradara la muestra, posteriormente se centrifugaron por 15 minutos a una temperatura de 7°C a 8000 revoluciones por minuto. El sobrenadante se filtró y se almacenó en congelación. Se inyectó $25\ \mu\text{L}$ de la muestra filtrada al sistema cromatográfico. La fase móvil consistió en una solución acuosa de buffer de fosfatos (0.1 M con un pH de 3.2) la cual contenía 0.2 mM de sulfato de sodio, 0.1 mM de EDTA y 15% metanol v/v.

12.10 Curvas estándar para cuantificar la 5-HT y 5-HIAA

Para medir la concentración de 5-HT se inyectaron estándares de monoaminas a diferentes concentraciones al cromatógrafo, después se cuantificó el área bajo la curva de acuerdo a cada concentración (figura 10 y 11).

Estándar para 5-HT mg	
40	66103.73
80	89669.95
160	198681.42
320	410484.45

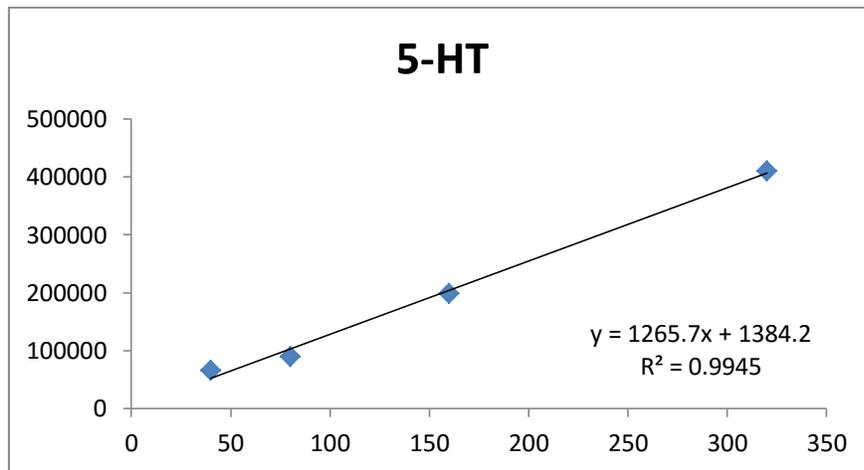


Figura 10. Se preparó el estándar de 5-HT a diferentes concentraciones, se inyectaron al cromatógrafo y se obtuvo la gráfica, la ecuación de la recta y el valor de R que debe ser próximo al valor de 1.

Estándar para 5-HIAA mg	
40	65537.03
80	131943.19
160	225942.54
320	421715.64

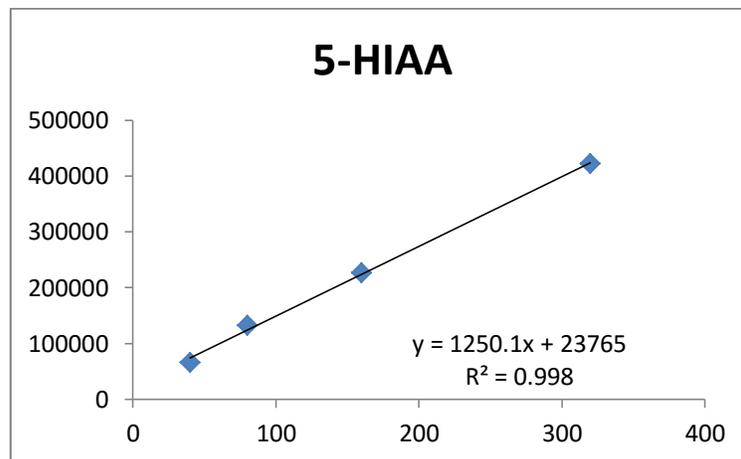


Figura 11. Se preparó el estándar de 5-HIAA a diferentes concentraciones, se inyectaron al cromatógrafo y se obtuvo la gráfica, la ecuación de la recta y el valor de R que debe ser próximo al valor de 1.

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron con pruebas paramétricas. Para la prueba de Porsolt y para la prueba de ingesta de sacarosa se utilizó la prueba estadística t-Student, también se utilizó la prueba de correlación de Pearson.

Se utilizó un análisis de varianza ANOVA de un factor seguida de una prueba post hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni para el contenido de serotonina en el hipocampo ventral, y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a partir de una probabilidad $P < 0.05$.

14. RESULTADOS

14.1 Evaluación de la conducta depresiva (Prueba de Porsolt)

Se observó que las ratas que fueron estresadas prenatalmente aumentaron la inmovilidad evaluadas durante 5 minutos en la prueba de Porsolt, en comparación con las ratas control (figura 12). Los tiempos de inmovilidad, entre el grupo de animales control y el estresado prenatalmente presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

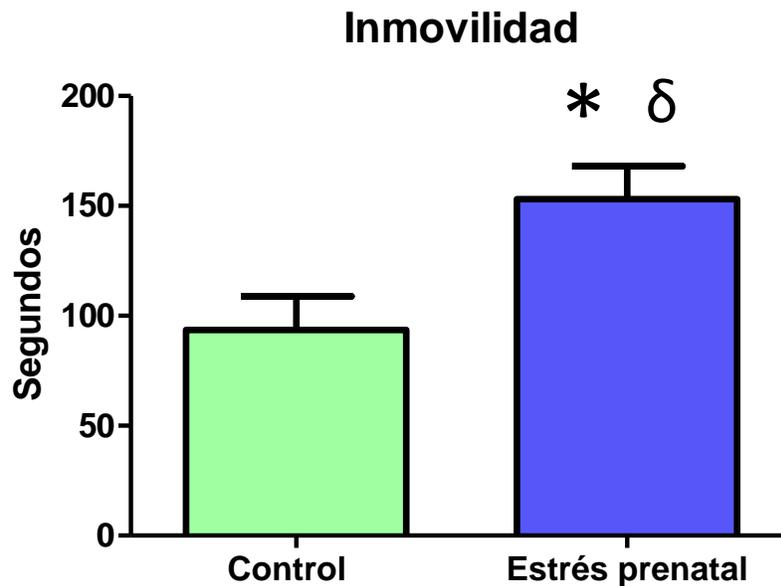


Figura 12. Tiempo total de inmovilidad (segundos) de ratas control (n =12) y de las estresadas prenatalmente (n=12) durante la prueba Porsolt con 5 minutos de duración. La inmovilidad en las ratas que fueron estresadas prenatalmente fue mayor en comparación con el grupo control. Los datos se muestran como la media \pm E.E. Los resultados fueron sometidos a la prueba de t-student. * $p < 0.05$, correlación de Pearson $\delta p = 0.04$ $r = -.832$.

14.2 Prueba de ingesta de sacarosa

Una vez que se aplicaron las pruebas conductuales de ingesta de sacarosa y Porsolt, se seleccionaron a las ratas que tuvieron bajo consumo de sacarosa y un tiempo mayor de inmovilidad, no todas las ratas del grupo de estrés mostraron conductas tipo depresivas, de un total de 14 ratas se obtuvo: 69% de ratas que desplegaron conductas tipo depresivas y un 31% que no mostraron estas conductas (Figura 13).



Figura 13. Se muestra el porcentaje obtenido de ratas anhedónicas. Se eligieron a las ratas que disminuyeron el consumo de sacarosa, ya que en algunas ratas no había modificación en su consumo.

La ingesta de sacarosa disminuyó en el grupo de ratas que fueron estresadas prenatalmente en comparación con las ratas control, al comparar el consumo de sacarosa se encontró diferencia significativa entre los dos grupos (figura 14).

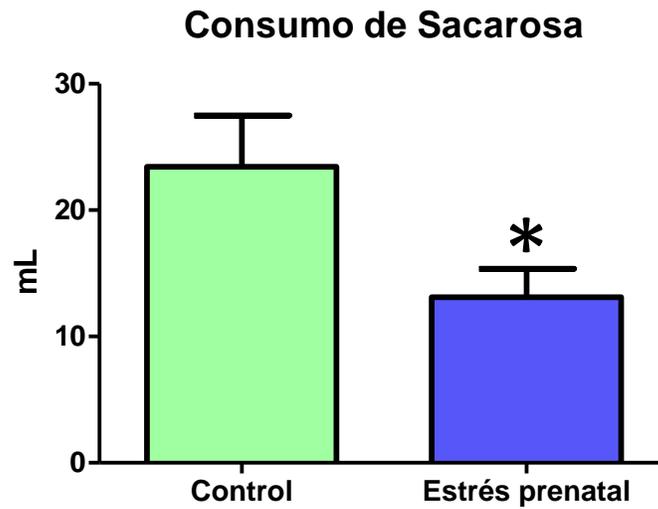


Figura 14. Consumo de sacarosa (mL) de ratas control (n = 12) y ratas estresadas prenatalmente (n = 12). El consumo de sacarosa en las ratas que fueron estresadas disminuyó en comparación con el control. Los datos se muestran como la media \pm E.E. Los resultados fueron sometidos a la prueba de t-student. * $p < 0.05$.

14.3 Liberación de serotonina

El estresor prenatal por inmersión en agua fría causó aumento en la liberación de serotonina y concentración de su metabolito, en comparación con las ratas control. Los datos en la figura 11 y 12 corresponden a dos ratas, una rata control y una rata del grupo de estrés prenatal.

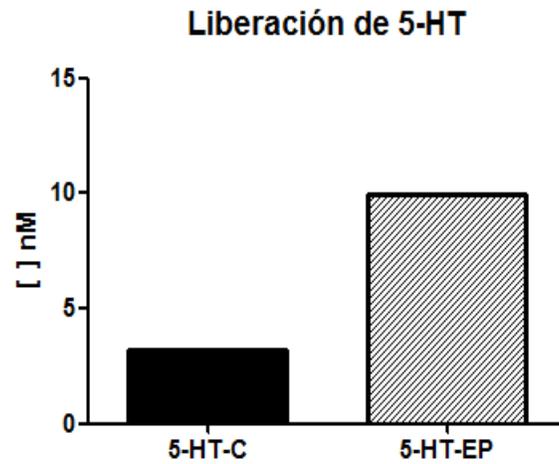


Figura 15. Liberación basal de 5-HT en el hipocampo ventral de una rata control y una estresada prenatalmente, hay mayor liberación de 5-HT en la rata del grupo de estrés. Rata control (C.) Rata del grupo de estrés (EP).

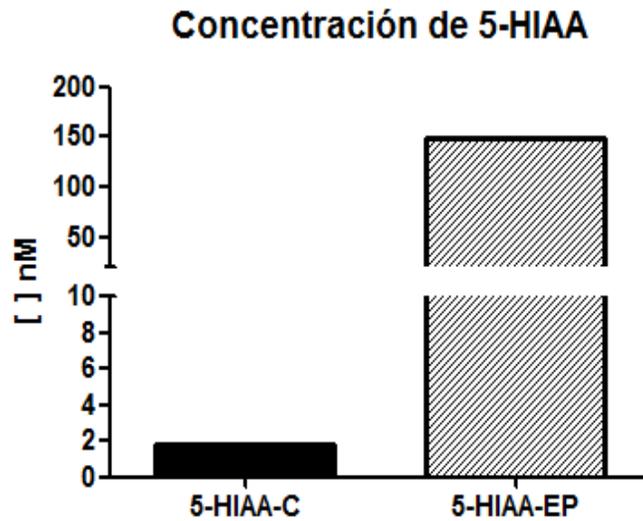


Figura 16. Concentración basal de 5-HIAA una rata control y una estresada prenatalmente, hay menor concentración del metabolito en las rata control en comparación con la de estrés prenatal. Rata control (C.) Rata del grupo de estrés (EP).

Se observa que la administración de AP provoca la liberación de 5-HT y aumenta la concentración de su metabolito en las ratas control (figura 16).

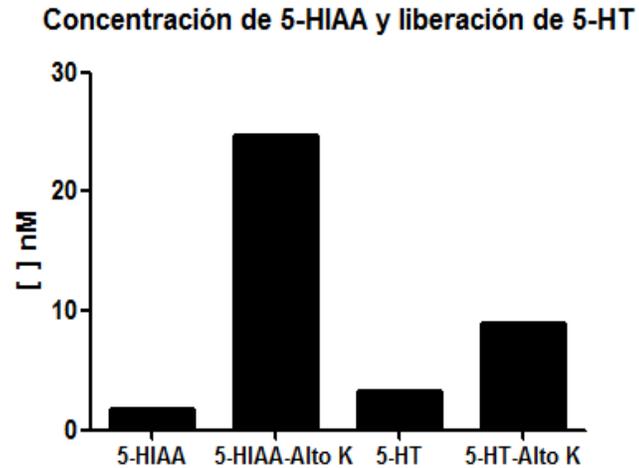


Figura 17. Concentración de 5-HIAA y liberación de 5-HT estimulada por la administración de alto potasio en ratas control. La concentración de 5-HIAA y la liberación de 5-HT es mayor después de la administración de alto K, Solución de alto potasio (alto K).

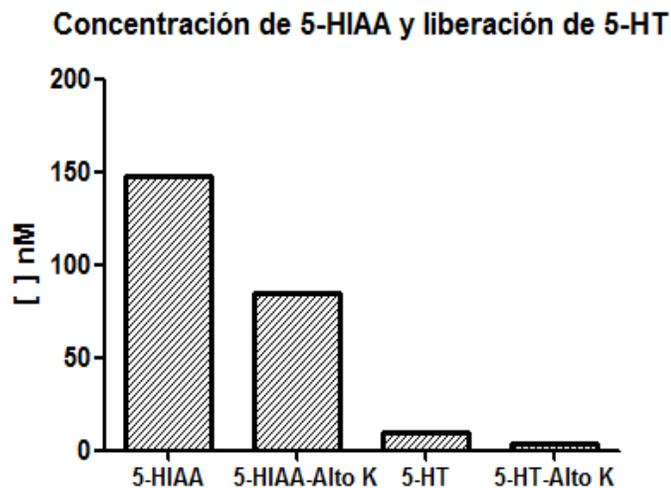


Figura 18. Concentración de 5-HIAA y liberación de 5-HT estimulada por la administración de alto potasio en las crías estresadas prenatalmente. La administración de alto K no incrementó la concentración de 5-HIAA y la liberación de 5-HT en la rata de estrés prenatal. Solución de alto potasio (alto K).

En las ratas de estrés se administró alto potasio para estimular el sistema de neurotransmisión al final de la microdiálisis y se observó que la liberación de 5-HT y su metabolito no se modificó por la administración de la solución de alto potasio la cual promueve la liberación de neurotransmisores (figura 18).

14.4 Contenido de 5-HT en el hipocampo ventral

Al finalizar la prueba de Porsolt se sacrificaron a las ratas inmediatamente, se extrajo el hipocampo ventral y se cuantificó el contenido de 5-HT en hipocampo de las ratas control y de estrés prenatal. Para conocer el contenido basal de 5-HT y su metabolito se sacrificaron a las ratas de ambos grupos a la edad de 2 meses y medio (n = 6), se observó que el contenido de 5-HT del grupo control y de estrés es similar, no hay diferencias estadísticamente significativas. Después de obtener los niveles basales de 5-HT y su metabolito, se sometió a otro grupo de ratas a la prueba de Porsolt e inmediatamente después se sacrificaron a las ratas para cuantificar los cambios en el contenido de 5-HT en el hipocampo ventral de las ratas control y con conductas tipo depresiva, la prueba de Porsolt generó disminución en el contenido de 5-HT en el hipocampo ventral en las ratas control, esta disminución en el contenido de 5-HT fue mayor que en las ratas estresadas prenatalmente, en las cuales el contenido no se modificó después de la prueba de Porsolt (figura 19).

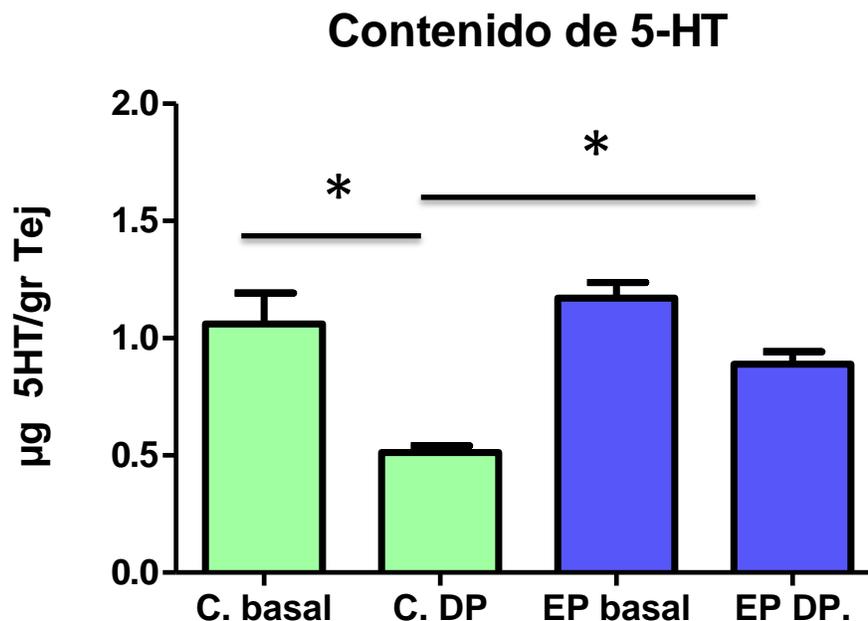


Figura 19. Contenido tisular de 5-HT (μg 5HT/gr tejido) de ratas control y crías estresadas prenatalmente. El contenido de 5-HT fue menor en ratas que no fueron estresadas después de la prueba de Porsolt, el contenido de 5-HT en las crías del grupo de estrés no se modificó. Los datos se muestran como la media \pm E.E. Los datos se analizaron con la prueba de ANOVA de comparaciones múltiples, seguida por la prueba post hoc de Bonferroni $*p < 0.05$. Grupo control (C.), Grupo de estrés prenatal (EP). Después de la prueba de Porsolt (DP).

14.5 Contenido de 5-HIAA en el hipocampo ventral

Tras la prueba de Porsolt se cuantificó el contenido del metabolito (5-HIAA) de 5-HT en hipocampo de las ratas control y de estrés prenatal. Se sacrificó a un grupo de ratas antes de aplicarse la prueba de Porsolt para cuantificar los niveles basales de 5-HIAA en hipocampo ventral. Otro grupo se utilizó para cuantificar los cambios en el contenido de 5-HIAA durante la prueba de Porsolt, las ratas de este grupo se sacrificaron inmediatamente después de la prueba de Porsolt. No hay diferencia en el

contenido de metabolito en los grupos de control y estrés basal. Sin embargo, hay disminución en el contenido del metabolito en el grupo de control y de estrés prenatal después de que se aplicó la prueba de Porsolt (figura 20).

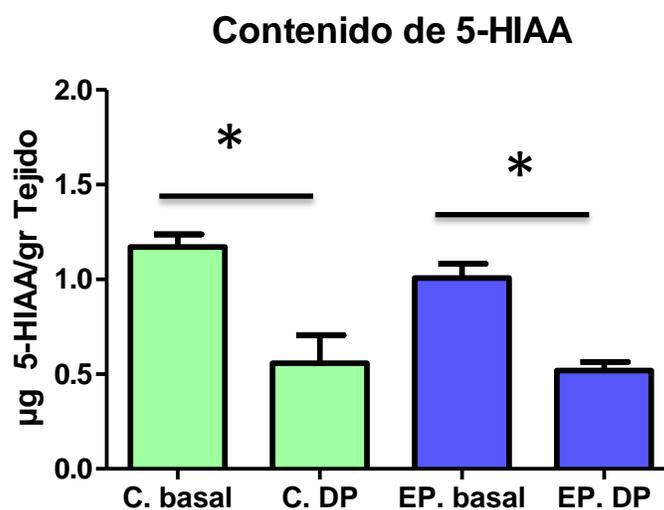


Figura 20. Contenido tisular de 5- HIAA (μg 5-HIAA/gr tejido) de ratas control y crías estresadas prenatalmente. El metabolito de la 5-HT disminuye de manera significativa en el grupo de estrés y el de control. Los datos se muestran como la media \pm E.E. Los datos se analizaron con la prueba de ANOVA de comparaciones múltiples, seguida por la prueba post hoc de Bonferroni $*p < 0.05$. Grupo control (C.), Grupo de estrés prenatal (EP). Después de la prueba de Porsolt (DP).

15. DISCUSIÓN

Diversos trabajos indican que los estresores aplicados en roedores durante la etapa gestacional provocan la manifestación de conductas tipo depresivas en la edad adulta, como la inmovilidad que es evaluada en la prueba de Porsolt (45, 63).

Los datos obtenidos en este trabajo muestran que la inmovilidad se incrementa en las ratas que fueron sometidas a estrés prenatal por inmersión en agua fría en la prueba de Porsolt de 5 minutos a la edad de dos meses y medio. Otros trabajos han descrito que el estresor por inmovilización en cilindros transparentes aplicado en los días 14 al 21 de la etapa prenatal no modifican el tiempo de inmovilidad en la prueba de Porsolt (66). En otro trabajo se utilizó ese mismo estresor, del día 11 al 20 de gestación en ratas y no observaron cambios en el tiempo de inmovilidad (67). Otros autores que utilizaron el mismo estresor del día 14 al 21 de gestación aplicado tres veces al día, reportaron que sí hay cambios en la inmovilidad en las crías de las ratas estresadas en la prueba de Porsolt a la edad de tres meses (68), la combinación del estresor por inmovilización y exposición a luz muy intensa aumenta el tiempo de inmovilidad en la crías de las madres que fueron estresadas prenatalmente (69). Adicionalmente, en otro trabajo se reportó que la combinación del estresor por inmovilidad y plataformas elevadas aplicados del día 13 al 21 de gestación aumentan la inmovilidad en las crías (70). Al parecer los resultados obtenidos utilizando el estresor por inmovilización son contradictorios ya que algunos autores sí observan el efecto del estrés prenatal y otros no. Probablemente las diferencias radiquen en la intensidad del estresor y el día gestacional en el que se

aplica, posiblemente el estresor por inmovilización no es tan intenso o las ratas se adaptan a este estresor y no activa al eje HHA, de esta manera la concentración de corticosterona en el feto no aumenta de manera continua y tal vez esta sea la razón por la cual no hay cambios conductuales por efecto del aumento prolongado a la corticosterona. Se ha reportado que el estrés por inmersión en agua fría activa de manera más intensa al eje adrenal por lo tanto hay mayor concentración de corticosterona en la rata en comparación con los estresores por inmovilización y choques eléctricos (58), por esta razón es más probable observar de manera conductal en la prueba de Porsolt los efectos de estrés prenatal en la etapa adulta y tal vez estos cambios se den por la interacción de la corticosterona con sus receptores en el hipocampo ventral, pues se ha reportado que esta estructura participa en la génesis de la depresión tanto en roedores como en el ser humano.

Existen otros paradigmas conductuales que se han desarrollado para verificar la conducta depresiva utilizando roedores como modelos, por ejemplo la prueba de ingesta de sacarosa, en donde se evalúa la conducta anhedónica que es un síntoma clave en la depresión mayor (62). Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que el estrés prenatal por inmersión en agua fría provoca la disminución en el consumo de sacarosa en las crías de las ratas que fueron estresadas en comparación con el grupo control. El modelo más utilizado hasta la fecha para evaluar la anhedonia es el estrés crónico leve impredecible, en el cual se utilizan diversos estresores que son impredecibles e incontrolables, se aplican de manera crónica durante la edad adulta y se verifica el consumo de sacarosa semanalmente (71). Se ha demostrado

ampliamente que el estrés crónico leve impredecible puede modelar la conducta anhedónica en una rata adulta. Los resultados de este trabajo muestran que si otro estresor por ejemplo el de inmersión en agua fría es utilizado en la etapa gestacional también puede modelar la conducta anhedónica en la descendencia adulta. Hasta la fecha no hay trabajos en donde sólo el estrés prenatal por inmersión en agua fría provoque la disminución en el consumo de sacarosa en la edad adulta. Recientemente se ha reportado que la utilización de estresores como inmovilización y luz intensa durante los días 14 al 21 de gestación incrementa el consumo de sacarosa en las ratas macho en los días 77 y 98 después de su nacimiento (53). Estos resultados son opuestos respecto a lo que se ha reportado, con el uso del protocolo de estrés crónico leve impredecible se produce disminución en el consumo de sacarosa (62). Probablemente la diferencia en el consumo de sacarosa radique en el estresor utilizado. Sin embargo, otro trabajo reportó que el estrés por inmovilización del día 13 al 17 en ratonas gestantes reduce el consumo de sacarosa en las crías del grupo de estrés en el día 25 de la etapa postnatal (72). Es probable que la diferencia de resultados radique en que se utilizaron especies diferentes.

Nuestro grupo de investigación recientemente demostró que el estresor por inmersión en agua fría incrementa drásticamente los niveles séricos de corticosterona en las ratas gestantes (73), sugiriendo que es un estresor muy intenso (psicológico y físico) que modifica la funcionalidad de diversas estructuras cerebrales. La disminución en el consumo de sacarosa, el cual es un parámetro para medir la conducta anhedónica en la ratas (un síntoma clave en la depresión mayor

en humanos) y el aumento en la inmovilidad que permite evaluar la conducta de desesperanza aprendida en la prueba de Porsolt observada en las crías estresadas prenatalmente sugiere que el estresor por inmersión en agua fría es capaz de activar al eje HHA de las ratas durante los 7 días de exposición, sin que la rata pueda adaptarse, lo que provoca cambios funcionales y estructurales en el cerebro del feto ocasionado por la exposición crónica a la corticosterona en la crías. Es importante que los cambios perduren hasta la edad adulta y estos cambios pueden reflejarse en la modificación de la conducta, en este caso el consumo de sacarosa disminuye a la edad de 2 meses y medio.

La generación de la conducta anhedónica involucra diversas regiones cerebrales como la corteza frontal orbital, la corteza prefrontal medial ventral, corteza cigulada anterior, el núcleo accumbens, el pallidum ventral, la amígdala, el hipocampo, la habenula lateral, el área tegmental ventral y el núcleo del rafe (74). En estas estructuras participan diversos neurotransmisores como la dopamina, el glutamato, el GABA y la 5-HT, sin embargo, la anhedonia está asociada con la disminución de la actividad en la vía mesolímbica de recompensa (75). El estrés por inmersión en agua fría ocasiona el aumento los niveles de corticosterona, la cual tiene receptores en todo el encéfalo de la rata, pero específicamente en el hipocampo en donde hay mayor densidad de receptores GR y MR (76, 77). Además también puede interactuar con las estructuras antes mencionadas, dicha interacción probablemente modifique la funcionalidad de este sistema de recompensa, provocando que las ratas en la edad adulta muestren disminución en el consumo de sacarosa.

De acuerdo con la hipótesis serotoninérgica los síntomas de la depresión mayor ocurren por una deficiencia en el contenido de 5-HT en distintas regiones cerebrales (9). Utilizando el modelo de depresión por estrés prenatal, en este trabajo se obtuvieron resultados que se relacionan con esta hipótesis: la prueba de Porsolt generó disminución en el contenido de 5-HT en el hipocampo ventral en las ratas control. Esta disminución en el contenido de 5-HT fue mayor que en las ratas estresadas prenatalmente, en las cuales el contenido de 5-HT no se modificó después de la prueba de Porsolt. Estos resultados sugieren que la inmovilidad en la prueba de Porsolt observada en los animales estresados prenatalmente podría explicarse por la nula liberación de 5-HT en el hipocampo ventral.

Después que la 5-HT es sintetizada y almacenada en vesículas sinápticas en la terminal axónica, es liberada por medio de exocitosis hacia la hendidura sináptica, en donde puede interactuar con sus receptores. Una vez que finaliza la interacción de la 5-HT con sus receptores es recapturada por los transportadores de 5-HT hacia la terminal presináptica y es degradada por la monoamino oxidasa (MAO) A (78). Se ha demostrado que la interacción de la corticosterona con sus receptores en el hipocampo ventral puede modificar al sistema serotoninérgico (26). Así se ha reportado que los estresores como la inmovilización y la exposición a la luz muy brillante aplicado del día 15 al 21 de gestación no modifica los niveles de 5-HT en el hipocampo (dorsal y ventral) ni de su metabolito, el metabolito disminuye después de la administración de fluoxetina (79). Utilizando el mismo estresor, aplicado en los días 11 al 20 de gestación, provoca disminución en la tasa de disparo en las

neuronas del núcleo dorsal de rafe después de la prueba de Porsolt (67). Las inyecciones de solución salina y el estrés por hacinamiento en los días 15 al 21 de gestación provocan la disminución del contenido de 5-HT en el día 35 postnatal en el hipocampo de la descendencia estresada prenatalmente (40). Por lo anterior, la intensidad y duración del estresor parece ser, un componente muy importante, además de la especificidad del área que se evalué.

El hipocampo está dividido en dos regiones anatómicas que son funcionalmente distintas: el hipocampo dorsal, que está relacionado con procesos de aprendizaje y memoria, y el hipocampo ventral, está relacionado con la génesis de la depresión y la regulación de la respuesta de estrés (80). Los resultados obtenidos en este trabajo respecto del contenido de 5-HT provienen del hipocampo ventral y se utiliza además otro tipo de estresor más intenso. Probablemente esta es la razón por la cual el contenido de 5-HT si se modifica en el hipocampo ventral.

Los datos obtenidos en este trabajo denotan que el contenido de 5-HT disminuye en el hipocampo ventral de ratas control después de la prueba de Porsolt, lo que sugiere que la 5-HT se está liberando y al ser liberada hacia el espacio sináptico puede ser recapturada por los transportadores de 5-HT o puede ser metabolizada (81, 82). En el grupo de las ratas estresadas, el contenido de 5-HT no se modificó por la prueba de Porsolt pero el metabolito disminuyó, lo que sugiere que la 5-HT localizada en las neuronas del hipocampo ventral no se está liberando esto puede explicar la conducta depresiva desplegada por las ratas cuando se sometieron a la prueba de Porsolt y a la prueba de ingesta de sacarosa.

Se ha reportado que estresores auditivos aplicados en el día 12 y 14 de gestación aumenta la cantidad del transportador de 5-HT en el hipocampo (54) y el uso de cultivos celulares con tratamientos con un glucocorticoide sintético como la dexametasona demuestran que la actividad del transportador de 5-HT es regulada por los glucocorticoides (83). Utilizando ratones knock-out para el transportador de 5-HT, se mostró que el estrés prenatal del día 6 de gestación hasta el día del nacimiento de las crías causa aumento de la conducta de ansiedad y disminuye la interacción social (84).

Con relación a los datos obtenidos en este trabajo probablemente la exposición crónica a los glucocorticoides provocado por el estrés prenatal pudo haber disminuido la funcionalidad del transportador de 5-HT o aumentar el contenido de esta proteína en el hipocampo y aumentar la recaptura del neurotransmisor, ya que el contenido de 5-HT se mantuvo sin cambio en las ratas estresadas después de la prueba de Porsolt. La cantidad de 5-HT en el hipocampo también depende de la actividad de la monoamino oxidasa, se ha demostrado que la administración del fármaco ladostigil que es un inhibidor de la MAO puede revertir la conducta tipo depresiva producida por el estrés prenatal por inmovilización en la prueba de Porsolt (12). Posiblemente el metabolismo de la 5-HT esté disminuido, lo que también explicaría la no modificación del contenido de 5-HT. En apoyo a lo anterior, se sabe que el estrés crónico leve impredecible aplicado en la edad adulta puede incrementar los niveles de la enzima MAO-A en el hipocampo (85). Es probable que la disminución del metabolito de 5-HT observada en este trabajo se deba al incremento

en la actividad de esta enzima, lo que explicaría la disminución de los niveles del metabolito en el hipocampo ventral.

Por otra parte, los receptores 5-HT_{1A}, son los receptores de 5-HT más abundantes en el cerebro, están acoplados a proteínas G y el principal efecto de la unión de la 5-HT con su receptor es provocar la hiperpolarización (86). Se ha sugerido que la depresión mayor está asociada con la disminución o regulación a la baja de estos receptores en diversas regiones cerebrales y esto puede contribuir a las alteraciones en la neurotransmisión serotoninérgica (87). Los datos obtenidos en el presente trabajo muestran que la liberación de 5-HT está aumentada en un animal estresado prenatalmente; esto podría estar relacionado con la disminución de estos receptores ya que se ha demostrado que utilizando diversos estresores durante la gestación provoca la disminución de los receptores 5-HT_{1A} (88). Aunado a estos resultados se ha demostrado que el estrés prenatal causa disminución en la expresión de los receptores 5HT_{1A} en la corteza prefrontal y en el núcleo del rafe lateral y medial (70).

La prueba conductual de Porsolt es utilizada ampliamente para probar la eficacia de los fármacos antidepresivos (89) y los resultados de este trabajo muestran que los niveles basales (antes de la prueba) de 5-HT en el hipocampo ventral son muy similares en los animales control y los de estresados prenatalmente, pero cuando se someten a la prueba de Porsolt el contenido de 5-HT disminuye de manera significativa en las ratas del grupo control, pero no en las ratas del grupo de estrés prenatal. Aunque no hay evidencia publicada hasta la fecha en donde se mida el

contenido de 5-HT en la prueba de Porsolt utilizando animales estresados, hay trabajos que reportan los niveles de 5-HT en animales sin ningún tratamiento. Por ejemplo se ha reportado que durante la prueba de Porsolt hay incremento de 5-HT en regiones límbicas como la corteza prefrontal, hipotálamo e hipocampo (tanto en hipocampo ventral y dorsal), pero no hay cambios en los niveles de 5-HT en el núcleo del rafe. La posible disminución en la neurotransmisión serotoninérgica en estructuras límbicas como el hipocampo, pero no en el núcleo del rafe, probablemente aumente el número de terminaciones serotoninérgicas e incremente la síntesis de 5-HT como un mecanismo de compensación (90). En contraste con los datos obtenidos en este trabajo, hubo disminución de 5-HT en hipocampo ventral debido a que el estrés prenatal modificó distintas áreas cerebrales en particular el sistema serotoninérgico hipocámpal.

Adell *et al.*, reportaron que el estrés por inmovilización (1 hora al día) durante 24 días, incrementa los niveles de 5-HT, 5-HIAA en diversas regiones del encéfalo de rata (91), estos resultados podrían ser una aproximación a lo que sucede cuando hay una alteración en la neurotransmisión serotoninérgica en la etapa prenatal lo que provoca modificaciones en el contenido de 5-HT. Otros trabajos reportan que los choques eléctricos no modifican los niveles de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo (92), pero otros trabajos reportan que los choques eléctricos por treinta minutos incrementan los niveles de triptófano en el hipocampo (93). Probablemente el tipo de estresor, la intensidad y duración del estresor son factores que influyen en el contenido de 5-HT en hipocampo.

Los niveles de 5-HT en el hipocampo no se modifican en las ratas macho, pero los niveles de RNA mensajero del receptor 5-HT_{1A} aumentan después de la prueba de Porsolt en animales que no fueron estresados prenatalmente (94). Por otro lado, trabajos han demostrado que hay una conexión a nivel molecular entre los receptores serotoninérgicos 5HT_{1A} y la corticosterona. La administración de fármacos agonistas que son selectivos para los receptores 5HT_{1A}, tanto pre-sinápticos como post-sinápticos tienen efectos antidepresivos en la prueba de Porsolt, pues disminuyen el tiempo de inmovilidad (95). Además la administración de fármacos agonistas como la buspirona, la gepirona, la tandospirona, el 8-OH-DPAT y la isapirona reducen de manera significativa el tiempo de inmovilidad cuando es administrada de manera crónica (96). Los receptores 5HT_{1A} tienen un papel fundamental en la génesis de la depresión y probablemente el aumento de la corticosterona por el estrés prenatal en las ratas tenga una interacción similar con los receptores que se encuentran en el cerebro fetal en desarrollo.

16. CONCLUSIONES

El estrés aplicado durante la gestación es capaz de producir conductas de tipo depresivas en las crías a la edad de dos meses y medio.

El estrés prenatal como estresor crónico provoca la conducta anhedónica reduciendo el consumo de sacarosa.

El contenido de 5-HT en hipocampo ventral no se modifica en ratas estresadas prenatalmente en respuesta a la prueba de Porsolt.

Las conductas tipo depresivas en animales estresados prenatalmente se asocian con alteraciones en el contenido de 5-HT en el hipocampo ventral.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. Bianchi R, Schonfeld IS, Laurent E. Burnout–depression overlap: A review. *Clinical psychology review*. 2015;36:28-41.
2. Association D-AP. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. Arlington: American Psychiatric Publishing. 2013.
3. Lolak S, Suwannarat P, Lipsky RH. Epigenetics of depression. *Progress in molecular biology and translational science*. 2014;128:103.
4. Hamon M, Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2013;45:54-63.
5. Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. *The Journal of clinical psychiatry*. 2000;61(suppl 6):7-11.
6. Luscher B, Shen Q, Sahir N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Molecular psychiatry*. 2011;16(4):383-406.
7. Klumpers UM, Veltman DJ, Drent ML, Boellaard R, Comans EF, Meynen G, et al. Reduced parahippocampal and lateral temporal GABAA-[11C] flumazenil binding in major depression: preliminary results. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2010;37(3):565-74.
8. Albert PR, Benkelfat C. The neurobiology of depression—revisiting the serotonin hypothesis. II. Genetic, epigenetic and clinical studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2013;368(1615):20120535.
9. Booij L, Van der Does W, Benkelfat C, Bremner JD, Cowen PJ, Fava M, et al. Predictors of mood response to acute tryptophan depletion: a reanalysis. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27(5):852-61.
10. Fakhoury M. Revisiting the Serotonin Hypothesis: Implications for Major Depressive Disorders. *Molecular neurobiology*. 2015:1-9.
11. Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2008;32(6):1073-86.
12. Poltyrev T, Gorodetsky E, Bejar C, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M. Effect of chronic treatment with ladostigil (TV-3326) on anxiogenic and depressive-like behaviour and on activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in male and female prenatally stressed rats. *Psychopharmacology*. 2005;181(1):118-25.
13. Vollmayr B, Gass P. Learned helplessness: unique features and translational value of a cognitive depression model. *Cell and tissue research*. 2013;354(1):171-8.
14. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*. 1984;83(1):1-16.
15. Fava M, Kendler KS. Major depressive disorder. *Neuron*. 2000;28(2):335-41.
16. Clark DA, Beck AT. Cognitive theory and therapy of anxiety and depression: convergence with neurobiological findings. *Trends in cognitive sciences*. 2010;14(9):418-24.
17. Enkel T, Gholizadeh D, und Halbach OvB, Sanchis-Segura C, Hurlmann R, Spanagel R, et al. Ambiguous-cue interpretation is biased under stress-and depression-like states in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(4):1008-15.
18. Everaert J, Koster EH, Derakshan N. The combined cognitive bias hypothesis in depression. *Clinical psychology review*. 2012;32(5):413-24.
19. Sanchis-Segura C, Spanagel R, Henn F, Vollmayr B. Reduced sensitivity to sucrose in rats bred for helplessness: a study using the matching law. *Behavioural pharmacology*. 2005;16(4):267-70.

20. Vollmayr B, Bachteler D, Vengeliene V, Gass P, Spanagel R, Henn F. Rats with congenital learned helplessness respond less to sucrose but show no deficits in activity or learning. *Behavioural brain research*. 2004;150(1):217-21.
21. Henn FA, Vollmayr B. Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2005;29(4):799-804.
22. Czéh B, Fuchs E, Wiborg O, Simon M. Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2016;64:293-310.
23. Deussing JM. Animal models of depression. *Drug discovery today: disease models*. 2007;3(4):375-83.
24. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*. 1992;267(9):1244-52.
25. Oleskevich S, Descarries L. Quantified distribution of the serotonin innervation in adult rat hippocampus. *Neuroscience*. 1990;34(1):19-33.
26. St-Pierre J, Laurent L, King S, Vaillancourt C. Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta*. 2015.
27. Schulkin J. *Allostasis, homeostasis, and the costs of physiological adaptation*: Cambridge University Press; 2004.
28. Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1992;16(2):115-30.
29. Koolhaas J, Bartolomucci A, Buwalda B, De Boer S, Flügge G, Korte S, et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2011;35(5):1291-301.
30. Retana-Marquez S, Delgado-Sánchez, J., Keller, M. . *Avances en la Biología de la Reproducción*2012. 236 p.
31. Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in neuroendocrinology*. 2009;30(1):65-91.
32. Torpy DJ, Chrousos GP. The three-way interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes and the immune system. *Bailliere's clinical rheumatology*. 1996;10(2):181-98.
33. Bornstein S, Chrousos G. Adrenocorticotropin (ACTH)-and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84(5):1729-36.
34. Nicolaidis NC, Charmandari E, Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in human health and disease. *Introduction to Translational Cardiovascular Research*: Springer; 2015. p. 91-107.
35. Amat J, Alekseev R, Paul E, Watkins L, Maier S. Behavioral control over shock blocks behavioral and neurochemical effects of later social defeat. *Neuroscience*. 2010;165(4):1031-8.
36. Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S. Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews*. 2010;65(1):56-79.
37. Moghaddam B. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biological psychiatry*. 2002;51(10):775-87.
38. Sapolsky RM, Zola-Morgan S, Squire L. Inhibition of glucocorticoid secretion by the hippocampal formation in the primate. *The Journal of neuroscience*. 1991;11(12):3695-704.
39. Sapolsky RM. Atrophy of the hippocampus in posttraumatic stress disorder: how and when? 2001.

40. Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 1998;16(3):209-16.
41. Matthews SG, Phillips DI. Transgenerational inheritance of stress pathology. *Experimental neurology*. 2012;233(1):95-101.
42. Boersma GJ, Tamashiro KL. Individual differences in the effects of prenatal stress exposure in rodents. *Neurobiology of Stress*. 2015;1:100-8.
43. Beijers R, Buitelaar JK, de Weerth C. Mechanisms underlying the effects of prenatal psychosocial stress on child outcomes: beyond the HPA axis. *European child & adolescent psychiatry*. 2014;23(10):943-56.
44. Das M. Behavioral animal models of depression. *Neuroscience bulletin*. 2010;26(4):327-37.
45. Alonso S, Damas C, Navarro E. Behavioral despair in mice after prenatal stress. *Journal of physiology and biochemistry*. 2000;56(2):77-82.
46. Welberg LA, Thirivikraman K, Plotsky PM. Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *Journal of endocrinology*. 2005;186(3):R7-R12.
47. Avishai-Eliner S, Brunson KL, Sandman CA, Baram TZ. Stressed-out, or in (utero)? Trends in neurosciences. 2002;25(10):518-24.
48. Peters DA. Maternal stress increases fetal brain and neonatal cerebral cortex 5-hydroxytryptamine synthesis in rats: a possible mechanism by which stress influences brain development. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1990;35(4):943-7.
49. Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza P-V, Abrous DN. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biological psychiatry*. 2006;59(9):786-92.
50. Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature neuroscience*. 2007;10(9):1110-5.
51. Tanti A, Belzung C. Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: are depression and the action of antidepressants region-specific? *Neuroscience*. 2013;252:234-52.
52. Van den Hove D, Jakob SB, Schraut K-G, Kenis G, Schmitt AG, Kneitz S, et al. Differential effects of prenatal stress in 5-Htt deficient mice: towards molecular mechanisms of gene x environment interactions. *PLoS One*. 2011;6(8):e22715.
53. Van den Hove D, Leibold N, Strackx E, Martinez-Claros M, Lesch K, Steinbusch H, et al. Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional behavior and the serotonergic system. *European Neuropsychopharmacology*. 2014;24(4):595-607.
54. Bielas H, Arck P, Bruenahl C, Walitza S, Grünblatt E. Prenatal stress increases the striatal and hippocampal expression of correlating c-FOS and serotonin transporters in murine offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2014;38:30-5.
55. Huang Y, Xu H, Li H, Yang H, Chen Y, Shi X. 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 neuroscience*. 2012;13(1):22.
56. Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006;7(2):137-51.
57. Cassano P, Fava M. Depression and public health: an overview. *Journal of Psychosomatic Research*. 2002;53(4):849-57.

58. Retana-Marquez S, Bonilla-Jaime H, Vazquez-Palacios G, Martinez-Garcia R, Velazquez-Moctezuma J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones and Behavior*. 2003;44(4):327-37.
59. Bidzinska B, Petraglia F, Angioni S, Genazzani A, Criscuolo M, Ficarra G, et al. Effect of Different Chronic Intermittent Stressors and Acetyl-/Carnitine on Hypothalamic β -Endorphin and GnRH and on Plasma Testosterone Levels in Male Rats. *Neuroendocrinology*. 1993;57(6):985-90.
60. Porsolt R, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*. 1977;229(2):327-36.
61. Sunal R, Gümüşel B, Kayaalp S. Effect of changes in swimming area on results of "behavioral despair test". *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1994;49(4):891-6.
62. Muscat R, Willner P. Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1992;16(4):507-17.
63. Tang M, Lei J, Sun X, Liu G, Zhao S. Stress-induced anhedonia correlates with lower hippocampal serotonin transporter protein expression. *Brain research*. 2013;1513:127-34.
64. Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *Journal of neuroscience methods*. 1980;3(2):129-49.
65. Paxinos G, Franklin KB. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*: Gulf Professional Publishing; 2004.
66. Van den Hove D, Blanco C, Aendekerk B, Desbonnet L, Bruschetini M, Steinbusch H, et al. Prenatal restraint stress and long-term affective consequences. *Developmental neuroscience*. 2005;27(5):313-20.
67. Oosterhof CA, El Mansari M, Merali Z, Blier P. Altered monoamine system activities after prenatal and adult stress: A role for stress resilience? *Brain research*. 2016;1642:409-18.
68. Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Koehl M, Casolini P, Van Reeth O, Maccari S. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test: effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain research*. 2003;989(2):246-51.
69. Boulle F, Pawluski JL, Homberg JR, Machiels B, Kroeze Y, Kumar N, et al. Developmental fluoxetine exposure increases behavioral despair and alters epigenetic regulation of the hippocampal BDNF gene in adult female offspring. *Hormones and behavior*. 2016;80:47-57.
70. Zohar I, Shoham S, Weinstock M. Perinatal citalopram does not prevent the effect of prenatal stress on anxiety, depressive-like behaviour and serotonergic transmission in adult rat offspring. *European Journal of Neuroscience*. 2016.
71. Pothion S, Bizot J-C, Trovero F, Belzung C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behavioural brain research*. 2004;155(1):135-46.
72. Behan ÁT, van den Hove DL, Mueller L, Jetten MJ, Steinbusch HW, Cotter DR, et al. Evidence of female-specific glial deficits in the hippocampus in a mouse model of prenatal stress. *European Neuropsychopharmacology*. 2011;21(1):71-9.
73. de los Angeles GAM, del Carmen ROM, Wendy PM, Socorro R-M. Tactile stimulation effects on hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory in prenatally stressed rats. *Brain research bulletin*. 2016;124:1-11.
74. Der-Avakian A, Markou A. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends in neurosciences*. 2012;35(1):68-77.
75. Wiborg O. Chronic mild stress for modeling anhedonia. *Cell and tissue research*. 2013;354(1):155-69.

76. Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience research*. 1996;26(3):235-69.
77. Van Eekelen J, Jiang W, De Kloet E, Bohn M. Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *Journal of neuroscience research*. 1988;21(1):88-94.
78. Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Human genetics*. 1998;103(3):273-9.
79. Gemmel M, Rayen I, van Donkelaar E, Loftus T, Steinbusch HW, Kokras N, et al. Gestational stress and fluoxetine treatment differentially affect plasticity, methylation and serotonin levels in the PFC and hippocampus of rat dams. *Neuroscience*. 2016;327:32-43.
80. Grigoryan G, Segal M. Lasting differential effects on plasticity induced by prenatal stress in dorsal and ventral hippocampus. *Neural plasticity*. 2016;2016.
81. aan het Rot M, Mathew SJ, Charney DS. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *Canadian Medical Association Journal*. 2009;180(3):305-13.
82. Wong DT, Perry KW, Bymaster FP. The discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005;4(9):764-74.
83. Glatz K, Mössner R, Heils A, Lesch K. Glucocorticoid-regulated human serotonin transporter (5-HTT) expression is modulated by the 5-HTT gene-promotor-linked polymorphic region. *Journal of neurochemistry*. 2003;86(5):1072-8.
84. Jones KL, Smith RM, Edwards KS, Givens B, Tilley MR, Beversdorf DQ. Combined effect of maternal serotonin transporter genotype and prenatal stress in modulating offspring social interaction in mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2010;28(6):529-36.
85. Stefanovic B, Spasojevic N, Jovanovic P, Jasnica N, Djordjevic J, Dronjak S. Melatonin mediated antidepressant-like effect in the hippocampus of chronic stress-induced depression rats: Regulating vesicular monoamine transporter 2 and monoamine oxidase A levels. *European Neuropsychopharmacology*. 2016;26(10):1629-37.
86. Banerjee P, Mehta M, Kanjilal B. The 5-HT_{1A} receptor: a signaling hub linked to emotional balance. *Serotonin Receptors in Neurobiology*. 2007.
87. Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, et al. Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C] WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Archives of general psychiatry*. 2000;57(2):174-80.
88. Van den Hove D, Lauder J, Scheepens A, Prickaerts J, Blanco C, Steinbusch H. Prenatal stress in the rat alters 5-HT_{1A} receptor binding in the ventral hippocampus. *Brain research*. 2006;1090(1):29-34.
89. Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiology & behavior*. 2013;118:227-39.
90. Zangen A, Overstreet DH, Yadid G. High Serotonin and 5-Hydroxyindoleacetic Acid Levels in Limbic Brain Regions in a Rat Model of Depression; Normalization by Chronic Antidepressant Treatment. *Journal of neurochemistry*. 1997;69(6):2477-83.
91. Adell A, Garcia-Marquez C, Armario A, Gelpi E. Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *Journal of neurochemistry*. 1988;50(6):1678-81.
92. Shanks N, Griffiths J, Anisman H. Norepinephrine and serotonin alterations following chronic stressor exposure: mouse strain differences. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1994;49(1):57-65.

93. Inoue T, Koyama T, Yamashita I. Effect of conditioned fear stress on serotonin metabolism in the rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1993;44(2):371-4.
94. Drossopoulou G, Antoniou K, Kitraki E, Papathanasiou G, Papalexi E, Dalla C, et al. Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. *Neuroscience*. 2004;126(4):849-57.
95. Matsuda T, Somboonthum P, Suzuki M, Asano S, Baba A. Antidepressant-like effect by postsynaptic 5-HT 1A receptor activation in mice. *European journal of pharmacology*. 1995;280(2):235-8.
96. Wieland S, Lucki I. Antidepressant-like activity of 5-HT1A agonists measured with the forced swim test. *Psychopharmacology*. 1990;101(4):497-504.