



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE LA
SEROTONINA EN RELACION CON LA EDAD Y EL ESTRÉS
EN RATAS WISTAR MACHO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIOLOGO

P R E S E N T A:
ALIYERI FELIX DIAZ VALDERRAMA



DIRECTOR DE TESIS: DRA. LUCIA ALBA
MARTINEZ MOTA

(2011)



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Expresión del transportador de la serotonina en relación con la edad y el estrés en ratas wistar macho

realizado por **Díaz Valderrama Aliyeri Félix** con número de cuenta **0-9218991-7** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Propietario Dra. Milagros Méndez Ubach

Propietario Dra. Lucía Alba Martínez Mota
Tutora

Suplente Dra. Martha María de la Salud León Olea

Suplente Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 27 de octubre de 2010

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/CZS/cigs

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacología Conductual del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, bajo la dirección de la Dra. Lucía Martínez Mota y la asesoría técnica del M.C. Jaime Herrera Pérez. El análisis de imágenes se realizó en el laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica del INPRF con el apoyo de la Dra. Martha León Olea y la asesoría del M.C. René Garduño Gutiérrez. El trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto No 62020.

A.F.D.V. recibió una beca del Sistema Nacional de Investigadores como ayudante de investigador, y del proyecto Salud Reproductiva e Igualdad de Género (P017/D018) del INPRF.

Agradecimientos

A la Dra. Lucy por su confianza y apoyo incondicionales

A los miembros del jurado que revisó mi tesis,
La Dra. Milagros, la Dra. Martha, la Dra. Erika y la Dra. Salceda,
Por haberse tomado el tiempo de leer a detalle este trabajo escrito y por haber aportado sus
valiosos comentarios, ayudándome a expresar con claridad y fundamento mi trabajo

A mis compañeros de laboratorio y del Instituto, que me apoyaron diariamente en la realización
de la parte experimental y a veces teórica.

Al Dr. Fernández Guasti por su valioso apoyo.

Dedicatoria

A Max, mi hijo, por haber constituido un importante motivo para cerrar este ciclo.

A Gaby, por haberme regalado la energía vital que necesita el alma para materializar sus proyectos

A mis hermanos, que depositaron su confianza en mí, animándome siempre a seguir adelante

Al pueblo de México, que alimenta la educación de sus jóvenes con una gran universidad Latinoamericana, la UNAM

A mis padres, amigos, compañeros y familiares.

INDICE

	Página
1. Resumen.....	1
Índice de abreviaturas.....	3
Índice de figuras.....	4
2. Antecedentes.....	6
2.1. Depresión.....	6
2.2. Estrés.....	12
2.3. Modelos Animales.....	17
2.4. Prueba de nado.....	19
2.5. Edad y depresión.....	22
2.6. Estructuras asociadas al estrés y la depresión.....	25
2.7. Serotonina y SERT.....	30
3. Planteamiento del problema.....	33
4. Hipótesis.....	33
5. Objetivos.....	34
6. Material y métodos.....	35
6.1. Sujetos experimentales.....	35
6.2. Edades.....	35
6.3. Diseño experimental.....	36
6.3. Nado forzado.....	38
6.4. Perfusión.....	39
6.5. Regiones de interés.....	40
6.6. Tinción de Nissl.....	44
6.7. Inmunofluorescencia.....	45
6.8. Análisis de imágenes.....	47
6.9. Análisis estadístico.....	50
7. Resultados.....	51
8. Discusión.....	69
9. Conclusiones.....	81
10. Perspectivas.....	82
11. Referencias.....	83
12. Apéndice.....	92
1. Tinción de Nissl.....	92
2. Soluciones para perfusión.....	93
3. Gelatinización.....	94
4. Anestésicos.....	94

1. RESUMEN

La depresión es un desorden afectivo caracterizado por la disminución de la capacidad para experimentar placer, decaimiento del estado de ánimo, sentimientos de tristeza, desesperanza y culpa. La hipótesis de las monoaminas, sostiene que, alteraciones en el funcionamiento de los sistemas monoaminérgicos, guardan una relación importante con esta psicopatología. A su vez, el desarrollo de la depresión puede estar asociado a eventos estresantes. Esto ha sido evidenciado en algunos modelos animales de depresión, como la prueba de nado forzado (PNF), un modelo conductual que induce inmovilidad, una conducta que ha sido interpretada como desesperanza. Por otro lado, la respuesta a los fármacos antidepressivos que inhiben la recaptura de serotonina (ISRS) varía con la edad, puesto que tales fármacos son menos eficaces en niños y en personas de la tercera edad. El transportador de serotonina (SERT) es el blanco farmacológico de los ISRS. Estudios genéticos en humanos sugieren que la menor expresión del SERT podría estar asociada a una pobre respuesta a los fármacos antidepressivos y al riesgo de padecer depresión. Por lo tanto resulta de interés estudiar los cambios en la expresión del SERT cerebral en diferentes edades y relacionar estos cambios con la conducta tipo depresiva inducida por estrés.

En este trabajo se utilizaron 84 ratas macho de la cepa Wistar de diferentes edades (prepuberales: 24-32 PN; puberales: 40-41 PN; adultos jóvenes: 3 meses PN; y adultos de edad media: 12-13 meses PN), que fueron asignados a dos grupos: a) el grupo experimental fue sometido a la prueba de nado forzado para evaluar la conducta tipo depresión y los cambios en el SERT en respuesta al estrés por nado, y b) el grupo control permaneció sin perturbaciones (sin nado forzado), y fue utilizado para evaluar los cambios en el SERT de acuerdo a la edad. Los cerebros de los animales se fijaron por perfusión y se almacenaron, posteriormente fueron rebanados (a 40 micras) en congelación y procesados para inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal contra el fragmento de 85 a.a. del extremo N-terminal del SERT. El área inmunoreactiva al SERT (ir-SERT) se cuantificó con ayuda de un analizador de imágenes, en regiones cerebrales asociadas con la depresión: región prelímbica de la corteza prefrontal, región intermedia del septum lateral, núcleo basolateral de la amígdala, región CA3 del hipocampo ventral posterior y núcleos dorsales del rafe dorsal.

Los resultados de la PNF mostraron que todos los grupos desarrollan la conducta de inmovilidad, sin embargo, ésta fue significativamente menor en las ratas prepuberales respecto de las ratas puberales y de edad media, lo cual sugiere que si bien la PNF es un modelo sensible para detectar la desesperanza en todos los grupos de edad empleados, la inmovilidad es mayor a partir de la adolescencia.

Se utilizó un ANOVA de tres vías para determinar la influencia de la edad, el estrés y la región cerebral sobre el SERT. Encontramos diferencias por los factores edad ($F_{3,120}=17.641$, $p < 0.001$), incrementando el área ir-SERT hacia la edad adulta y decayendo con la edad media. Asimismo, se encontraron diferencias por región cerebral ($F_{4,120}=15.405$, $p < 0.001$), lo cual indica que el SERT se distribuye de una manera regionalmente específica. El factor estrés mostró una tendencia a la baja ($F_{1,120}=3.218$, $p=0.075$), lo cual sugiere que el estrés por nado tiende a disminuir los niveles del SERT. De forma interesante, el análisis mostró una diferencia significativa en la interacción de los factores estrés y edad ($F_{3,120}= 4.923$, $p=0.003$), encontrando un efecto significativo en los niveles del SERT de los grupos juveniles, lo cual sugiere que los prepuberales y puberales son grupos más sensibles al estrés por nado. En estas poblaciones, el efecto del nado forzado fue distinto en las regiones observadas: incrementó el área ir-SERT en el septum de ratas prepuberales, mientras la redujo en septum y rafé de las ratas puberales.

Este trabajo refuerza las investigaciones sobre la importancia del septum lateral en las conductas activas durante el nado forzado, además de ser una estructura considerada sitio blanco de las acciones de los antidepresivos. Por otro lado, la distribución por edad sugiere que el sistema serotoninérgico continúa en desarrollo durante la adolescencia y que inicia un decaimiento regionalmente específico conforme el individuo envejece. Estos resultados sugieren que las variaciones en la distribución del SERT por edad podrían explicar las diferencias en la respuesta al tratamiento con los ISRS y que las edades más vulnerables a los efectos del estrés agudo son las juveniles.

INDICE DE ABREVIATURAS

SLI	Septum lateral intermedio
5HT	Serotonina
BLA	Núcleo basolateral de la amígdala
CPF	Corteza prefrontal
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DRD	Núcleo dorsal del rafe dorsal
E ₂	Estradiol
HCA3	Región CA3 hipocampal
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHG	Eje Hipotálamo-hipófisis-gonadal
Ir- SERT	Inmunoreactividad al SERT
ISRS	Inhibidores Selectivos de la recaptura de la serotonina
MAO	Mono-amino oxidasa
NF	Nado forzado
PNF	Prueba de nado forzado
SERT	Transportador de la serotonina
SLI	Septum lateral intermedio
T	Testosterona
TRC	Antidepresivos tricíclicos
GABA	Acido gamma-aminobutírico

INDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.
2.1	Modelo fisiopatológico de la depresión (Zandio y cols., 2002)	8
2.2	Modelo de desinhibición del impulso neuronal (Stahal, 1998)	10
2.3	Representación del eje HHA (Lupien y Mc Ewen, 2009)	14
2.4	Conductas desplegadas durante la PNF	20
2.5	Esquema de la región amigdalina (Purves y cols., 2004)	26
2.6	Núcleos del rafe (Purves y cols., 2004)	26
2.7	Mecanismo CRH. Conductas activa y pasiva (Cryan y Lucky, 2007)	27
2.8	Formación hipocampal (Purves y cols., 2004)	28
2.9	Esquema de la corteza prefrontal (Purves y cols., 2004)	29
2.10	Esquema de la estructura del SERT (Zhou y cols., 1996)	31
6.1	Diagrama del diseño experimental	37
6.2	Región prelímbica de la corteza prefrontal (Páxinos y Watson, 1998)	40
6.3	Región intermedia del septum lateral (Páxinos y Watson, 1998)	41
6.4	Núcleo basolateral de la amígdala(Páxinos y Watson, 1998)	42
6.5	Región CA3 del hipocampo ventral posterior(Páxinos y Watson, 1998)	43
6.6	Núcleos dorsales del rafe dorsal (Páxinos y Watson, 1998)	43
6.7	Obtención de la fluorescencia de fondo	47
6.8	Histograma de fluorescencia	48
7.1	Resultados de la preprueba en ratas juveniles	52
7.2	Inmovilidad en ratas juveniles preprueba/prueba	53
7.3	Resultado de la PNF en todos los grupos de edad	55
7.4	Histología general de la CPF	56
7.5	Histología general del SLI	56
7.6	Histología general de BLA	57
7.7	Histología general de HCA3	57
7.8	Histología general de DRD	57
7.9	Panel de fotomicrografías de cortes en ratas prepúberes	59
7.10	Distribución del SERT por edad	60
7.11	Distribución del SERT por región	61
7.12	Efecto del estrés por nado sobre los niveles del SERT	62

7.13	Efecto del estrés y la edad sobre los niveles del SERT	63
7.14	Efecto del NF sobre los niveles del SERT en SLI y DRD	64
7.15	Fotomicrografías del septum de ratas prepúberes	65
7.16	Fotomicrografías del septum de ratas puberales	66
7.17	Fotomicrografías de DRD de ratas puberales	66
7.18	Distribución del SERT por edad y región	67

ANTECEDENTES

2.1 DEPRESIÓN

La depresión es un trastorno afectivo caracterizado por un decaimiento del estado de ánimo, sentimientos de tristeza y culpa, disminución de la capacidad para experimentar placer, enlentecimiento psicomotor, desesperanza e ideas suicidas.

Se han establecido diversos criterios para describir de manera más precisa este trastorno. Dos de los clasificadores más influyentes en el campo de la psiquiatría son el Manual Diagnóstico y Estadístico de las Enfermedades Mentales (DSM-IV-TR, 2002) de la Asociación Psiquiátrica Americana (APA) y el acordado por la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) en su clasificación de trastornos mentales CIE 10. La depresión incluye sintomatología emocional, afectiva, fisiológica y cognitiva, como disminución de la atención y concentración, pérdida de la confianza en sí mismo, sentimientos de inferioridad, ideas de culpa y de ser inútil (incluso en los episodios leves), una perspectiva sombría del futuro, pensamientos y actos suicidas o de auto-agresiones y trastornos del sueño (WHO, 2007). El DSM-IV-TR (APA, 2002) considera necesaria la presencia de uno de dos síntomas como criterio para establecer un episodio depresivo mayor: la presencia de un estado de ánimo depresivo o bien, la pérdida de interés o de la capacidad para el placer. A su vez, el trastorno depresivo mayor se establece por la presencia de al menos un episodio depresivo mayor.

La depresión es una enfermedad que ha adquirido importancia a nivel mundial, ya que se ha evaluado que del 2 al 5% de la población del orbe padece esta enfermedad, con una prevalencia de hasta el 15% a lo largo de la vida, existiendo como principal riesgo el suicidio, el cual asciende a más del 10% entre los pacientes hospitalizados por depresión (Bylund y Reed, 2007). La OMS proyecta que para el año 2020, la depresión será la segunda enfermedad discapacitante, sólo atrás de las enfermedades cardíacas (Murray y López, 1997). Se estima que los costos económicos de este padecimiento, ascienden, sólo en Estados Unidos, a 70 billones de dólares anuales (Bylund y Reed, 2007).

La depresión provoca un deterioro psicosocial que repercute en la productividad laboral, así como en las relaciones personales, dado que esta enfermedad es motivo de

estigmatización que lleva a la discriminación de los enfermos y sus familias (Belló y cols., 2005).

En el caso de la depresión infantil, se ha estimado una prevalencia de 0.4 a 3% en niños de 0-12 años de edad, y de 3.3 a 12.4% en adolescentes de 13 a 18 años (Malkesman y Weller, 2009; Birmaher y cols., 1996). A su vez, en el otro extremo de la población, las estadísticas en Estados Unidos muestran para los ancianos una prevalencia de entre 22%, y hasta 46% en mayores de 65 años que viven en asilos o en hospitales y que cursan con otras enfermedades propias de la vejez (Reynolds III y Kupfter, 1999). En mayores de 50 años, se ha considerado que esta psicopatología ocupa el decimoquinto lugar en la lista de enfermedades con mayor prevalencia (Fenter y cols., 2006).

En Estados Unidos, los ancianos poseen la mayor tasa de suicidios. Tan solo en mayores de 85 años es del 0.067%, es decir 5.5 veces la tasa nacional que es de 0.012%. Además se ha calculado que del 60% al 75% de personas ancianas que cometen suicidio habían sido diagnosticadas con depresión (Reynolds III y Kupfter, 1999).

En México se encontró una prevalencia de la depresión en 2002 de 4.5% en la población general, 5.8% en mujeres y 2.5% en hombres, lo que revela una relación de 2:1 de forma similar a la reportada por la OMS (Belló y cols., 2005). De acuerdo con estos autores, la prevalencia de la depresión se incrementa con la edad y disminuye con el aumento de la escolaridad. Para 2002 la depresión en México ocupó un quinto lugar entre diversos trastornos afectivos, con una prevalencia del 3.3% alguna vez en la vida (Belló y cols., 2005).

La fisiopatología de los trastornos afectivos, entre ellos la depresión, se ha estudiado desde diferentes enfoques, y se ha considerado la implicación de varios niveles en los cuales se desarrolla este trastorno. De acuerdo a Zandio y cols., podemos considerar cuatro niveles en la fisiopatología de la depresión:

1. Molecular y genético
2. En la fisiología celular
3. En los sistemas neuronales
4. A nivel conductual (Zandio y cols., 2002)

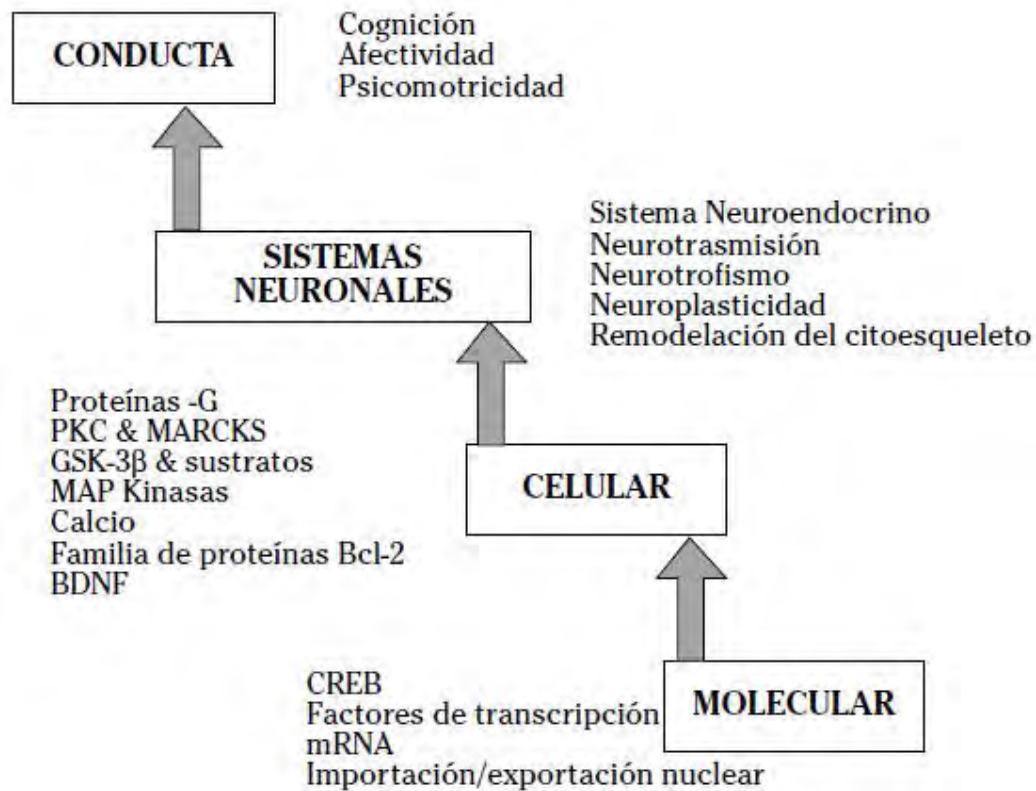


Figura 2.1 Cuadro presentado por Zandio y col. (2002) Modelo fisiopatológico de los trastornos afectivos. CREB: elemento unido a proteína en la respuesta a AMP cíclico (cAMP); PKC: proteincinasa C; GSK-3 β : enzima glucógeno sintasa cinasa 3 β ; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro.

En este enfoque integrador (figura 2.1) se pueden apreciar las relaciones que guardan los diferentes niveles de la fisiopatología de la depresión.

Uno de los niveles más estudiados es el de las alteraciones en los sistemas de transmisión neuronal, especialmente en lo que se refiere a los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico. La participación de la serotonina (5HT) en la regulación de estados emocionales, ha hecho de este sistema uno de los de mayor interés en relación con la depresión. El desarrollo de la teoría de las monoaminas, ha sido parte de este enfoque del nivel de los sistemas de transmisión. Esta teoría propone que la depresión es debida a deficiencias en las concentraciones de 5HT, dopamina y/o noradrenalina. El corolario de esta hipótesis ha sido que la regulación de los estados afectivos se adquiere con el incremento de la neurotransmisión de estas monoaminas y que la función de los

antidepresivos (AD) es justamente la elevación de sus concentraciones (Stahl, 1998). Los neurotransmisores son sintetizados en la terminal sináptica, almacenados en vesículas y liberados al espacio sináptico, donde pueden interactuar con diferentes receptores tanto pre- como post- sinápticos. De otra manera pueden ser recapturados por transportadores hacia el citoplasma presináptico y reutilizarse en la sinapsis o bien degradarse por enzimas, tales como la monoaminoxidasa (MAO).

Uno de los primeros mecanismos empleados por los AD de primera generación, es la inhibición de la MAO; por ello, algunos de los fármacos antidepresivos que actúan mediante este mecanismo son llamados inhibidores de la MAO (IMAO), como son por ejemplo la fenelzina, tranilcipromina e isocarboxacida. Algunos IMAOs inhiben el metabolismo de las monoaminas, de manera irreversible. Estos AD tienen por ello poca selectividad y producen un número significativo de efectos colaterales e interacciones farmacológicas, por lo que su uso como tratamiento es restringido.

Posteriormente fue descubierto el mecanismo empleado por fármacos tricíclicos (TCAs), como la amitriptilina, la imipramina y la desipramina, los cuales inhiben la recaptura de la 5HT así como la de la noradrenalina, con distintos grados de selectividad entre uno y otro. El mecanismo principal consiste en el bloqueo de los transportadores de monoaminas, es decir de las proteínas encargadas de regresar el neurotransmisor a la presinapsis, de tal forma que se incrementen las concentraciones de dichos neurotransmisores en la sinapsis. Sin embargo, estos AD tienen acción sobre otro tipo de receptores como el H1 (receptor de histamina), lo cual es causa de incremento de peso y somnolencia; el receptor M1 (efectos anticolinérgico/antimuscarínico), lo cual es causa de constipación, visión borrosa, boca seca y somnolencia; el receptor adrenérgico α_1 , lo cual causa mareos, decremento de la presión sanguínea y somnolencia. A dosis elevadas, los TCAs inhiben canales de sodio, lo cual puede ser motivo de convulsiones y arritmias cardíacas, potencialmente letales (Stahl, 1998).

Este conjunto de limitaciones de los primeros AD, ha llevado a la búsqueda de fármacos con mecanismos cada vez más selectivos. Es el caso de los inhibidores selectivos de la recaptura de determinado neurotransmisor, como la 5HT, la noradrenalina y la dopamina.

Uno de los principales reguladores de la acción de la 5HT es su transportador (SERT), una proteína transmembranal cuyo papel es la recaptura de la 5HT extracelular. Por ello ha sido un importante blanco farmacológico. Los fármacos que

bloquean selectivamente al SERT son llamados inhibidores selectivos de la recaptura de la 5HT (ISRS), entre ellos la fluoxetina y el citalopram, los cuales han tenido una mayor aceptación debido a sus bajos efectos secundarios.

El principal mecanismo de acción de los ISRS es el bloqueo del SERT, sin embargo se complementa con la desinhibición de la neurotransmisión de 5HT. El primer paso consiste en bloquear al SERT, lo cual incrementa la 5HT, principalmente en el área somatodendrítica (ver figura 2.2). La consecuencia es la desensibilización de los receptores presinápticos $5HT_{1A}$, también conocidos como autorreceptores, por su papel regulador en la liberación de las vesículas serotoninérgicas de la misma neurona (ver figura 2.2) (Stahl, 1998).

Esta desensibilización de los autorreceptores elimina la inhibición que ejercían sobre el flujo del impulso neuronal hacia la terminal axónica, por lo cual se incrementa la liberación de vesículas 5HT hacia el espacio sináptico. Este proceso puede explicar que los ISRS no tengan un efecto terapéutico inmediato. Finalmente, el incremento de 5HT en el espacio sináptico genera una desensibilización de los receptores 5HT postsinápticos, lo cual puede explicar a su vez, el desarrollo de la tolerancia a algunos efectos colaterales agudos de los ISRS (Stahl, 1998).

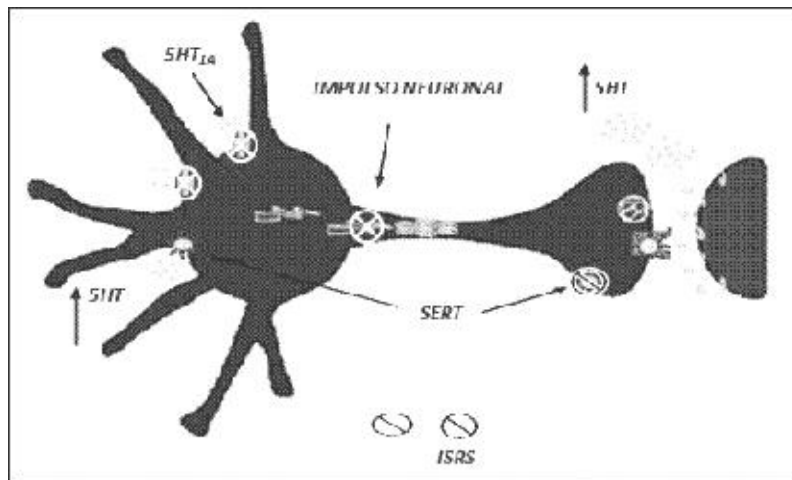


Figura 2.2 Desinhibición del flujo del impulso neuronal. Explicación en el texto. (Modificado de Stahl, 1998)

Esta desinhibición de la neurotransmisión de 5HT puede ocurrir en diferentes vías serotoninérgicas, dependiendo de la región neuroanatómica donde actúen los ISRS,

produciendo diferentes efectos terapéuticos, por lo cual, estos fármacos se emplean en diferentes trastornos emocionales, como la bulimia, el trastorno de pánico o el trastorno obsesivo compulsivo (Stahl, 1998).

Una desventaja de los ISRS es la falta de eficacia para tratar diferentes tipos de depresión y para diferentes grupos de edad (Bylund y Reed, 2009; Malkesman y Weller, 2009; Mamdani y cols., 2000). Además, algunos efectos colaterales que se presentan son ansiedad, trastornos de sueño, disfunción sexual y alteraciones gastrointestinales, los cuales han sido asociados con la interacción de la 5HT y los fármacos con los receptores postsinápticos 5HT (Stahl, 1998).

La participación de la 5HT no solo en aspectos emocionales, sino en aspectos del desarrollo, han abierto una línea de estudio en cuanto al papel de la regulación de la 5HT en relación con la edad y el desarrollo.

2.2. ESTRÉS

El estrés es la respuesta fisiológica de un organismo ante situaciones adversas. Se trata de un mecanismo de adaptación que permite maximizar la energía disponible, facilitando la movilización de reservas energéticas de funciones menos vitales ante una crisis inminente (Gold y Chrousos, 2002). Los estímulos provocados por los estresores rompen con la homeostasis del organismo, ante lo cual existe una respuesta corporal que la restaura, la cual es denominada respuesta alostática (Sterling y Eyer 1988; McEwen, 1998). Esta se refiere a los procesos activos por los cuales el cuerpo responde ante eventos intensos constantes, con la finalidad de lograr un equilibrio homeostático. El desequilibrio homeostático puede llegar a tener consecuencias de largo plazo, especialmente para la restauración del estado basal, lo cual implica un costo alostático que puede variar entre los organismos, dado que existen etapas e individuos más vulnerables y otros más resistentes al estrés (McEwen, 2008). La respuesta de estrés puede estar determinada por diferentes factores, entre ellos el tipo y características del estresor, las variables individuales del organismo y su experiencia con el estresor, así como las particularidades sociales. De acuerdo con Anisman y Matheson (2005), los estresores pueden clasificarse en:

Procesivos: Cuando existe de por medio una evaluación de orden superior a nivel cortical, y según su origen pueden ser:

- Neurogénicos: Estresores físicos, de origen externo.
- Psicogénicos: Estresores psicológicos, de origen interno.

Sistémicos: Son alteraciones fisiológicas producto de diferentes enfermedades, a nivel metabólico, cardiovascular, respiratorio, etc.

El estresor promueve una cascada de eventos neuroquímicos con valor adaptativo, que pueden variar según sus características, como son la cronicidad, la intermitencia, la predictibilidad, la incertidumbre que genere o la posibilidad de que el estresor sea controlable.

Experimentalmente se usan distintos tipos de estresores de acuerdo al modelo, como pueden ser, estrés agudo o crónico, variable o fijo, moderado o intenso, etc. Las

características del organismo son de gran importancia para evaluar la respuesta a un estresor. Son considerados factores como la edad, género, especie y raza, así como los lazos sociales y el soporte del grupo al que pertenece el sujeto sometido a estrés. Las características individuales también juegan un papel importante en la respuesta al estrés. Se trata de rasgos de personalidad, autoestima, herramientas para afrontar la situación, resistencia y tolerancia al estrés, etc. En el caso de los roedores existen cepas más susceptibles a los efectos del estrés, como por ejemplo la cepa Wistar Kyoto (Paré 1993). El soporte social suele ser muy importante, en especial en ratones, donde existe una jerarquización muy marcada. El sexo de los animales también es determinante, ya que se ha encontrado mayor susceptibilidad al estrés en ratas hembra (Cornil y cols., 2006) de manera similar a lo reportado en humanos. Asimismo, la edad participa en la diferente respuesta ante el estrés, encontrándose que los individuos más vulnerables son los senectos (Anisman y Matheson, 2005; Herrera-Pérez y cols., 2008)

La respuesta fisiológica ante un evento estresante inicia en el hipotálamo, el cual procesa la señal y secreta arginina-vasopresina (AVP) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que viajan a través del sistema porta hipofisiario hacia la glándula pituitaria. Esta glándula secreta la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) que es enviada por medio del torrente sanguíneo hacia la corteza suprarrenal, donde se producen dos importantes hormonas esteroideas: el cortisol en humanos o corticosterona en roedores, ambos del grupo de los glucocorticoides (GC), así como la dehidroepiandrosterona (DHEA), un andrógeno. Los GC interaccionan con receptores a glucocorticoides (GRs) que se encuentran ubicados en el núcleo paraventricular del hipotálamo, la hipófisis, los núcleos dorsales del rafe, la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala; así mismo, los GC interactúan con receptores a mineralcorticoides (MRs), especialmente en el hipocampo (Lupien y cols., 2009).

Por su parte, la médula suprarrenal secreta catecolaminas, como la adrenalina y la noradrenalina, responsables de efectos fisiológicos del estrés, tales como:

- Aumento de la presión arterial.
- Aumento del aporte sanguíneo al cerebro.
- Aumento de la tasa cardíaca.
- Incremento en la estimulación del músculo esquelético.

- Aumento en la liberación de ácidos grasos, colesterol y triglicéridos.
- Incremento de la liberación de opioides como las endorfinas y las encefalinas.

Una parte de la interacción de los GC con los MRs y GRs en hipocampo, hipotálamo e hipófisis, es la que bloquea la liberación de CRH, estableciendo una retroalimentación negativa del circuito. Este circuito es conocido como el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) (Figura 2.3).

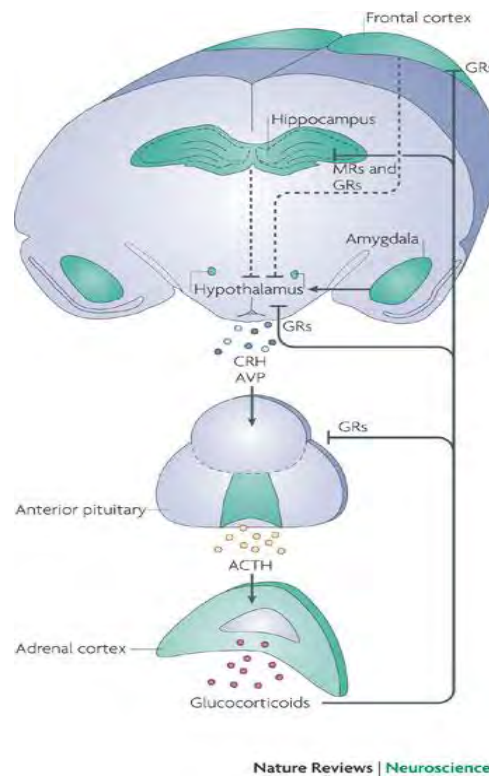


Figura 2.3 Representación del eje HHA (Lupien y cols., 2009)

Los GC son hormonas esteroides con funciones importantes en la regulación del hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal. Sin embargo, la presencia excesiva y sostenida de GC en estas regiones, tiene consecuencias neurotóxicas (Cameron y cols. 1998; McEwen, 2005; Lupien y cols, 2009)

Una de las primeras pruebas diagnosticas que relacionó los elevados niveles de GC con la depresión fue la prueba de supresión por dexametasona (Dxm). La Dxm es un glucocorticoide sintético con afinidad por los GR y MR, y por ello puede bloquear la

actividad del eje HHA mediante el mecanismo de retroalimentación negativa. Suministrando Dxm en la noche, se observó que sujetos normales suprimían la liberación de cortisol durante al menos 24 horas, mientras que sujetos deprimidos mantenían alta secreción diurna de cortisol, de lo cual se dedujo una relación entre la depresión y la hipercortisolemia. Entonces, si el estrés eleva los niveles de cortisol, este puede ser un factor que desencadene la depresión. Una de las consecuencias del estrés prolongado o intenso aunque de corta duración, es la exacerbación o desarrollo de trastornos afectivos, tales como la depresión. Algunos tipos de depresión pueden ser precipitados por un evento severo e intenso, como por ejemplo la depresión por estrés postraumático (PTSD) o por eventos de estrés moderado frecuente, como el estrés psicosocial (Charney, 2004; Young y Korszun, 2010).

Los efectos neurotóxicos de los GC se han reportado en algunas regiones donde se encuentran importantes concentraciones de receptores a GC, como son el hipocampo, el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y los núcleos dorsales del raquídeo (DRD) (García y cols., 2004), así como en la amígdala y la corteza prefrontal. Estas regiones parecen ser las más vulnerables a dichos efectos neurotóxicos. Se ha encontrado que la administración de corticosterona en roedores afecta la neurogénesis hipocampal y reduce la neuroplasticidad (Cameron y cols., 1998). Se ha propuesto que los GC incrementan las concentraciones de citocinas, especialmente de la interleucina 1-Beta, la cual reduce los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y como consecuencia disminuye la neurogénesis. Asimismo, se ha encontrado que los GC afectan la sobrevivencia neuronal a través de aminoácidos excitatorios (como el glutamato) y repercute en la formación del GABA, receptores NMDA y opioides endógenos (Gould y cols., 1997). También se ha reportado que elevados niveles de GC reducen la arborización dendrítica en el hipocampo y la corteza prefrontal (McEwen, 1999; Sousa y cols., 2000).

Concentraciones elevadas o prolongadas de GC en el PVN afectan la expresión del RNAm de los dos tipos de receptores conocidos a CRH (CRH-1 Y CRH-2), alterando de esta manera la activación adecuada del eje HHA (Charney, 2004) La consecuencia directa de este efecto es el deterioro de la respuesta neuroendocrina, generando una desregulación del eje HHA. Este desajuste se ha asociado con la generación de enfermedades tales como la hipertensión, la osteoporosis, la inmunosupresión, la resistencia a la insulina, problemas de coagulación,

arterioesclerosis y alteraciones cardiovasculares (Charney, 2004). Diferentes trabajos han mostrado una estrecha relación entre el estrés y la depresión, mediante alteraciones del sistema límbico y la generación de conductas tipo depresivas en modelos de estrés, como el de estrés crónico moderado (CMS) y la prueba de nado forzado (PNF) (Willner, 1997; Cryan y cols., 2005)

La teoría neurotrófica sostiene que una disminución de factores neurotróficos (como el factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF) origina alteraciones morfofuncionales en diferentes áreas cerebrales, las cuales dan lugar durante a la depresión, alteraciones que además podrían estar relacionadas con la desregulación del eje HHA provocada por el estrés. Esta teoría propone que los trastornos afectivos reflejan fallas en la función de redes neuronales importantes. (Mc Queen y cols. 1999; Castrén, 2007; Callado y cols., 2009) Es una de las razones para sostener que existen grupos más vulnerables a la depresión y el estrés, y otros con mayor capacidad para contener incluso al estrés extremo, con mínimas consecuencias psicopatológicas (Charney, 2004) Esta teoría argumenta la existencia de un importante número de neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas que han sido vinculadas con la respuesta psicobiológica al estrés y con trastornos psiquiátricos generados a largo plazo, ya que juegan un papel de mediadores en los circuitos y mecanismos asociados con la regulación de la recompensa, el miedo condicionado y la conducta social, constituyendo un perfil neuroquímico de resiliencia psicobiológica con valor adaptativo al estrés extremo (Charney, 2004). Por esta razón, alteraciones en el eje HHA han sido extensamente ligadas con las alteraciones de los sistemas neuroquímicos relacionados con la depresión, de manera que existen paradigmas (como el paradigma de Porsolt en la PNF), que sugieren que el estrés puede generar síntomas de tipo depresivo como es la conducta de inmovilidad relacionada con la desesperanza (Porsolt y cols., 1977; 1978)

2.3 MODELOS ANIMALES

Un modelo es una preparación experimental que permite simular y estudiar una condición en diferentes especies (Markou y cols., 1994; Markou y cols., 2009). Los estudios sobre la depresión han requerido la elaboración de modelos animales que permitan una reconstrucción etiológica y predictiva. Tales modelos requieren cumplir con una serie de criterios que aseguren que el modelo representa objetivamente el trastorno. Se han considerado los siguientes criterios de validez:

- Validez de apariencia: considera la existencia de una similitud fenomenológica entre el modelo y el trastorno. El modelo animal de depresión debe simular al menos uno de los síntomas del trastorno, como la anhedonia, la desesperanza o el abatimiento motor

- Validez predictiva: Es decir que el modelo responda a los tratamientos antidepressivos, tal y como sucede en los humanos, de manera sensible y específica.

- Validez de constructo o hipotética: Se refiere a que las hipótesis que expliquen el trastorno, sean también fundamento del modelo.

- Validez etiológica: Hace referencia a que las causas del desorden humano alteren del mismo modo la conducta en el modelo (Anisman y Matheson, 2005).

Algunos autores consideran que los modelos de estrés pueden clasificarse de acuerdo a su intensidad e intermitencia (Anisman y Matheson, 2005), de manera que se pueden considerar agudos o crónicos.

Los modelos agudos más empleados en la depresión han sido la prueba de nado forzado (PNF) en sus diferentes versiones, la prueba de suspensión de la cola (TST) y la prueba de alimentación forzada en un medio novedoso (Frazer y Morilak, 2005).

En cuanto a los modelos crónicos más empleados, se encuentran el estrés crónico moderado (CMS, por sus siglas en inglés), el estrés crónico variable (CVS, por sus siglas en inglés) y el estrés prenatal. Estos modelos tratan de simular los ambientes cotidianos en humanos (Anisman y Matheson, 2005, Herrera-Pérez y cols., 2008;).

Los modelos agudos como la PNF y la TST simulan como principal síntoma la desesperanza, representado en cada caso por la inmovilidad desarrollada ante un estresor sin posibilidad de escape. Ante una amenaza, los animales desarrollan conductas enfocadas a escapar, contender o resolver la situación. Se trata de conductas activas. A medida que el animal encuentra que la condición del estresor es inescapable, desarrolla una conducta pasiva, la inmovilidad, interpretada como el autoabandono y la desesperanza, propios del estado de ánimo deprimido (Porsolt y cols., 1977; 1978)

Por su parte, el modelo de estrés crónico simula la anhedonia, a través del consumo de una solución de sacarosa. Se ha encontrado que un porcentaje de animales sometidos a CMS reducen de manera significativa el consumo de sacarosa, interpretado como una disminución de la capacidad para experimentar placer (Willner, 1997). Asimismo, existe un porcentaje de individuos que no desarrollan anhedonia, lo cual indica que existe resistencia al estrés crónico moderado (Herrera-Pérez y cols., 2008)

Hasta el momento se desconoce un modelo que integre toda la sintomatología de la depresión, ya que por un lado existen diferentes tipos de depresión y por otro lado aun son desconocidos varios aspectos de la etiología y fisiopatología de este trastorno. Sin embargo, uno de los más empleados actualmente en la investigación para la exploración de nuevos fármacos con potencial antidepresivo y para la elucidación de los mecanismos neurales que participan en la depresión, es la PNF.

2.4 PRUEBA DE NADO FORZADO (PNF)

Este modelo fue propuesto por Porsolt, en 1977, para estudiar la conducta desplegada por roedores sometidos a estrés agudo. Actualmente es uno de los más empleados para estudiar la depresión, y uno de los más sencillos de estandarizar en los laboratorios. El modelo ha sufrido modificaciones a través de los últimos años. Una de las propuestas más aceptadas es la de Detke y colaboradores (1995), en la que se modificó el método de registro de las conductas, lo que permitió la detección de los efectos antidepresivos de los ISRS.

La PNF consiste en dos sesiones de nado forzado, separadas por un periodo de 24 horas. La primera sesión es de 15 minutos de duración; consiste en colocar a la rata en un cilindro de vidrio con agua a una profundidad que no permite que los animales escapen. Esta sesión se denomina preprueba y tiene como finalidad someter al animal a una situación de estrés agudo inescapable, en la que gradualmente deja de realizar conductas de esfuerzo y empieza a prevalecer la conducta de inmovilidad, que consiste en los movimientos mínimos que le mantienen a flote. Veinticuatro horas después se lleva a cabo la sesión de prueba, bajo las mismas condiciones, pero con una duración de 5 min. En esta segunda sesión es posible observar el paradigma del modelo de Porsolt: la rata estresada desarrolla inmovilidad en la prueba y reduce las conductas de escape.

De acuerdo con el paradigma de Detke y cols. (1995) en la PNF se analizan tres tipos de conductas (figura 2.4):

- Inmovilidad: Son los movimientos mínimos necesarios de la rata para mantenerse a flote.
- Nado: Son movimientos activos de braceo, con desplazamiento alrededor del cilindro
- Escalamiento: Es una conducta activa dirigida contra las paredes del cilindro en intentos de trepado de las paredes del estanque, cuyos movimientos severos generan burbujeo.

La PNF posee una validez de apariencia al simular el autoabandono y desesperanza, propios del ánimo deprimido, observados en el desarrollo de inmovilidad. Según Porsolt, “la inmovilidad refleja un decaimiento del estado de ánimo en la rata, el cual es selectivamente sensible a tratamientos antidepresivos” (Porsolt, 1978)

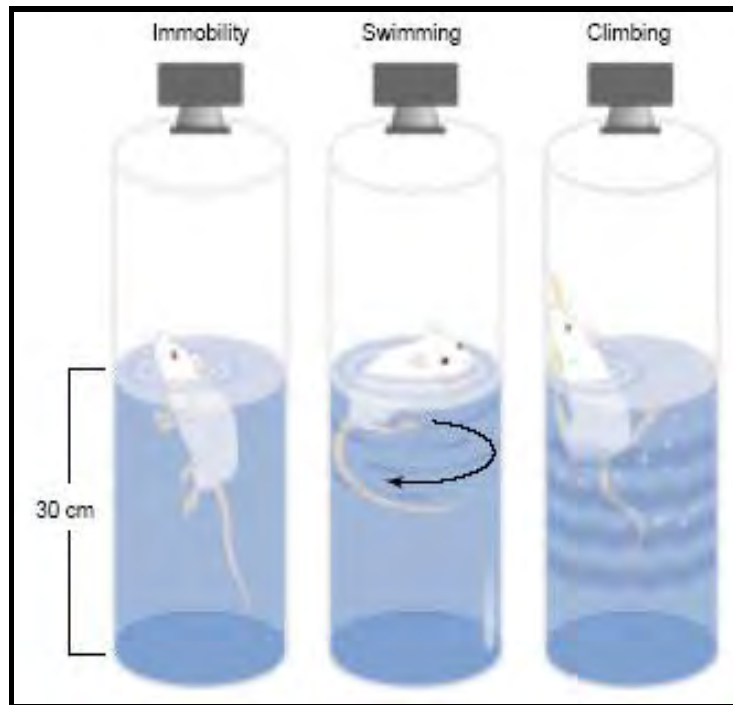


Figura 2.4 Conductas desplegadas durante la PNF: inmovilidad, nado y escalamiento

La propuesta de Porsolt indica que la inmovilidad en la PNF es parecida a las conductas de auto-abandono de los sujetos deprimidos. Aunque esta interpretación es controversial, se ha demostrado a lo largo de 30 años que los tratamientos antidepresivos reducen la conducta de inmovilidad de forma selectiva, y en una relación de potencia semejante a la reportada para los humanos. Asimismo, la conducta de inmovilidad es resultado del sometimiento a una condición de estrés agudo inescapable, por lo cual el modelo cumple con el criterio de validez hipotética y etiológica.

Por otro lado, la PNF ha mostrado una gran sensibilidad para mostrar el potencial antidepresivo (AD) de diferentes fármacos, con una importante validez predictiva en la

respuesta a tratamientos. El grado de sensibilidad es tal que es posible distinguir entre fármacos AD de los que no lo son. Asimismo, esta prueba permite conocer el mecanismo neuroquímico que subyace la acción de los AD: el incremento de la conducta de nado está asociada con la activación del sistema serotoninérgico, ya que todos los ISRS la estimulan, mientras que el incremento de la conducta de escalamiento lo está con los sistemas catecolaminérgicos (noradrenérgico y/o dopaminérgico), dado que responde a fármacos de efecto selectivo sobre la transmisión de catecolaminas, como la desipramina y la reboxetina (Detke y cols., 1995; Cryan y cols., 2005).

La PNF ha sido útil en la distinción de variables de género, edad, cepa, condición hormonal e incluso región cerebral. Trabajos que han comparado diferencias sexuales han demostrado que las ratas hembra presentan mayor reactividad al estrés por nado forzado y pueden desarrollar más inmovilidad (López-Rubalcava y cols., 2009; Estrada-Camarena y cols., en revisión). Investigaciones por edad muestran que ratas mayores a 21 días posnatal (PN) son sensibles a la PNF, y que las conductas observadas durante la prueba se estabilizan a partir de los 26 días PN (Abel, 1993). En otra investigación realizada en nuestro laboratorio, se encontró que ratas prepuberales macho (32 días PN) también muestran las conductas activas a la par de la inmovilidad (Martínez-Mota y cols., 2010, en revisión). Por otro lado se ha reportado que existen cepas con mayor sensibilidad al estrés por nado forzado (NF), como es el caso de la cepa de ratas Wistar Kyoto (Rittenhouse y cols, 2002). Otras investigaciones reportaron que el estrés por NF se asociada con un decremento en los niveles de 5HT extracelular en el septum lateral y la amígdala, y con un incremento de éstos niveles en el estriado (Kirby y cols., 1995); finalmente, trabajos sobre funcionalidad mostraron que la PNF reduce la tasa de disparo neuronal en septum lateral (Contreras y cols., 2004)

La sensibilidad, especificidad, alta validez y relativa sencillez de la PNF han hecho de ésta una herramienta muy empleada en la exploración de nuevos fármacos, así como en la comprensión de la fisiopatología de la depresión.

2.5 EDAD Y DEPRESIÓN

Un conjunto de cambios cognitivos, conductuales y emocionales están asociados con la edad. En la infancia y juventud estos procesos están relacionados particularmente con el desarrollo del hipocampo, la amígdala y los lóbulos frontales (Lupien y McEwen, 2009). En la vejez ocurren procesos normales y patológicos que determinan algunos de estos cambios. Se ha mencionado que la prevalencia de la depresión varía con la edad y el género (Belló y cols., 2005).

Diferentes estudios consideran que las edades del humano pueden dividirse en prenatal, posnatal, niñez, adolescencia, edad adulta y vejez. En la rata se han realizado estudios que abarcan todas las etapas de la vida, desde la prenatal hasta la vejez. La capacidad reproductiva de estos roedores, junto con su fácil mantenimiento y relativa rapidez para llegar a la vejez ha favorecido su uso en la investigación. Algunos autores consideran que la adolescencia en la rata puede dividirse en tres etapas: prepuberal (21-34d), adolescencia media (34-46d) y adolescencia tardía (46-59d) (Lupien y cols., 2009), edades que no varían entre cepas de rata. Dado que la PNF se ha estandarizado para ratas mayores a 21 días (Detke, 1995; Bylund, 2007; Rubalcava y cols., 2009) en este trabajo consideramos solamente las edades prepuberal (24-32d), adolescencia media o puberal (40-41d), adulto joven (60-90d) y adulto de mediana edad (12-13 meses).

Diferentes estresores en ratas de edad prenatal y posnatal han mostrado tener repercusiones de largo plazo en etapas posteriores de la vida de los animales, tales como hiperactividad del eje HHA e hipercorticosteronemia, así como alteraciones de la conducta, como son la predisposición al consumo de alcohol y drogas de abuso, conducta antisocial, déficit de atención e hiperactividad, trastornos del sueño, ansiedad y depresión (Bathia y Bathia, 2007; Birmaher y cols., 1996; Bylund y Reed, 2007). Estos efectos han sido explicados por los efectos neurotóxicos de los GC sobre el desarrollo de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico, sobre la neurogénesis hipocampal y la plasticidad cerebral en general (Cameron y cols., 1998; Sousa y cols., 2000; Castrén y cols., 2007).

Algunos trabajos enfocados a la depresión y el estrés en niños y adolescentes, han demostrado que estos grupos de edad pueden sufrir desajustes en el eje HHA ante eventos traumáticos como son la deprivación materna, la violencia o el abuso, eventos que pueden derivar en efectos de largo plazo, tales como propensión al consumo de

drogas de abuso, agresividad y depresión, entre muchos otros trastornos (Birmaher y cols., 1996; Bylund y Reed, 2007). Algunos autores consideran que el cerebro del adolescente aún no está totalmente maduro (Bylund y Reed, 2007), ya que se conoce que regiones como el lóbulo frontal y el hipocampo continúan en desarrollo (Lupien, 2009).

En ratas adolescentes se ha observado una alta respuesta del eje HHA caracterizada por una liberación prolongada de GC en comparación con adultos, mostrando una incompleta maduración del asa de retroalimentación negativa de este eje (Lupien y McEwen, 2009). Un trabajo con ratones en adolescencia media, mostró que estos tienen mayores niveles basales de corticosterona, y que tras 15 minutos de estrés agudo por restricción, el incremento de esta hormona es superior a los niveles mostrados en animales adultos (Nirupa, 2007), confirmando que los adolescentes pueden ser más susceptibles al estrés agudo.

Por otra parte, estudios sobre anhedonia utilizando el modelo de CMS, y el consumo de sacarosa como principal parámetro, mostraron que 35% de las ratas macho jóvenes (3-5 meses) desarrollaron anhedonia tras ser sometidas a un modelo de estrés crónico (CMS), mientras que en las ratas de mediana edad (12-15 meses) fue el 73% (Herrera-Pérez y cols., 2008), lo cual podría sugerir que la incapacidad de experimentar placer inducida por estrés está asociada con los cambios neuroendocrinos desencadenados por la vejez. En una investigación que midió los sitios de unión de paroxetina (un ISRS) marcada con tritio, se reportó que los sitios de recaptura de 5HT en hipocampo de rata se incrementan significativamente con la madurez y decaen con la vejez (Arora y cols., 1993) Estos datos en conjunto permiten sugerir que la vejez es un factor de vulnerabilidad al estrés y la depresión

Diversos estudios han mostrado que la infancia temprana y la vejez son edades particularmente sensibles al estrés (Lupien y cols, 2009; Herrera-Pérez y cols., 2008) en las cuales éste puede tener consecuencias a largo plazo, especialmente en cuanto a trastornos afectivos se refiere, tales como la depresión. Por un lado se mencionó que la prevalencia de la depresión en niños aumenta de manera importante hacia la adolescencia (Birmaher y cols., 1996; Malkesman y Weller, 2007). Además, de manera general la incidencia de la depresión es mayor en personas de edad avanzada que en jóvenes (Blazer 1980; Reynolds III and Kupfer, 1999).

Recientemente se ha esclarecido la existencia de diferencias significativas en la efectividad de los diferentes tratamientos antidepresivos en niños y adolescentes comparados con adultos (Birmaher y cols., 1996; Murrin, 2007). La población de menores responde con mejor eficacia a los inhibidores selectivos de la recaptura de 5HT (ISRS), y la respuesta es más pobre cuando son tratados con antidepresivos tricíclicos (Malkesman y Weller, 2009; Bhatia y Bhatia, 2007) lo que habla de factores que determinan un perfil especial de depresión en la infancia y adolescencia. Asimismo, no todos los ISRS pueden ser administrados a la población pediátrica, ya que según estudios recientes, el uso de algunos de estos fármacos constituye un factor de riesgo en la conducta suicida de adolescentes (Malkesman y Weller, 2009). Por lo tanto, tenemos a una población extremadamente vulnerable en la que una psicopatología de inicio temprano podría dar lugar a otras de mayor severidad, o predisponer a psicopatologías en la edad adulta (Lupien y cols., 2009).

Por otro lado, en diversas publicaciones se ha reportado que la población anciana sufre un deterioro en la respuesta a los tratamientos antidepresivos, usualmente los mismos ISRS, aún cuando estos fármacos son los de más baja toxicidad para dicha población. De forma interesante, los ancianos se vuelven más lentos metabolizadores de fármacos, entre ellos los ISRS, así que a pesar de tener elevadas concentraciones sanguíneas del fármaco, los efectos antidepresivos se ven reducidos. Una de las posibles respuestas es que esta población presenta alteraciones en los sitios de unión a dichos antidepresivos, principalmente en la funcionalidad y expresión del SERT (Nelson y cols., 1995; Mamdani y cols., 2000).

2.6 ESTRUCTURAS ASOCIADAS AL ESTRÉS Y LA DEPRESIÓN

Sistema Límbico.

El término “límbico” fue acuñado para designar al conjunto de estructuras cerebrales asociadas con las emociones. Uno de los primeros circuitos asociados al control de las emociones fue el descrito por James Papez, que integraba una relación funcional del tálamo, el hipotálamo, la corteza y el hipocampo. Posteriormente se integró en un complejo anatómico denominado sistema límbico. Se trata de un conjunto de estructuras asociadas a funciones básicas en organismos inferiores de la escala filogenética de los vertebrados, mostrando un incremento en su complejidad en organismos con funciones cerebrales superiores (Purves y cols., 2004). En este trabajo se van a mencionar solamente algunas de las estructuras asociadas con la respuesta al estrés y la depresión.

Como se mencionó anteriormente, en respuesta a los estresores, la amígdala estimula la liberación de CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVA), que inicia la activación del eje HHA, resultando en la liberación de GC, cuyo blanco de retroalimentación son el mismo hipotálamo y la hipófisis, y los blancos de respuesta al estrés son principalmente: la amígdala, los núcleos dorsales del raquídeo, el septum lateral, la corteza prefrontal y el hipocampo.

La amígdala es un complejo anatómico situado en la parte antero medial del lóbulo temporal, rostral al hipocampo (Figura 2.5). Está compuesta por 3 regiones funcionales: la región medial, que mantiene conexiones con el bulbo y corteza olfativas; la región basolateral, que mantiene conexiones hacia las cortezas prefrontal del lóbulo frontal y asociativa del lóbulo temporal; las regiones central y anterior de la amígdala mantienen conexiones con el hipotálamo y el tallo cerebral, en particular con los núcleos del raquídeo. La amígdala recibe inervaciones del sistema sensorial, por lo que células de la amígdala responden a estímulos visuales, olfativos o auditivos. Se considera uno de los epicentros del sistema límbico, pues es el iniciador de diferentes respuestas, entre ellas la del estrés. Ha sido asociada con funciones en el procesamiento del miedo y la agresión (Lupien, 2009), control del tono simpático y la respuesta condicionada (Zandio, 2002). Activa tanto al eje HHA a través del estímulo de arginina vasopresina (AVP) en el hipotálamo, así como las vías autónomas del sistema nervioso,

responsables de la respuesta rápida, adrenérgica y noradrenérgica, vía médula suprarrenal. La amígdala “media tanto la expresión autónoma como la experiencia cognitiva de la emoción” (Iversen, S. et al, en Kandel, 2006, p992). Un trabajo de investigación demostró que una sesión de 30 minutos de nado forzado induce una disminución de las concentraciones extracelulares de 5HT en la región amigdalina, determinada por empleando microdiálisis en vivo (Kirby y cols., 1995)

Los núcleos de rafé son un conjunto de núcleos neuronales que se encuentran en la parte superior del tallo cerebral a lo largo del mesencéfalo y puente cerebral hacia la médula, ventrales al acueducto de Silvio. Está constituida por varias subregiones: dorsal, medial y ventral. En los núcleos del rafé es donde surgen las fibras serotoninérgicas que inervan la mayor parte del cerebro. Ha sido asociado con la regulación del sueño y la vigilia. La gran cantidad de proyecciones serotoninérgicas lo hace importante en la farmacología de la depresión y la ansiedad. En el rafé dorsal, existen proyecciones serotoninérgicas que inervan el septum lateral (Figura 2.6)

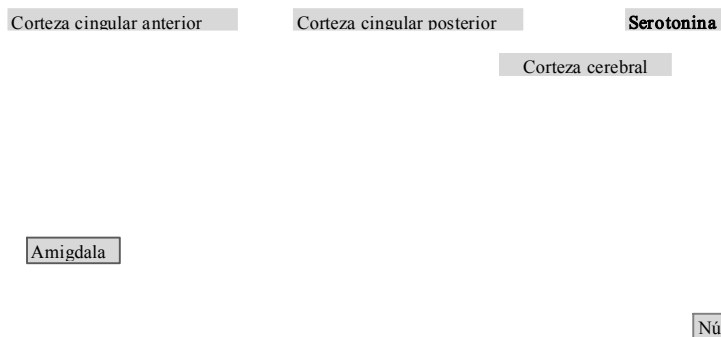


Figura 2.5. Esquema de corte transversal de cerebro humano, mostrando la región amigdalina en los lóbulos temporales (Purves, 2004).

Figura 2.6 Núcleos del Rafé en corte sagital en cerebro humano. Se muestran las proyecciones serotoninérgicas hacia importantes regiones del SNC (Purves, 2004).

El septum lateral es una región neuroanatómica situada entre los ventrículos laterales y el fornix, ventral al cuerpo calloso. También se divide en tres subregiones: dorsal, intermedio y ventral. La actividad del septum está asociada con las respuestas de alerta, miedo y agresión ante eventos adversos. Diferentes trabajos han confirmado que el

septum lateral media los efectos conductuales de diferentes antidepresivos o compuestos que no son estrictamente antidepresivos, pero que comparten acciones con estos, como la vasopresina, la progesterona y el estradiol (Stemmelin, 2005; Estrada-Camarena y cols., 2002; Contreras y cols., 1995). De hecho, en esta región se han encontrado células sensibles a estradiol (Purves y cols., 2004). La activación del septum es regulada negativamente por la 5HT, de manera que cuando disminuyen los niveles de este neurotransmisor, el septum se activa; mientras se mantiene un nivel alto de 5HT el septum lateral queda inhibido. Por esta razón ha sido considerado como el responsable de las conductas activa o pasiva ante estímulos estresantes (Cryan y cols., 2005).

En el primer caso, la exposición aguda al nado forzado estimula la liberación hipotalámica del CRH (Cryan y cols., 2005) que actúa sobre neuronas gabaérgicas en los núcleos dorsales del rafe, provocando la liberación de GABA, el cual inhibe a las neuronas 5HT que proyectan hacia el septum lateral; esto disminuye los niveles de 5HT en esta región y como consecuencia un incremento de la actividad del septum (Figura 2.7).

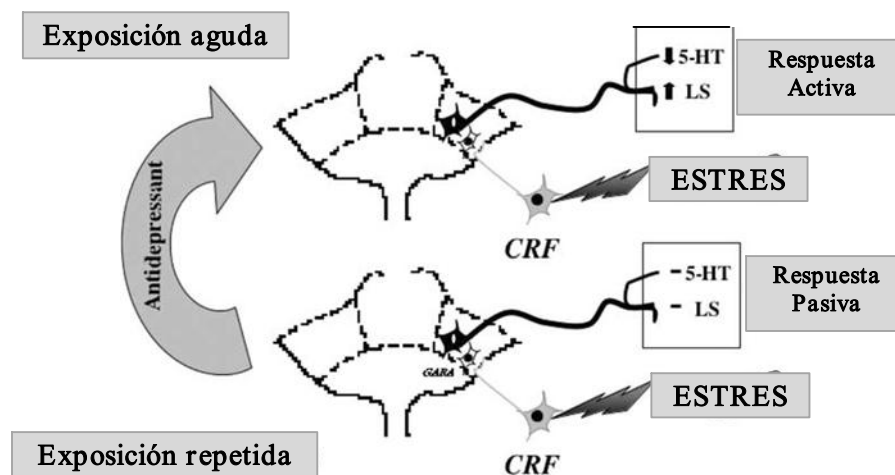


Figura 2.7 Esquema sugerido por Cryan y Lucki, para explicar el efecto diferencial del estrés por nado agudo y crónico mostrado en las conductas activa o pasiva durante el nado (Cryan y cols., 2005).

Lo anterior puede explicar la conducta activa observada durante la exposición inicial al nado. En contraste, la exposición repetida al nado, provoca la desensibilización de los mecanismos del CRH en el rafe dorsal, lo cual provoca la pérdida de la actividad inhibitoria, manteniendo continua la transmisión 5HT que inactiva al septum, por lo cual se muestra una conducta pasiva durante la prueba de nado forzado (Cryan y cols., 2005). Estudios en el septum lateral con la PNF, mostraron que el incremento de la tasa de disparo en esta región está asociado con el incremento en la motivación del animal para escapar en situaciones estresantes, mientras que la reducción de la tasa de disparo estaría asociado con la desesperanza (Contreras y cols., 2004)

Hipocampo

El hipocampo es una estructura de invaginación cortical en el interior del lóbulo temporal. Esta estructura mantiene estrecha continuidad con el giro dentado y el subículo, constituyendo la formación hipocampal. El hipocampo está formado por tres estratos celulares: células polimórficas gabaérgicas intrínsecas (interneuronas

Células piramidales

inhibitorias); células piramidales extrínsecas (con proyecciones del exterior) responsables de la comunicación externa del hipocampo; y células granulares (Figura 2.8). El hipocampo presenta una estructura en

Figura 2.8. Regiones de la formación hipocampal en rata, vías excitatorias y conexiones sinápticas (Purves y cols., 2004).

forma de cuerno (*cornus ammon*) que de acuerdo al tipo celular se divide en varias regiones: CA1, CA2 y CA3. Las células piramidales se encuentran principalmente en la región CA3, donde además existen importantes ramificaciones dendríticas hacia el interior hipocampal, responsables de funciones plásticas asociadas con la memoria. Otras proyecciones colaterales de CA3 son dirigidas hacia la región CA1 del mismo hipocampo (colaterales de Schaffer). El hipocampo mantiene importantes vías aferentes desde los núcleos septales, el hipotálamo y el *locus coeruleus*. Por ello el hipocampo

participa en funciones de memoria explícita y espacial. Importantes conexiones con el núcleo amigdalino, hacen que la región CA3 tenga una participación en el estrés. Trabajos con microdiálisis en vivo mostraron que las concentraciones de 5HT extracelular en el hipocampo ventral posterior no se ven alteradas con el nado forzado (Kirby y cols. 1995). Además de la plasticidad se ha observado neurogénesis en áreas como el giro dentado, en la formación hipocampal, lo que le confiere un papel importante en la adaptación a situaciones nuevas y recuperación de eventos estresantes. Es de resaltar que pacientes deprimidos crónicos muestran una reducción del volumen hipocampal, y que tanto los antidepresivos como la psicoterapia recuperan el volumen de esta estructura, lo que revela su importancia en la depresión y recuperación de la psicopatología (Castrén y cols., 2007). Se han encontrado importantes concentraciones de GR y MR que indican que el hipocampo es parte de la vía de retroalimentación negativa del eje HHA, que inhibe la liberación de CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo y con ello frena la respuesta del eje.

**Corteza prefrontal
orbital y medial**

Figura 2.9 Esquema de corte transversal de cerebro humano, mostrando la corteza prefrontal (Purves y cols., 2004).

La influencia de la amígdala en los procesos afectivos es resultado de las proyecciones hacia la corteza prefrontal (Iversen y cols., en Kandel y cols., 2001). La corteza prefrontal es la región motora de la corteza frontal y se ha relacionado con funciones de asociación y planificación ante requerimientos cognitivos que requieren información para guiar el comportamiento apropiado ante un desafío (Purves y cols., 2004),

desarrollo de iniciativa y voluntad (Zandio y cols., 2002). Se ha considerado como parte del sistema límbico y dadas sus funciones podría tener un papel importante en la respuesta de estrés. De la misma manera que el hipocampo, posee importantes concentraciones de GR que le confieren un papel dentro de la vía de retroalimentación negativa del eje, frenando su activación (Figura 2.3)

2.7. SEROTONINA Y SERT

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5HT) es una indolamina del grupo de las monoaminas, derivada del aminoácido triptófano, que es producida en las neuronas, almacenada en vesículas y liberada en la terminal sináptica (en respuesta a un estímulo despolarizante) donde activa los receptores pre- y post- sinápticos, estableciendo así la comunicación serotoninérgica (Jayanthi y Ramamoorthi, 2005). La 5HT se ha ligado a la regulación de funciones emocionales, de manera que alteraciones en la neurotransmisión serotoninérgica ha sido asociada con desórdenes psiquiátricos y conductas asociadas tales como la depresión, el suicidio, la violencia impulsiva y el alcoholismo (Jayanthi y Ramamoorthi, 2005). El estrés agudo puede resultar en un incremento de los niveles 5HT en la corteza prefrontal, el núcleo *accumbens*, la amígdala y el hipotálamo lateral (Charney, 2004). También se asocia con efectos ansolíticos o ansiogénicos dependiendo de la región cerebral donde se encuentren los receptores a 5HT que participan en la transmisión sináptica (Charney, 2004). Se vincula con funciones del desarrollo embrionario y de la maduración de los vertebrados (Lauders, 1990; Ansorge y cols., 2004; Bylund y Reed, 2007; Malkesman y Weller, 2009).

Uno de los principales reguladores de la 5HT es su transportador, el SERT, una fosfoproteína transmembranal que se encuentra en la terminal sináptica y axones de las neuronas del sistema serotoninérgico.

Las dos extremos terminales del SERT son citoplasmáticos y son potencialmente los sitios de fosforilación que desencadenan la internalización de los dominios del SERT, y como consecuencia, el bloqueo del transporte y recaptura de la 5HT (Zhou y cols., 1996). El SERT reintroduce la 5HT extracelular al citoplasma de las neuronas, regulando las concentraciones de esta monoamina en el espacio sináptico y con ello la transmisión serotoninérgica. Existen diferentes mecanismos que regulan la función del SERT, como son la actividad neural, las hormonas, los factores de crecimiento e incluso los factores ambientales. Sin embargo, los más notables son a nivel de la transcripción génica (a largo plazo, regulación crónica) y modificaciones post-traduccionales a nivel proteico (a corto plazo, regulación aguda) (White y cols., 2005; Jayanthi y Ramamoorthi, 2005).

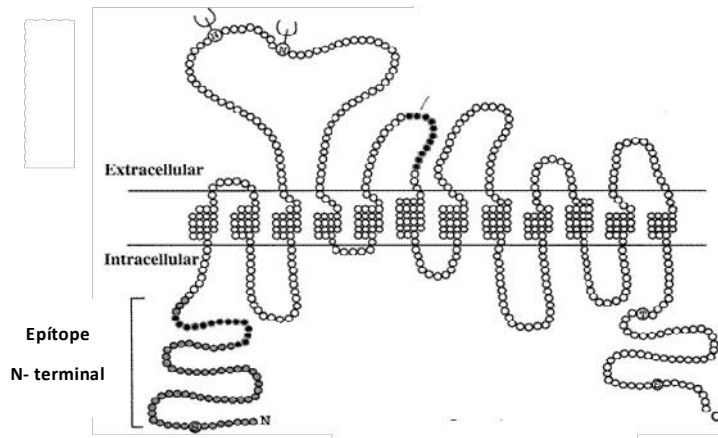


Figura 2.10. Esquema que ilustra los nueve dominios, los extremos terminales y la organización del SERT (Modificado de Zhou y cols., 1996)

A nivel génico se han identificado diversos factores de transcripción que regulan la síntesis del SERT, como son los sitios AP1 y AP2 o el elemento de unión al AMPc (CREB), entre otros. La regulación a nivel proteico se debe a mecanismos de glicosilación y fosforilación (White y cols., 2005). La mayoría de los mecanismos de regulación proteica se deben a alteraciones en la estructura del transportador. Tales alteraciones son provocadas principalmente por la acción de proteínas cinasas (PKC) y de inhibidores de fosfatasa, sobre el SERT (White y cols., 2005; Jayanthi y Ramamoorthi, 2005).

Las investigaciones sobre la estructura, función, expresión y regulación del SERT soportan consistentemente la idea de que estos transportadores juegan un papel fundamental en la regulación normal y anormal de la señalización serotoninérgica dentro del sistema nervioso (Jayanthi y Ramamoorthi, 2005), por lo que alteraciones del SERT a cualquier nivel, pueden afectar la recaptura de la 5HT y alterar todo el sistema serotoninérgico.

En humanos, esta proteína es codificada a partir del gen SLC6A4 en el cromosoma 17, q11.1-q12 (Ramamoorthy, 1993), con un promotor con dos variantes polimórficas, larga y corta. La variante corta es menos funcional en la expresión del gen y genera proteínas con deficiencias estructurales, lo cual se asocia con trastornos afectivos, tales como la depresión (Young y cols, 2008). Por esta razón ha sido el

blanco de los tratamientos farmacológicos de trastornos y enfermedades asociados con disfunciones en la transmisión serotoninérgica, como depresión, el alcoholismo, la ansiedad, el insomnio y los trastornos alimenticios y obsesivo-compulsivos. Anteriormente se explicó el papel de los ISRS sobre el SERT, que ha sido el blanco terapéutico de estos fármacos y otros menos selectivos.

Estudios sobre el efecto de los antidepresivos sobre el SERT, mostraron que la paroxetina reduce hasta en 80% la expresión del SERT en la región CA3 del hipocampo (Benmansaur y cols., 2002), en el núcleo lateral de la amígdala, en el giro dentado y en los núcleos del rafe dorsal (Gould y cols., 2003) lo cual confirma que el bloqueo del SERT en algunas regiones está asociado con el efecto antidepresivo de los ISRS.

Existen diversas evidencias que vinculan alteraciones del SERT con la depresión. Un estudio reciente sugiere que bajos niveles de SERT en la corteza prefrontal constituye un importante factor de riesgo en la aparición de trastornos afectivos, como es la depresión (Frokjaer y cols., 2009). Estudios *post-mortem* realizados en el tallo cerebral de humanos, víctimas de suicidio, mostraron que éstos presentan bajos niveles de 5HT y su metabolito (5HIAA) , así como elevados niveles de receptores 5HT₂ Y 5HT_{1A} (Mann y cols., 1989). Asimismo, las investigaciones de Kakiuchi y colaboradores muestran que existe una relación entre bajos niveles, deterioro de la función, decremento de la velocidad e intensidad de recaptura del SERT con elevados niveles del cortisol en individuos viejos (Kakiuchi y cols., 2001). Estos resultados fortalecen la idea de que existe una relación entre las alteraciones en los niveles, la expresión y la función del SERT con la depresión y el estrés.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La depresión es una enfermedad de origen multifactorial, y el estrés es uno de los factores etiológicos más asociados a los trastornos depresivos. La vejez es una etapa de mayor vulnerabilidad al estrés, lo mismo que edades de desarrollo, como es la niñez y la pubertad; asimismo estas poblaciones muestran una alta prevalencia de trastornos depresivos. Sin embargo los tratamientos antidepresivos más empleados tienen una pobre respuesta en estos grupos. Los ISRS tienen como sitio blanco al SERT. A la fecha existen pocos estudios que relacionen los niveles de SERT con el estrés en diferentes grupos de edad, en un modelo de depresión. Por esta razón resulta de interés estudiar los efectos del estrés y la edad sobre los niveles del SERT en regiones cerebrales asociadas con la depresión y el estrés y la conducta depresiva en un modelo animal.

4. HIPÓTESIS

- La edad es un factor asociado con la vulnerabilidad al estrés, por lo que el nado forzado producirá más inmovilidad en los grupos juveniles y de edad media.
- El SERT es una proteína asociada con el desarrollo y funcionamiento del sistema serotoninérgico, por lo que los grupos juveniles y de edad media tendrán bajos niveles de SERT en regiones del sistema límbico asociadas a la depresión.
- Ya que el estrés por nado forzado afecta el sistema serotoninérgico entonces producirá una reducción en los niveles del SERT en regiones cerebrales relacionadas a la depresión, principalmente en las poblaciones más vulnerables (prepúberes, puberales y edad media).

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del estrés por nado forzado y la edad sobre los niveles del SERT y la conducta depresiva en ratas Wistar macho.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la edad sobre la respuesta conductual en el modelo de nado forzado.
2. Determinar los niveles de SERT en regiones cerebrales asociadas con el estrés y la depresión:
 - Corteza prefrontal, región prelímbica (CPF)
 - Septum lateral, región intermedia (SLI)
 - Amígdala, núcleo basolateral (BSA)
 - Hipocampo dorsal, región CA3 ventral (HCA3)
 - Núcleo dorsal del raquí (DRD)
3. Determinar los niveles del SERT en cada una de las estructuras seleccionadas en relación con la edad: prepúber, puberal, adulto joven y edad media.
4. Determinar si el estrés por nado forzado modifica los niveles del SERT en cada una de las estructuras seleccionadas

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. SUJETOS EXPERIMENTALES.

Se utilizaron 84 ratas macho de la cepa Wistar, alojadas en cajas de acrílico de 35 x 25 cm y 15 cm de alto durante al menos una semana antes del experimento, en el bioterio del INPRFM, con un ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 horas (la luz se encendió a las 22:00 horas) en condiciones controladas de temperatura y humedad. Todas las ratas tuvieron acceso libre a comida y agua, antes y durante el experimento. El manejo de animales se llevó a cabo bajo los lineamientos de la norma oficial de manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999) y la norma internacional para el uso de sujetos de experimentación (NIH publicación 85-23, 1985).

6.2. EDADES

Las ratas fueron seleccionadas de acuerdo a su edad con base a los criterios establecidos en la literatura (Lupien y cols., 2009; Bylund, 2007) (ver capítulo 2.5), considerando como edades cruciales postnatales (PN) las siguientes:

- Prepúberes, entre 24 y 32 días. Se considera prepúberes a los machos que aún no presentan la separación prepucial.
- Puberales, de 40-41 días. Son los animales que presenta la separación prepucial.
- Adultos jóvenes de 90 días. Es el adulto en edad reproductiva.
- Edad media, de 12 a 13 meses. Se considera de mediana edad a los animales que comienzan a mostrar un decremento significativo de los niveles de T total (Herrera-Pérez y col., 2008).

A lo largo de este trabajo denominaremos al conjunto de ratas prepúberes y puberales como “juveniles”. A los adultos jóvenes simplemente los denominaremos “adultos”.

6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales de las diferentes edades se asignaron aleatoriamente a dos grupos: con estrés por nado forzado (NF) y control (C). Los cuatro grupos de edades asignados al NF fueron sometidos a las sesiones de preprueba y prueba de acuerdo al modelo de PNF (ver más adelante). Los animales del grupo control permanecieron en las mismas condiciones de alojamiento y cuidado y no fueron sometidos a la prueba de NF. Al término de la prueba de nado, inmediatamente todos los grupos fueron anestesiados y perfundidos. Los cerebros se extrajeron y se preservaron; posteriormente se rebanaron en el criostato a -22 °C. Finalmente los cortes se procesaron por inmunofluorescencia. Las imágenes se analizaron con el programa Metafluor. El diseño experimental puede resumirse en forma diagramática en la figura 6.1 (diseño A)

Con respecto a la preprueba de NF en ratas juveniles, no existen suficientes datos en la literatura sobre los efectos de la preprueba en las conductas de la PNF, por lo que los resultados de la preprueba registrados en este trabajo, en los grupos de animales prepúberes y puberales, fueron analizados adicionalmente, no así los datos de los animales adultos y en edad media. Por esta razón se desprende un segundo diseño para las ratas juveniles (figura 6.1 B).

Diseño experimental A



Diseño experimental B



Figura 6.1 A. Esquema general que representa la secuencia de los experimentos realizados en este trabajo. B. El segundo diseño experimental es un desprendimiento del esquema general, que incluyó el registro y análisis de los datos de la preprueba para las ratas prepúberes y puberales.

6.4 PRUEBA DE NADO FORZADO (PNF)

Las ratas asignadas a los grupos con estrés, fueron forzadas a nadar por 15 minutos en estanques cilíndricos de vidrio de 46 cm de alto por 20 de diámetro, con agua corriente a una altura de 30cm, a 22 °C de temperatura. Esta primera sesión de nado forzado constituye la preprueba. El desarrollo de las conductas en la preprueba de nado forzado ha sido reportado para ratas adultas (Cryan y col., 2005; Rubalcava y Lucki, 2000; Martínez-Mota y cols., 2005), por lo que para este trabajo sólo se consideró estudiar este desarrollo en las ratas juveniles. Para el caso de los dos grupos de ratas juveniles menores, la sesión de preprueba de 15 minutos fue videograbada para su posterior análisis, y dividida en periodos de 5 minutos. Al término de la preprueba todas las ratas fueron secadas con una franela y colocadas en cama de aserrín iluminada por una lámpara que les proporcionó calor. Posteriormente fueron reincorporadas a sus cajas de acrílico al bioterio. Veinticuatro horas después, todos los grupos (todas las edades) fueron nuevamente sometidos a nado forzado para la sesión de prueba por 5 minutos, que fue videograbada para su posterior análisis.

El análisis conductual se realizó mediante registro instantáneo con ayuda de cronómetros que indican una señal cada 5 segundos, momento en la cual fue anotada la conducta observada en el video. Las conductas analizadas fueron, como se describió anteriormente, inmovilidad, nado y escalamiento (ver página 21). Cada conducta registrada se definió como una cuenta, de tal forma que en 5 minutos se contabilizó un total de 60 cuentas repartidas entre las tres conductas.

Para los grupos juveniles, los resultados de la preprueba fueron separados en tres periodos de 5 minutos cada uno para el análisis estadístico.

6.5 PERFUSIÓN

Las ratas macho Wistar de los grupos control y estrés por NF fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (20 mg/kg) vía i.p. (ver apéndice 12.5 de anestésicos), usados como anestésico y relajante muscular, respectivamente. Para realizar la perfusión se introdujo una cánula a través del ventrículo izquierdo, hasta ser colocada en la aorta, mediante la cual fue suministrada una solución salina de fosfatos (PBS 0.001M: NaCl, 0.13 M; Na₂HPO₄, 0.003 M y Na₂HPO₄, 0.007 M) y heparina como anticoagulante (0.1 ml por cada 100 ml de PBS) en dosis de 1000 ml de PBS / kg. Posteriormente se perfundieron con una solución de paraformaldehído al 4%. Al término de la perfusión los cerebros se extrajeron y se lavaron en PBS 0.001 M en agitación constante por 20 min, y se almacenaron en una solución de PBS 0.001M con sacarosa al 30% y trimerosal al 0.1 % a -4°C.

6.6 REGIONES DE INTERÉS

Diferentes reportes establecen la participación de determinadas áreas del sistema límbico durante el estrés agudo y la depresión. Con base en estos criterios establecimos las regiones de interés, que fueron identificadas por medio de las coordenadas estereotáxicas (Interaural y de Bregma) tomadas del el atlas de cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1998).

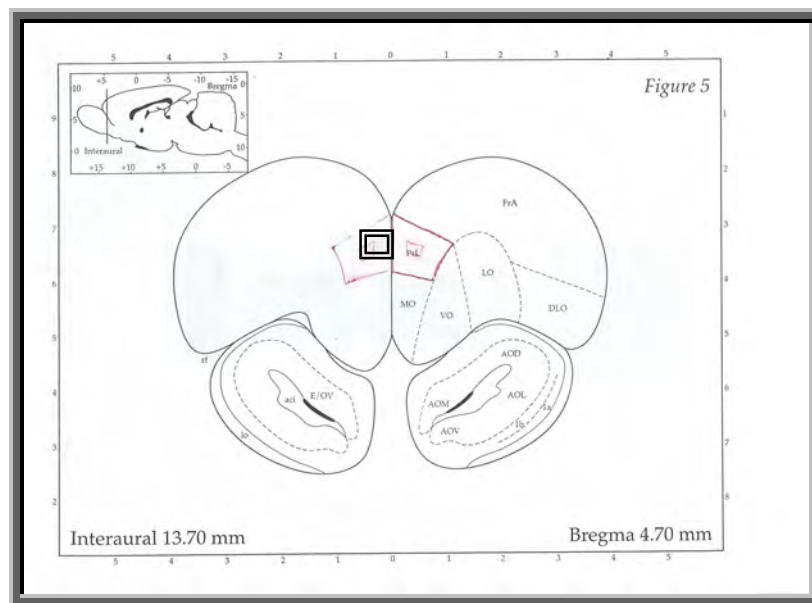
Los cerebros se rebanaron con un criostato (Microm HM 505 N) a -22°C , y se obtuvieron cortes coronales de $40\ \mu\text{m}$. Estos se guardaron en una solución anticongelante de etilenglicol/glicerol (25-25%) en solución PBS 0.001M a -8°C . Posteriormente se colocaron en PBS 0.001M dentro de una caja de petri y se seleccionaron cortes correspondientes con las siguientes 5 regiones:

- Región prelímbica de la corteza prefrontal (CPF)

Diversos reportes indican que las regiones orbital, ventrolateral y prelímbica de la corteza prefrontal participan en funciones de asociación y planificación y se han asociado con la fisiopatología del estrés y la depresión (Iversen y cols., en Kandel, 2001; Zandio y cols., 2002). Elegimos el área prelímbica de la corteza prefrontal dentro del recuadro.

Interaural: 13.70 a 13.20 mm

Bregma: 4.70 a 4.20 mm

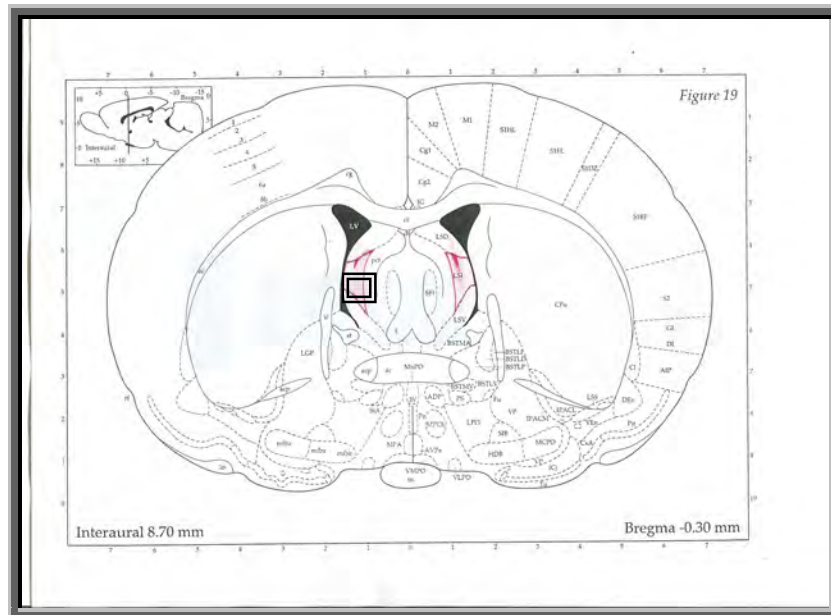


- Región intermedia del septum lateral (SLI)

Los reportes de Kirby y cols., quienes realizaron diálisis en esta región media del septum lateral, indicaron cambios importantes en las concentraciones extracelulares de 5HT en esta región durante el estrés por nado forzado (Kirby y cols., 1995). Otras investigaciones demostraron que el septum lateral está implicado en la respuesta farmacológica de los antidepresivos (Contreras y cols., 2001). Se eligió el área intermedia de los núcleos septales (la zona sombreada dentro del recuadro) con la finalidad de delimitar un área de medición, sin descartar que más adelante se pueda extender la cuantificación del SERT en áreas dorsal y ventral del septum, las cuales también han sido asociadas con la respuesta farmacológica en la depresión (Contreras y cols., 2001).

Interaural: 8.74 a 8.60 mm

Bregma: -0.26 a -0.40 mm



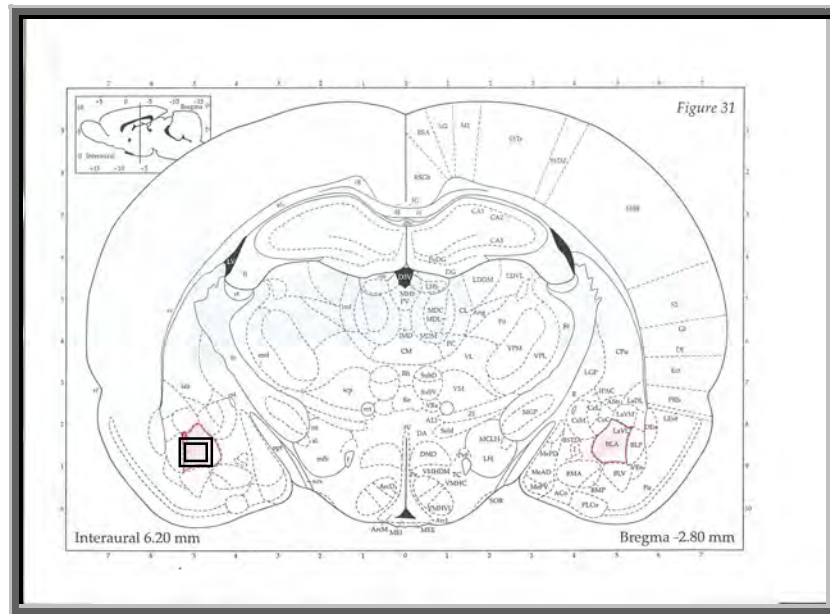
- Núcleo basolateral anterior de la amígdala (BLA)

Ha sido reportada la participación de la amígdala en la regulación del eje HHA (Zandio, 2002) especialmente el núcleo basolateral anterior de la

amígdala. Fue reportada una disminución de las concentraciones de 5HT extracelular tras una sesión de nado forzado (Kirby y cols., 1995). Fue elegida la zona sombreada dentro del recuadro en el esquema.

Interaural: 6.70 a 5.70 mm

Bregma: -2.30 a -3.30 mm

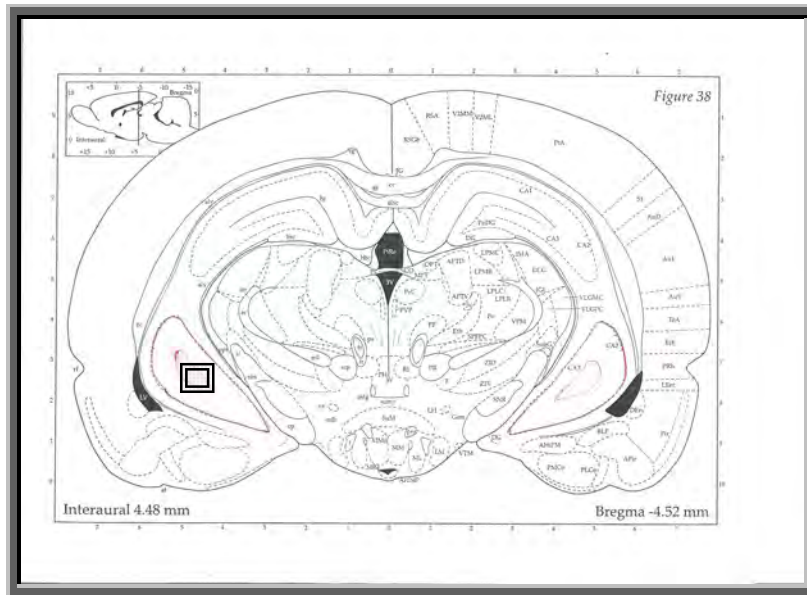


- Región CA3 del hipocampo ventral posterior (HCA3)

La región CA3 del hipocampo está compuesta principalmente por neuronas piramidales, y constituye un importante puente de respuesta al estrés entre la amígdala y la corteza prefrontal. Reportes de Kirby y cols. indicaron pocas modificaciones en los niveles extracelulares de 5HT en el hipocampo ventral durante el estrés por nado (Kirby y cols., 1995). En este trabajo se eligió la zona sombreada dentro del recuadro.

Interaural: 4.48 mm

Bregma: -4.52 mm

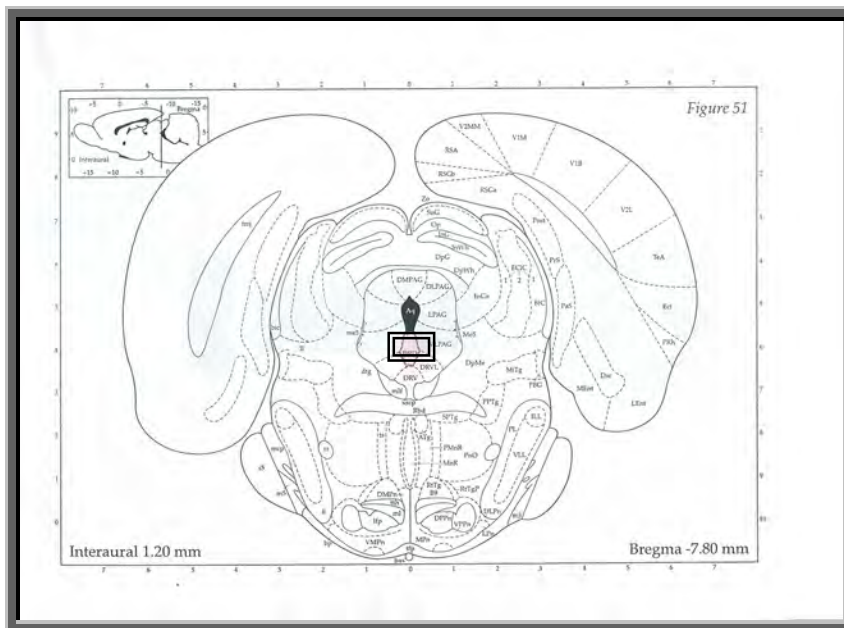


- Núcleos dorsales del rafe (DRD)

Las fibras serotoninérgicas tienen su origen en los núcleos de Rafé. Durante el estrés se incrementa la producción de 5HT especialmente en los núcleos dorsales de esta región. La zona sombreada en el recuadro fue seleccionada para cuantificar los niveles del SERT

Interaural: 1.70 a 1.36 mm

Bregma: -7.30 a -7.64 mm



6.7 TINCIÓN DE NISSL

Una vez establecidas las coordenadas y subregiones de interés, fue seleccionada una muestra de cortes de manera aleatoria dentro de las coordenadas estereotáxicas de interés y teñidos con el método de Nissl para observar la citología general del sistema nervioso, con la finalidad de identificar las áreas cerebrales de interés. Los cortes de cerebro fueron lavados en PBS 0.001M y colocados en portaobjetos gelatinizados. Una vez secos fueron lavados con agua destilada y teñidos por 20 minutos en solución de violeta de cresilo 0.02%. Posteriormente fueron deshidratados gradualmente en soluciones de alcohol 70, 80, 96 y 100%. Finalmente se lavaron en alcohol absoluto y colocaron por 10 minutos en xilol. Se lavaron en xilol limpio y se montaron con resina sintética Entellan (ver protocolo de Nissl en el apéndice 1)

6.8 INMUNOFLUORESCENCIA

Los cortes de las diferentes estructuras se procesaron para inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario monoclonal elaborado contra los aminoácidos 1-85 del extremo N-terminal del SERT, desarrollado en ratón. Este anticuerpo fue marcado con un anticuerpo secundario conjugado a un fluoroforo verde (*Oregon green*) el cual nos permite visualizar al transportador en un microscopio de epifluorescencia. Las muestras fueron depositadas en de cajas multipozos con PBS 0.001M. Se procedió conforme al siguiente protocolo:

- 1) Tres lavados de 20 minutos cada uno. Dejar toda la noche en PBS (Sigma) 0.01M
- 2) Prebloqueo de sitios inespecíficos mediante incubación de los cortes por 2h a temperatura ambiente en solución PBS 0.001M que contiene:
 - a. 10% de suero de cabra (Sigma G9023)
 - b. 1% de BSA (Sigma A7888)
 - c. 0.3% de Tritón X-100 (Sigma)
- 3) Adición del anticuerpo primario (*Acp*) contra los a.a. 1-85 del extremo N-terminal del transportador de la Serotonina, desarrollado en ratón (*Chemicon Internacional* MAB1564) a una dilución 1:500
- 4) Incubación en agitación constante a temperatura ambiente por 1 hora y a -4° C toda la noche.
- 5) Tres lavados de 20 minutos c/u, con solución *Tritón X-100* al 0.15% en PBS 0.01M (PBS-T)
- 6) Incubación con anticuerpo secundario (*Acs*) *anti inmunoglobulina G* de ratón, desarrollado en cabra, conjugado con *Oregon green 488* (Invitrogen 06380) por 2 horas en agitación constante a temperatura ambiente, diluido 1:100 en una solución de PBS 0.001M con 5% de suero de cabra y 0.3% de *Tritón X-100*
- 7) Cuatro lavados de 20 minutos c/u con una solución de PBS-T.
- 8) Los cortes se colocaron en caja de *petri* con PBS 0.001M y se montaron en oscuridad sobre portaobjetos gelatinizados.
- 9) Los cortes se montaron con resina (*antifade*) y cubreobjetos.

- 10) La preparación se dejó secar y se observó en un microscopio de epifluorescencia (marca *Nikon*)
- 11) Las imágenes observadas se capturaron con el programa MetaFluor versión 6.1 r1, y se guardaron en archivos jpg.

6.9 ANALISIS DE IMÁGENES

Las imágenes de microscopía fueron analizadas con ayuda del programa Metaflur, el cual arroja valores de intensidad en escala de grises, y valores del área capturada en la imagen, en pixeles. Para conocer el valor del área inmunoreactividad al SERT (ir-SERT) se retiró el valor de la fluorescencia de fondo y se evaluó la proporción del área correspondiente a la inmunoreactividad.

Para conocer y descartar la fluorescencia de fondo se utilizaron dos criterios: el valor promedio de la fluorescencia de fondo y el valor umbral de la marca ir-SERT.

Para obtener el valor de fondo se seleccionaron aleatoriamente 20 regiones correspondientes al fondo de la imagen en una muestra de cortes. Los valores de intensidad se promediaron. Todos los valores por debajo de este promedio fueron retirados de la imagen (Figura 6.7)

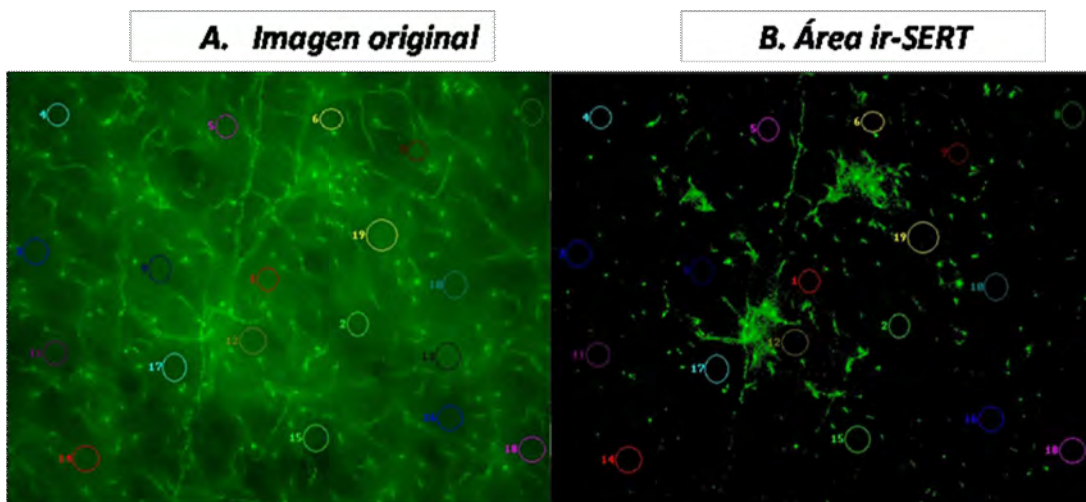


Figura 6.7 Fotomicrografía de un corte coronal de cerebro de rata prepúber en la región CA3 del hipocampo. Selección aleatoria de la fluorescencia de fondo. En A se presenta la imagen original, en la cual fueron seleccionadas 20 regiones circulares dentro del fondo. (B) La intensidad de estos campos fue promediada y todos los pixeles por debajo de este valor fueron extraídos de la imagen original, obteniendo el valor del área ir-SERT

Para obtener el valor umbral de la ir-SERT, se obtuvo el histograma de fluorescencia correspondiente a cada imagen (píxeles vs intensidad). Se estableció el valor de intensidad umbral donde cruza una recta formada por dos coordenadas de la sección decreciente de la curva y el eje de las x. La campana fue acotada en el valor umbral de intensidad. El valor de umbral estuvo aproximadamente 2.5 desviaciones estándar arriba de la media de fluorescencia de cada curva (figura 6.8)

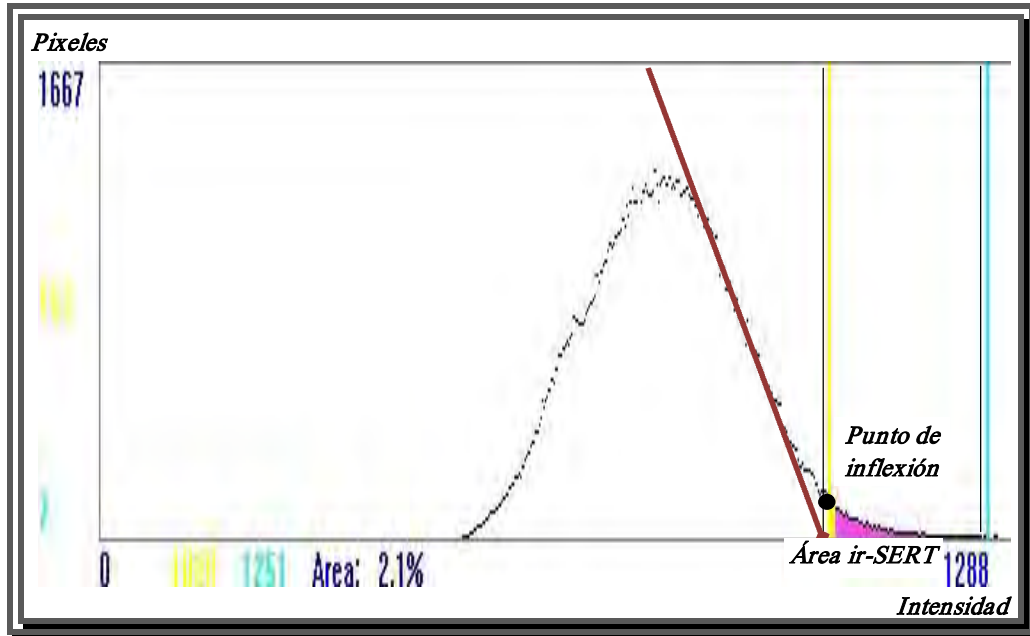


Figura 6.8 Histograma correspondiente a la inmunoreactividad al SERT encontrada en un corte cerebral de rata prepúber control en la región del raqué dorsal. El área ir-SERT fue cuantificada extrayendo el fondo de la imagen hasta el punto de inflexión derecho de la campana de fluorescencia. A partir de este punto los valores fueron considerados como marca ir-SERT.

Área relativa

Las regiones de interés fueron estudiadas en campos de tamaño fijo para todas las imágenes (344064 píxeles). Los valores del área ir-SERT fueron medidos en píxeles con valor de intensidad arriba del umbral. De cada rata se obtuvieron de 2 a 6 cortes aledaños a cada región de interés dentro de las coordenadas estereotáxicas y se registraron los valores de ambos hemisferios, de modo que por cada estructura cerebral

se obtuvieron de 4 a 12 datos del área ir-SERT en cada rata. Los valores de diferentes cortes de una misma estructura fueron sumados y divididos entre el valor del área total de los campos capturados en cada rata. Este cociente de ambos valores por cien nos permitió conocer el porcentaje de área ir-SERT:

$$\% \text{ Área relativa} = \left(\frac{\text{Área ir-SERT}}{\text{Área total}} \right) \times 100$$

6.10 ANALISIS ESTADISTICO

Los datos conductuales obtenidos de los videos de la PNF y los obtenidos por la cuantificación de área ir-SERT en las imágenes, se analizaron con el programa Sigma Stat (Versión 3.1) y fueron graficados con el programa Sigma Plot (versión 10.0).

Los datos obtenidos durante los 15 minutos de la preprueba en los grupos prepúberes y puberales, se dividieron en tres periodos de 5 minutos cada uno, con la finalidad de comparar el curso temporal de las conductas. Para evaluar la influencia de la edad sobre la preprueba, se realizó un ANOVA de dos vías para muestras repetidas, considerando los factores edad (prepúber / puberal) y periodo (0-5, 5-10 y 10-15 minutos). Adicionalmente se hicieron pruebas *post-hoc* de Tukey.

Con la finalidad de conocer el efecto de la preprueba sobre la conducta de inmovilidad, 24 horas después en ratas menores a 41 días (dado que tampoco existe evidencia sólida al respecto) se comparó la inmovilidad de ambas sesiones entre ratas prepúberes y puberales mediante un ANOVA de 2 vías para muestras repetidas, considerando los factores edad (prepúber / puberal) y periodo (0-5, 5-10, 10-15 min y 24 hrs). Posteriormente se corrieron pruebas *post-hoc* de Tukey

Para evaluar la influencia de la edad en la PNF de los 4 grupos, se realizaron ANOVAS de una vía para cada conducta y pruebas *post-hoc* de Tukey. Para comparar dos grupos se realizaron pruebas de *t de Student*.

El área ir-SERT de cada estructura obtenida en cada rata fue sumadas y divididos sobre el área total para obtener un solo valor del área ir-SERT por estructura en cada rata. Con estos valores se realizó una ANOVA de tres vías, considerando como factores la condición de estrés, la región cerebral y la edad. Adicionalmente se realizaron ANOVAS de dos vías en cada región cerebral para un análisis más fino, considerando los factores edad y estrés. En ambos casos se realizaron pruebas *post-hoc* de Tukey y pruebas de *t de Student*

Para analizar la correlación entre las conductas observadas en la PNF y los datos de área ir-SERT, fueron realizadas pruebas de correlación de Pearson.

7. RESULTADOS

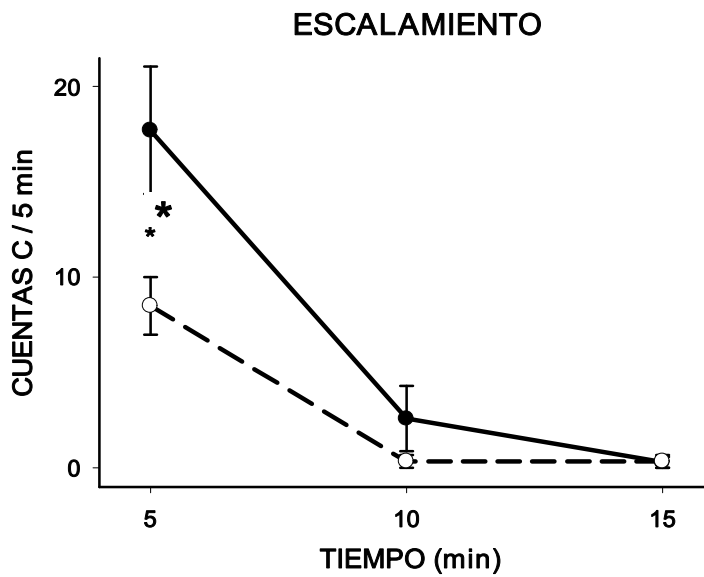
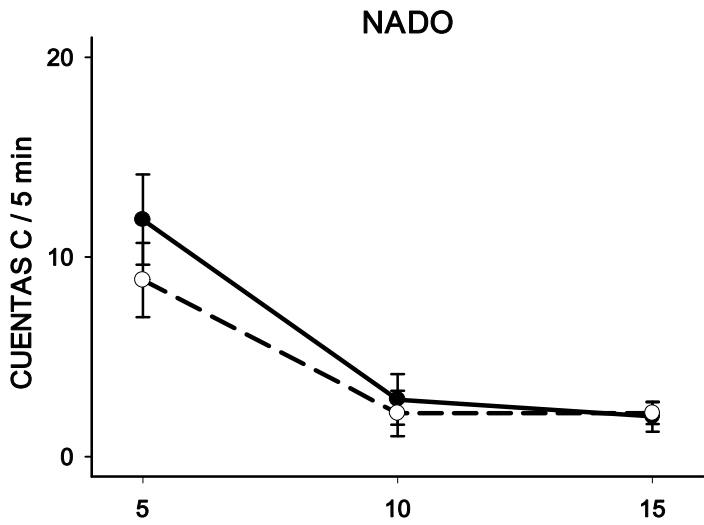
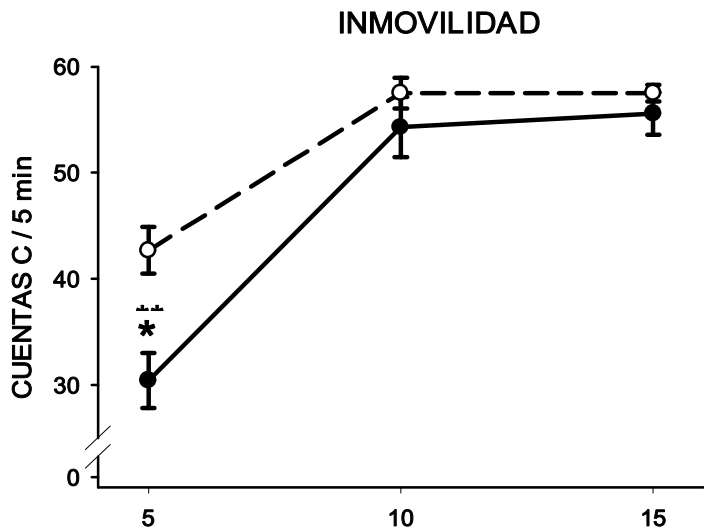
7.1 PREPRUEBA

Los resultados de la preprueba se analizaron solamente en las ratas prepúberes y puberales (como se explicó en el diseño experimental B). Estos se resumen en las graficas 7.1 para cada conducta observada. En los primeros 5 minutos, las ratas prepúberes mostraron menor inmovilidad que las puberales y mayor conducta de escalamiento. Al término de la preprueba ambos grupos adquieren una inmovilidad cercana a las 60 cuentas/5 min.

Se encontraron diferencias por el factor periodo de la preprueba (ANOVA 2 vías MR; $F_{2,10} = 95.44$; $p < 0.001$) no así para el factor edad ($F_{1,10} = 4.11$; $p = 0.098$); se observó una tendencia en la interacción de los factores edad y periodo ($F_{2,10} = 3.4$; $p = 0.075$). El análisis reveló que la inmovilidad es estadísticamente menor en prepúberes respecto a los puberales durante los primeros 5 minutos de la preprueba (*post-hoc* de Tukey; $p = 0.01$). En el resto de las comparaciones (intervalos de 5-10 min y de 10-15 min) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de edad.

En la conducta de nado, el análisis demostró que existen diferencias significativas entre los periodos de la preprueba ($F_{2,10} = 26.36$; $p < 0.001$), no así por el factor edad ($F_{1,10} = 0.29$; $p = 0.61$) ni por la interacción de ambos factores ($F_{2,10} = 0.40$; $p = 0.68$) entre los grupos. No se encontraron diferencias significativas por edad en ninguno de los periodos de la preprueba en esta conducta, pero hubo una disminución estadísticamente significativa de la conducta de nado en el segundo y tercer periodo de la prueba respecto al primero (*post-hoc* de Tukey: prepúberes: $p < 0.005$; puberales $p < 0.01$).

En la conducta de escalamiento, el análisis demostró diferencias significativas para el factor periodo ($F_{2,10} = 34.81$; $p < 0.001$) no así para el factor edad ($F_{1,10} = 3.37$; $p = 0.13$) ni para la interacción de factores ($F_{2,10} = 0.083$). Se encontró que la conducta de escalamiento es estadísticamente mayor en el grupo de prepúberes respecto de los puberales durante los primeros 5 minutos de la preprueba (*post-hoc* de Tukey: $p = 0.01$).

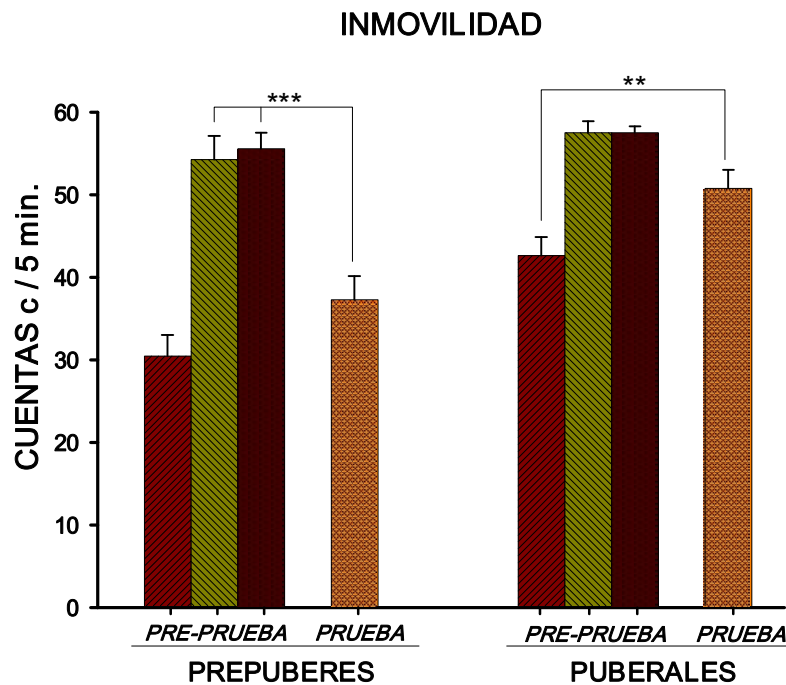


Gráficas 7.1 Se muestran las cuentas cada 5 segundos de las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento en el transcurso de los 15 minutos de la preprueba, divididas en tres periodos de 5 minutos. Se comparan ratas prepúberes (24-32d, n=8) con puberales (40-41d, n=8). Pruebas de Tukey: *(P=0.01).

7.2 PRUEBA DE NADO FORZADO

Efecto de la preprueba en ratas juveniles

Para las ratas prepúberes y puberales, el análisis de la inmovilidad entre la preprueba y la prueba de nado, mostró diferencias significativas en los factores edad ($F_{6,15}= 6.66$; $p<0.05$) y periodo de tiempo ($F_{3,15}=35.98$; $p<0.001$), así como en la interacción de ambos factores ($F_{3,15}=7.07$; $p<0.005$). En las ratas prepúberes, la prueba *post-hoc* de Tukey mostró que la inmovilidad en la prueba de nado no es significativamente distinta de la inmovilidad encontrada en el primer periodo de la preprueba ($p=0.3$) y en cambio si es estadísticamente menor de la inmovilidad encontrada en el segundo ($p<0.001$) y tercer periodos de la preprueba ($p<0.001$). Por el



GRAFICA 7.2 Inmovilidad desarrollada en ratas prepúberes y puberales a lo largo de la preprueba y prueba de NF. La preprueba fue dividida en tres periodos de 5 minutos cada uno (Primeras tres columnas de cada grupo de edad). Se agregan en la cuarta columna los datos de la prueba desarrollada 24 hrs después. (Preprueba: prepúberes $n=7$, puberales $n=6$; Prueba, ambos grupos $n=8$). Resultados de la prueba de Tukey: *** $p<0.001$ ** $p<0.005$

contrario, en las ratas puberales se encontró que la inmovilidad en la prueba de nado es estadísticamente mayor respecto del primer intervalo de la preprueba (*post-hoc* de Tukey: $p < 0.005$), pero no lo es de la inmovilidad observada en el segundo (*post-hoc* de Tukey: $p = 0.47$) y tercer periodos (*post-hoc* de Tukey: $p = 0.72$) de la preprueba.

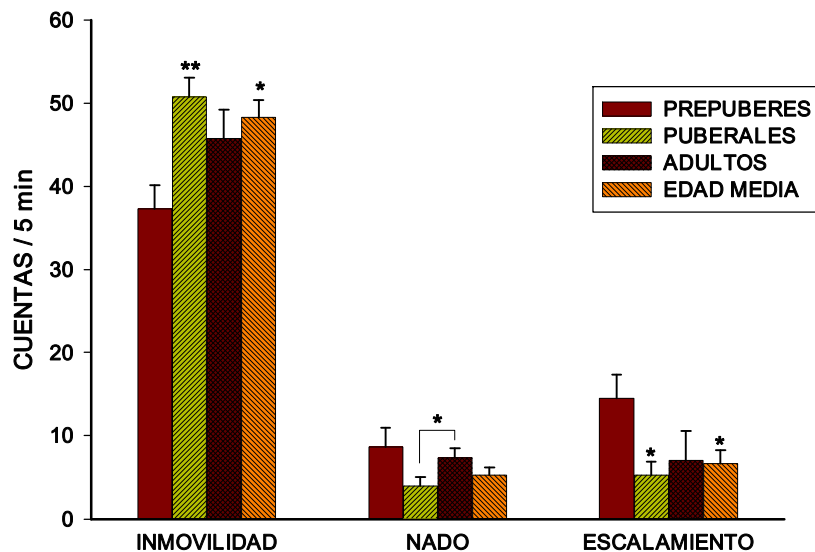
Por último, se encontró que existen diferencias significativas por edad en la conducta de inmovilidad expresada en el primer periodo de la preprueba (*post-hoc* de Tukey: $p < 0.05$), y en los 5 minutos de la prueba (*post-hoc* de Tukey: $p < 0.001$), lo cual indica que la preprueba genera mayor inmovilidad en las ratas puberales que en las prepúberes.

Estos datos, así como otros de la literatura (Bernal-Morales y cols., 2009) sugieren que la preprueba tiene mayor impacto sobre la conducta de inmovilidad expresada en animales más desarrollados (en este caso los puberales) durante la prueba, 24 horas después.

PNF EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE EDAD

En la PNF (sesión de prueba), se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos de edad en la conducta de inmovilidad ($F_{3,28} = 4.605$, $p=0.01$); a su vez con la prueba de Tukey se encontró que las ratas prepúberes tuvieron menor inmovilidad respecto a las ratas puberales ($p=0.008$) y a las ratas de edad media ($p=0.039$).

PRUEBA DE NADO FORZADO (5 min)



Grafica 7.3 Diferencias por edad en la expresión de las conductas en la prueba de nado forzado. Prepúberes (24-32 días, $n=8$); puberales (40-41 días, $n=8$); adultos (60-90 días, $n=8$); edad media (12-13 meses, $n=8$). Resultados de la prueba de Tukey pruebas de t : ** $p<0.01$; * $p<0.05$. Los asteriscos son de comparación contra ratas prepúberes.

Encontramos que la conducta de nado es mayor en ratas adultas respecto a las puberales (prueba de t de Student: $P = 0.049$)

En la conducta de escalamiento encontramos una tendencia de significancia entre los grupos ($F_{3,28} = 2.64$, $p=0.069$). Con la prueba de t de Student se encontró una mayor conducta de escalamiento en las ratas prepúberes en comparación con puberales ($p=0.013$) y con ratas de edad media ($p=0.031$).

7.3 TINCION DE NISSL

La histología general nos permitió localizar las regiones cerebrales que elegimos como regiones de interés. A continuación se presentan las imágenes que corresponden a las regiones de interés elegidas en este trabajo.

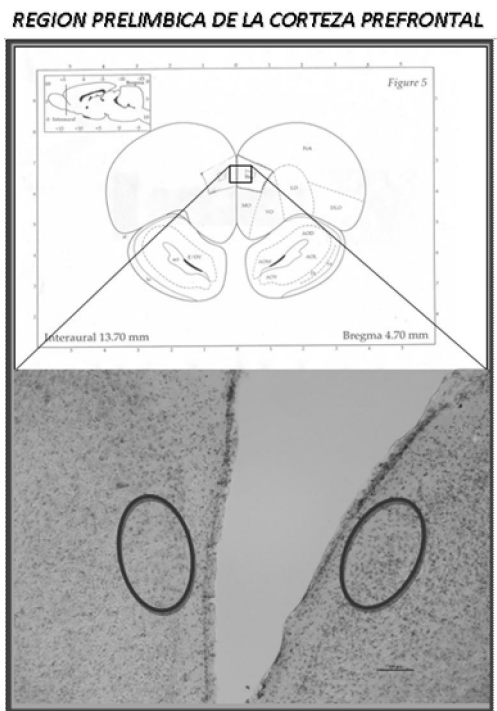


Figura 7.4 Región de interés en la corteza prefrontal dentro de las coordenadas estereotáxicas Interaural: 13.70 a 13.20 y Bregma: 4.70 a 4.20mm. Se muestra una correspondencia entre la fotomicrografía de un corte cerebral en CPF y el diagrama del atlas

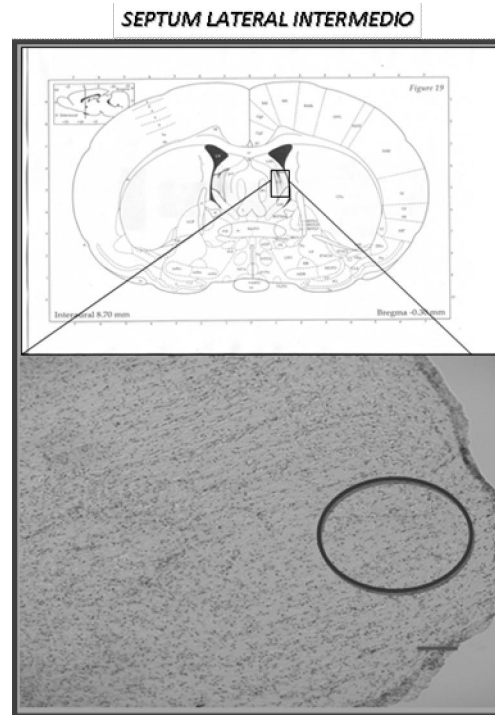


Figura 7.5 Región de interés en el septum. Interaural: 8.74 a 8.60 mm y Bregma: -0.26 a -0.40 mm. Se muestra una correspondencia entre la fotomicrografía de un corte cerebral en SLI y el diagrama del atlas.

NUCLEO BASOLATERAL DE LA AMIGDALA

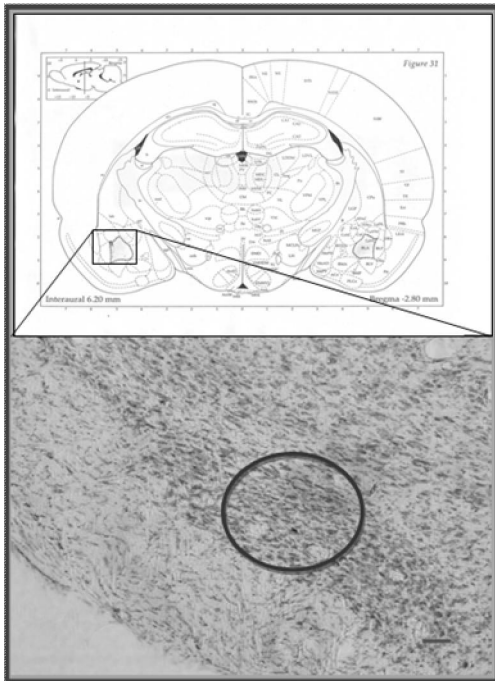


Figura 7.6 Interaural: 6.70 a 5.70 mm; Bregma: -2.30 a -3.30 mm. Se muestra una correspondencia entre la fotomicrografía de un corte cerebral en BLA y el diagrama del atlas.

REGION CA3 DEL HIPOCAMPO VENTRAL POSTERIOR

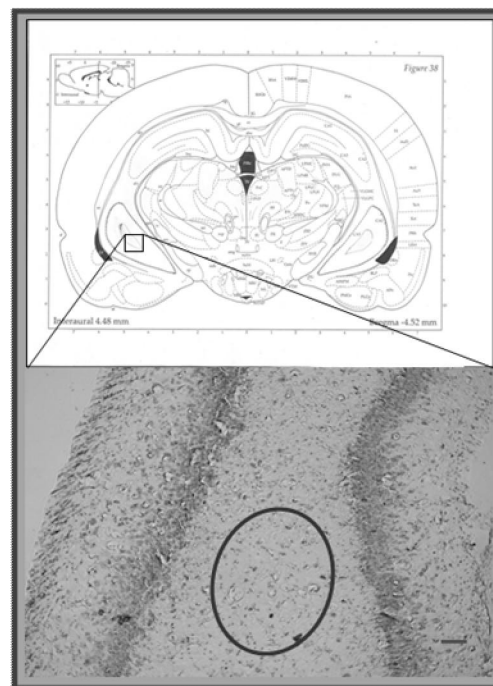


Figura 7.7 Interaural: 4.48 mm y Bregma -4.52 mm. Se muestra una correspondencia entre la fotomicrografía de un corte cerebral en CA3H y el diagrama del atlas.

NUCLEOS DORSALES DEL RAJE DORSAL

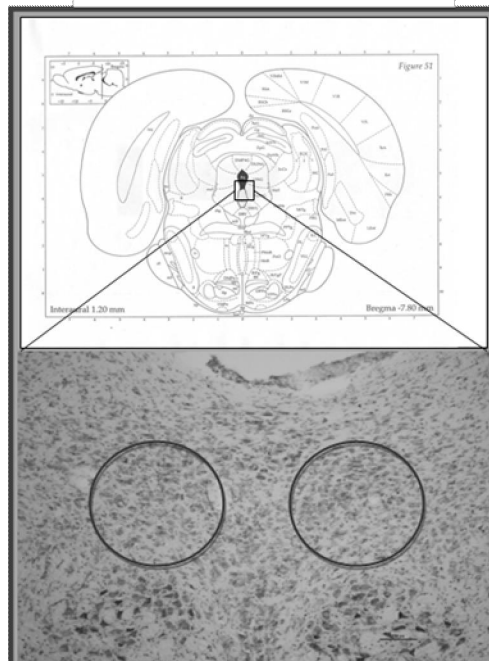


Figura 7.8 DRD. Interaural: 1.70 a 1.36 mm; Bregma: -7.30 a -7.64 mm. Se muestra una correspondencia entre la fotomicrografía de un corte cerebral en DRD y el diagrama del atlas.

7.4 ANALISIS MORFOLÓGICO

IMÁGENES

Las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia y analizadas con el programa Metafluor se capturaron y se guardaron como archivos jpg. Para este estudio se realizaron observaciones solo de manera visual, sin llevar a cabo mediciones morfológicas. No obstante encontramos patrones morfológicos específicos para cada región, independientemente de la edad y la condición a que fueron sometidos los animales. Los patrones observados fueron los siguientes:

Corteza prefrontal, región prelímbica: Fibras finas, curvadas, con varicosidades y ramificadas, poco punteadas.

Septum lateral intermedio: fibras escasas, gruesas, largas, sin ramificaciones, poco punteadas.

Núcleo basolateral de la amígdala: fibras abundantes muy finas, cortas, muy ramificadas, punteadas.

Región CA3 del Hipocampo posterior ventral: fibras abundantes, gruesas, extensas, ramificadas, entrelazadas, punteadas y con varicosidades.

Núcleo dorsal del Rafé dorsal (DRD): fibras abundantes muy finas, muy cortas, con gran cantidad de varicosidades y muy punteadas.

Estas observaciones sobre la morfología encontrada nos confirma que cada región cerebral tiene una organización específica del sistema serotoninérgico. Existen pocos estudios que describen patrones morfológicos relacionados al SERT en estas regiones (Zhou y cols., 1996; Zhou y cols., 1998). Sin embargo, ésta es la primer descripción diferencial de patrones morfológicos regionales.

A continuación se muestra un grupo de imágenes correspondiente a la ir-SERT en las regiones cerebrales estudiadas en las ratas prepúberes en condiciones control y estrés por NF. Debajo se agregan las gráficas correspondientes a distribución de la ir-SERT por región y por condición de estrés en el septum lateral (la explicación de las gráficas se encuentra más adelante en el texto).

PRE-PUBERALES (PN 24-32)

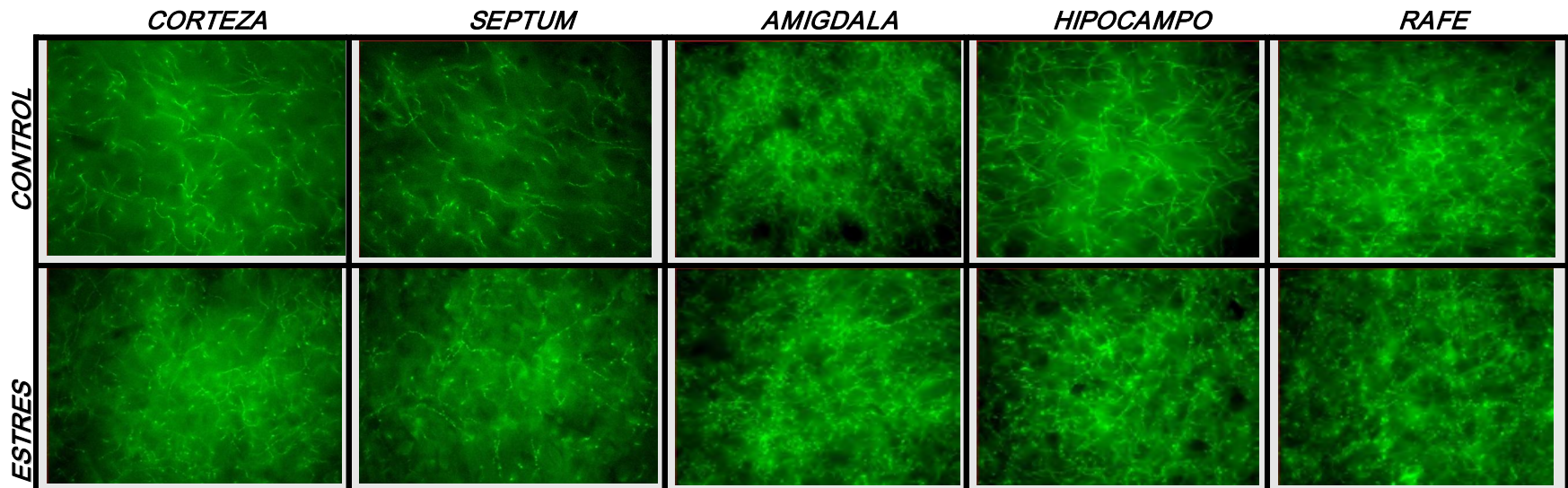
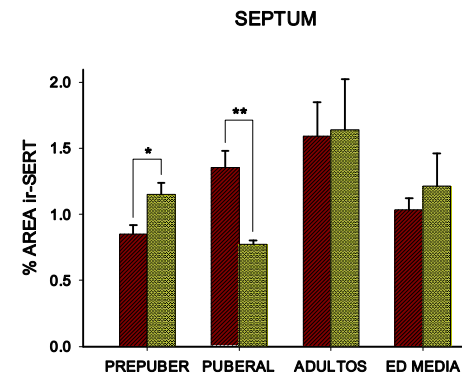
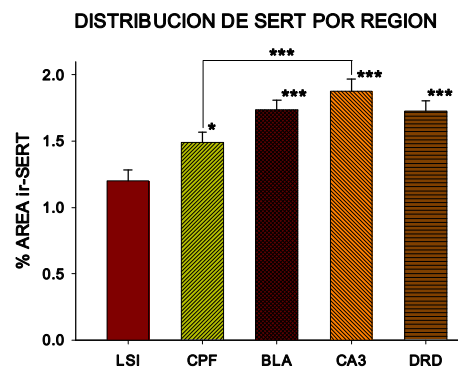


Tabla 7.9 Fotomicrografías correspondientes a la inmunofluorescencia de cortes coronales de cerebro de ratas en edad prepuberal. Se pueden apreciar los patrones morfológicos encontrados en cada estructura, así como un incremento en la densidad de fibras en el septum lateral de ratas sometidas a estrés por nado forzado. En correspondencia se agregan la gráficas de ir-SERT en esta región cerebral.



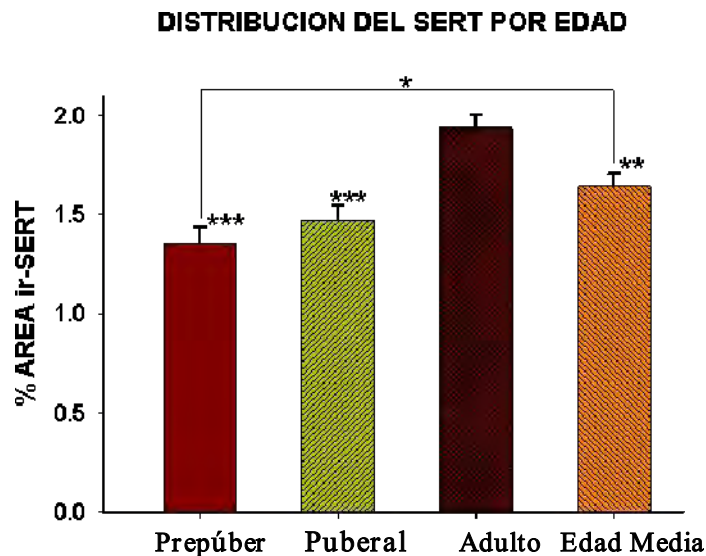
7.5 NIVELES DEL SERT

INFLUENCIA DE LA EDAD, EL ESTRÉS Y LA REGIÓN CEREBRAL

Para determinar la influencia de la edad, el estrés y la región cerebral en la expresión del SERT utilizamos un ANOVA de tres vías. Se encontraron diferencias por los factores edad ($F_{3,120}=17.641$, $p < 0.001$) y región cerebral ($F_{4,120}=15.405$, $p < 0.001$), y sólo una tendencia en el factor estrés ($F_{1,120}=3.218$, $p=0.075$). De forma interesante, en la interacción de factores estrés y edad se encontró una diferencia significativa ($F_{3,120}=4.923$, $p=0.003$).

EDAD

Para comparar la ir-SERT por edad se sumaron los valores de las cinco regiones cerebrales y de las condiciones control y estrés en cada grupo de edad. Se encontró que en las ratas adultas tuvieron significativamente más ir-SERT respecto a los otros tres grupos de edad (*post-hoc* de Tukey $p < 0.001$ contra ratas prepúberes y puberales, y $p < 0.005$ contra ratas de edad media). El incremento en la expresión del SERT

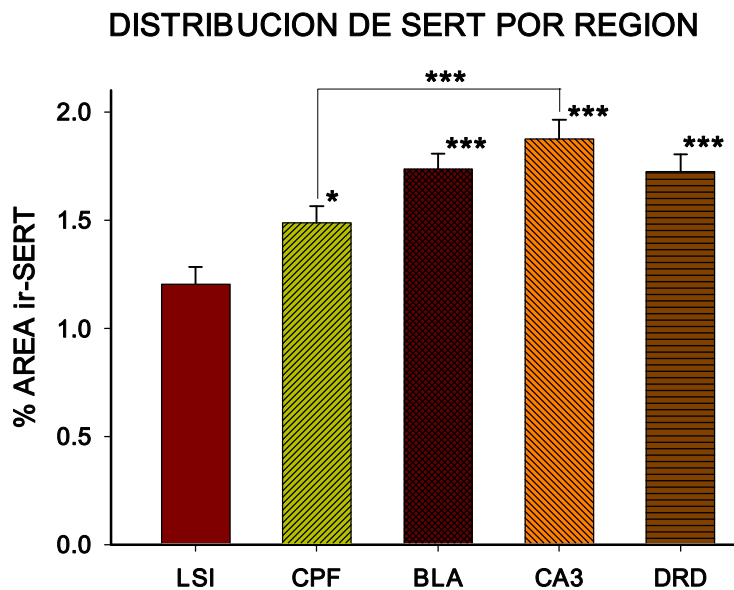


GRAFICA 7.10 Distribución del área ir-SERT considerando sólo el factor edad (cada barra incluye la suma de los valores de todas las regiones en condiciones control y estrés). Resultados de la prueba de Tukey. Los asteriscos sin corchete son contra adultos ($n=8$, para cada grupo). * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$

observado en la edad adulta comenzó a decaer con el envejecimiento, llegando a ser equivalente a la encontrada en animales adolescentes, pero significativamente diferente de la encontrada en prepúberes (*post-hoc* de Tukey: $p=0.006$). El grupo de animales puberales no mostró un incremento significativo en la expresión del SERT respecto a los prepúberes.

REGIÓN CEREBRAL

Se comparó la suma de los valores de todas las edades y condiciones en cada región cerebral. Se encontró que en el septum lateral intermedio hubo menos ir-SERT que en la corteza prefrontal (*post-hoc* de Tukey: $p<0.05$) y tal diferencia se acentuó en comparación con el núcleo basolateral amigdalino, la región CA3 del hipocampo ventral y los núcleos dorsales del raqué (*post-hoc* de Tukey: $p<0.001$). De estas últimas regiones, sólo la región CA3 del hipocampo mostró mayor ir-SERT, significativa respecto a la



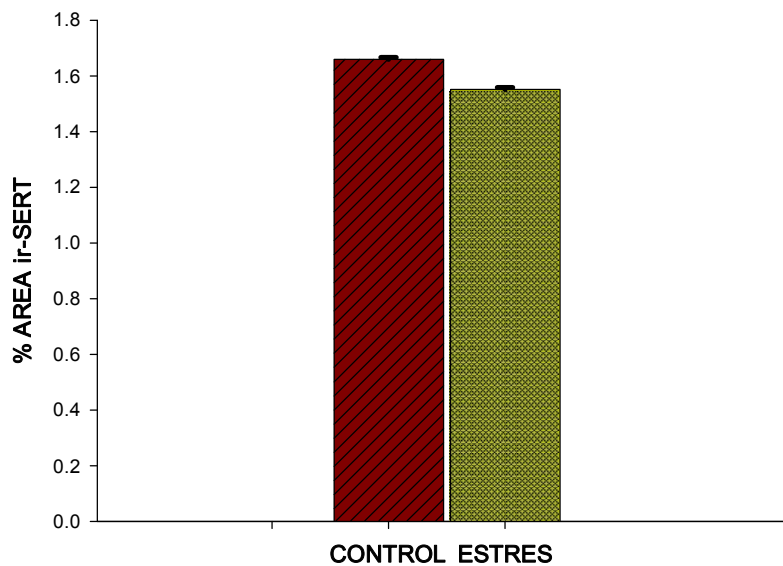
GRAFICA 7.11 Distribución del SERT considerando sólo el factor región cerebral (cada barra incluye la suma de los valores de todos los grupos edad en condiciones control y estrés). Septum lateral intermedio: SLI; corteza prefrontal: CPF; núcleo basolateral de la amígdala: BLA; Región CA3 hipocampal: CA3; núcleos dorsales del raqué dorsal: DRD Resultados de la prueba de Tukey: * $p<0.05$, *** $p<0.001$; (n=4) Los asteriscos sin corchete son contra SLI.

corteza prefrontal (*post-hoc* de Tukey : $p < 0.001$). La amígdala mostró únicamente una tendencia a una mayor expresión del SERT respecto a la corteza (*post-hoc* de Tukey : $p = 0.078$).

ESTRÉS

Para comparar la ir-SERT en condición control y estrés por nado, se sumaron los valores de ir-SERT de las cinco regiones cerebrales estudiadas en los cuatro grupos de edad. Encontramos una tendencia a reducir los niveles de ir-SERT asociada con el estrés por nado forzado (ANOVA de 3 vías: $F_{1,120} = 3.218$, $p = 0.075$).

EFFECTO DEL ESTRES POR NADO SOBRE LA EXPRESION DEL SERT

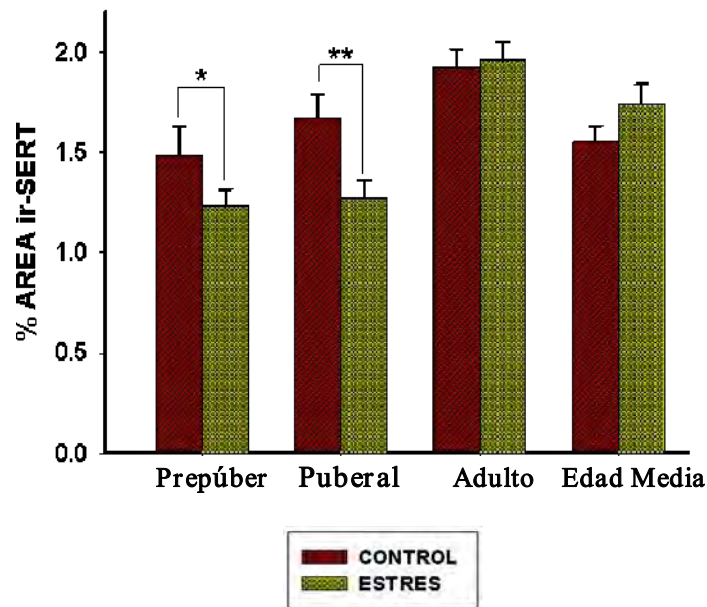


GRAFICA 7.12 Efecto del estrés por nado forzado sobre la expresión del área ir-SERT, independientemente de la region y la edad (cada barra incluye la suma de los valores de todas las regiones y edades). Existe una tendencia a reducir la expresión del SERT con el estrés, tendencia que se vuelve significativa en los grupos juveniles (*vide infra*). Resultados de la prueba de Tukey; $p = 0.075$

ESTRÉS / EDAD

En la interacción de los factores edad y condición de estrés, la prueba de Tukey mostró que el estrés por nado reduce significativamente el área ir-SERT en las ratas prepúberes ($p=0.034$) y en las ratas puberales ($p=0.001$), sin mostrar cambios significativos en las ratas adultas y de edad media.

EFFECTO DEL ESTRÉS POR NADO SOBRE EL SERT



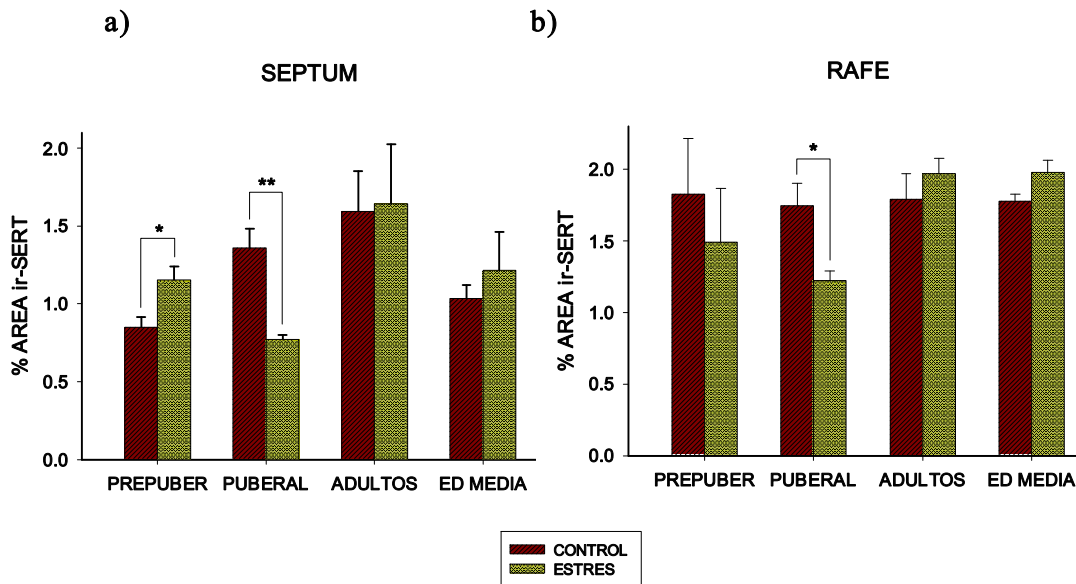
GRAFICA 7.13 Efecto del estrés por nado forzado sobre el área fluorescente ir-SERT (cada barra incluye la suma de los valores de todas las regiones cerebrales) de cada grupo de edad ($n=4$). Resultados de la prueba de Tukey; $*p<0.05$, $**p<0.005$

ESTRÉS / REGIÓN

Para conocer el efecto del nado forzado sobre el porcentaje de área ir-SERT en cada región, se realizaron ANOVAs de 2 vías considerando como factores la edad y la condición de estrés.

En el septum lateral encontramos diferencias significativas por edad ($F_{3,24}=4.13$, $p < 0.05$). Los resultados indicaron que las ratas adultas tienen mayor ir-SERT que los otros grupos de edad. El análisis demostró el estrés por nado afecta de manera negativa al grupo de ratas puberales (*post-hoc* de Tukey: $p < 0.05$) Las pruebas de *t* de Student indicaron que las ratas prepúberes con estrés por nado incrementaron de manera significativa el área ir-SERT en esta región ($p=0.032$).

En el rafe dorsal de las ratas puberales se encontró que el estrés por nado reduce significativamente el área ir-SERT en ratas puberales (prueba de *t* de Student: $p=0.023$).



Gráficas 7.14 Efecto del Estrés por nado sobre el área ir-SERT en los 4 grupos de edad en: a) septum lateral intermedio; b) sobre los núcleos del rafe dorsal. Anova de dos vías. *Post-hoc* de Tukey y pruebas de *t* de Student. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. ($n=4$, en cada grupo).

En resumen, el efecto del nado forzado tuvo efectos significativos en el septum lateral de ratas prepúberes y puberales, así como en el rafe dorsal de ratas puberales. A continuación presentamos un comparativo de imágenes en éstas regiones y edades para las condiciones control y estrés, mostrando debajo el área- ir-SERT de cada imagen

original, con la finalidad de ilustrar los cambios encontrados en el área ir-SERT. En la figura 7.15 se puede apreciar un incremento en la densidad de fibras encontradas en el septum de ratas prepúberes en condición de nado forzado. En la figura 7.16 puede observarse menor densidad de fibras en el corte cerebral del septum de una rata puberal en condición de estrés por nado forzado. Finalmente, en la imagen 7.17 se observa menor densidad de fibras ir-SERT en el corte del rafe dorsal de una rata puberal en condición de estrés por nado.

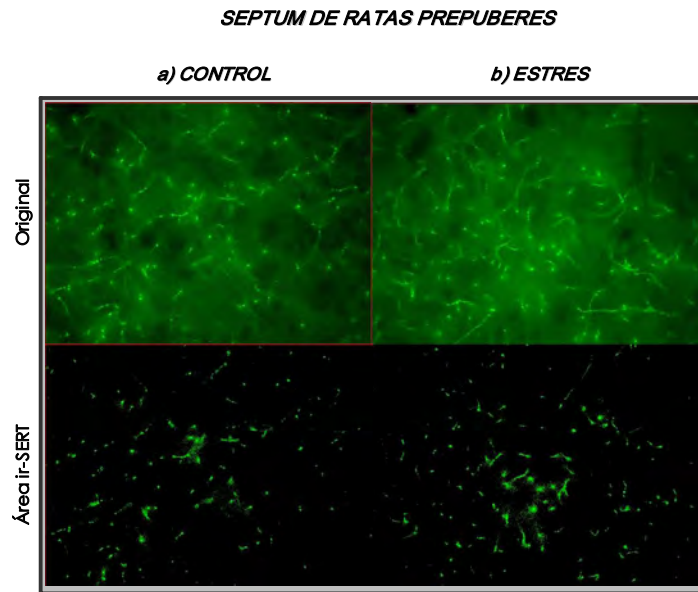


Figura 7.15 Fotomicrografías de epifluorescencia (40x) del septum lateral de ratas prepúberes en a) sin NF o en b) con NF. Puede apreciarse mayor densidad de fibras ir-SERT bajo condiciones de estrés.

SEPTUM DE RATAS PUBERALES

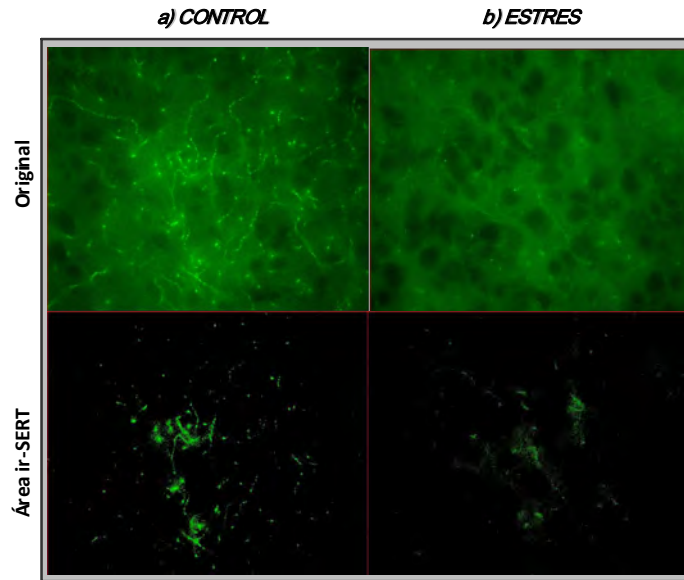


Figura 7.16 Fotomicrografías de epifluorescencia (40x) del septum lateral de ratas puberales en a) sin NF o en b) con NF. Pueden apreciarse menor densidad de fibras ir-SERT bajo condiciones de estrés.

RAFE EN RATAS PUBERALES

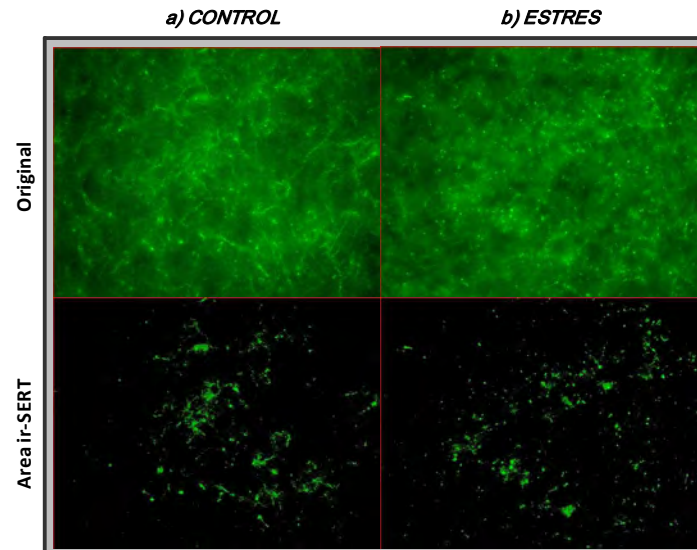


Figura 7.17 Fotomicrografías de epifluorescencia (40x) del rafe dorsal de ratas puberales en a) sin NF o en b) con NF. Puede apreciarse menor densidad de fibras ir-SERT bajo condiciones de estrés.

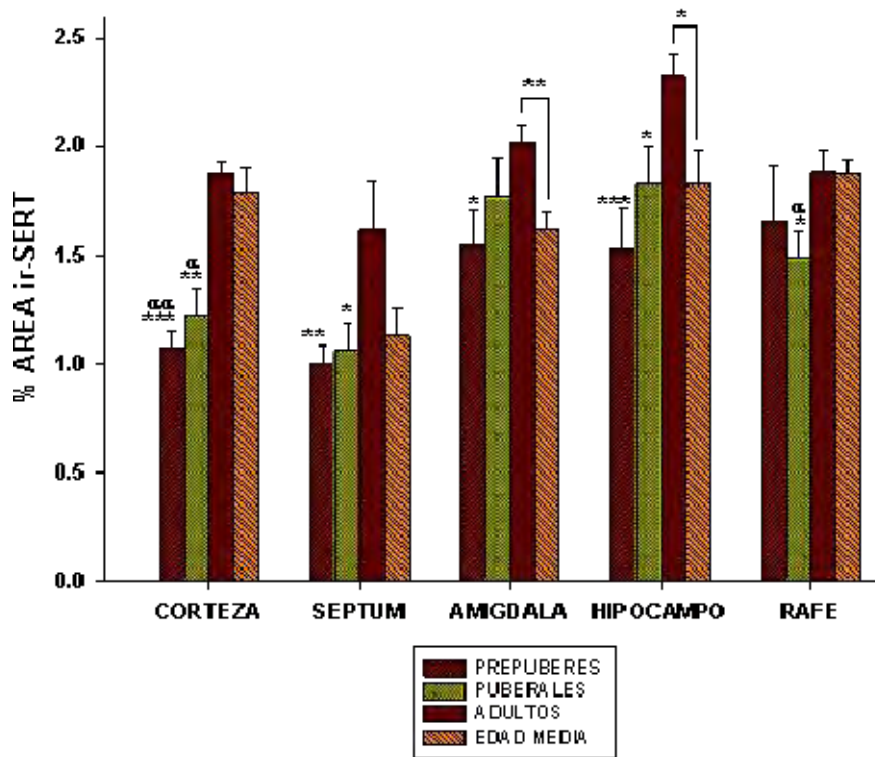
REGION / EDAD

Encontramos diferencias significativas en el área ir-SERT asociadas con la edad en cada región cerebral.

En la corteza prefrontal el grupo de adultos mostró mayores niveles del área ir-SERT en relación con los prepúberes ($p < 0.001$) y los puberales ($p = 0.005$); el grupo de edad media mostró más niveles de ir-SERT que los prepúberes ($p = 0.002$) y puberales ($p = 0.020$). Entre adultos y edad media no se encontró diferencia significativa ($p = 0.97$).

En el septum lateral, encontramos mayor área ir-SERT en el grupo de ratas adultas que el grupo de los prepúberes (Tukey; $p = 0.008$) y los puberales (Tukey; $p = 0.023$); el grupo de edad media mostró una tendencia estadística a la baja en el área ir-SERT (Tukey; $p = 0.053$).

DISTRIBUCION DEL SERT POR EDAD EN CADA REGION



GRAFICA 7.18 Distribución del área ir-SERT por región cerebral en diferentes edades de la rata. Se presenta al grupo de adultos como control. Cada barra incluye la suma de ratas en condición control y ratas en condición de nado. Cada grupo de edad: $n = 8$. Resultados de la prueba de Tukey y pruebas de t. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. Los asteriscos * sin corchete indican la comparación con adultos; los símbolos “ α ” son contra el grupo de edad media

En el núcleo basolateral de la amígdala encontramos que el grupo de adultos presentó significativamente más porcentaje de área ir-SERT que prepúberes (prueba de *t* de *Student*, $p=0.020$) y que el grupo de edad media (prueba de *t* de *Student*, $p=0.004$)

En la región HCA3, los adultos mostraron significativamente más área ir-SERT respecto al grupo de prepúberes ($p<0.001$); encontramos una tendencia de mayor expresión del SERT en adultos, respecto a puberales y al grupo de edad media (prueba de Tukey; $p=0.05$), tendencia que fue confirmada con pruebas de *t*: adultos contra puberales ($p=0.025$); contra edad media ($p=0.017$)

En los núcleos dorsales del rafé encontramos una menor expresión del SERT en ratas puberales respecto del grupo de adultos (prueba de *t* de *Student*, $p=0.028$) y del grupo de edad media (prueba de *t* de *Student*, $p=0.014$)

Correlación entre la PNF y la ir-SERT

Para establecer una posible relación entre la conducta en la prueba de nado y la cantidad de ir-SERT se realizó una correlación de Pearson entre éstas variables. No hubo significancia en las correlaciones. Sin embargo, se encontró que la correlación entre la inmovilidad y la ir-SERT en el septum lateral tiene un valor positivo en las ratas prepúberes ($r=0.47$) y un valor negativo en las ratas puberales ($r = -0.39$); la correlación entre la inmovilidad y la ir-SERT en el rafé dorsal de las ratas puberales tuvo un valor positivo en los dos grupos juveniles ($r =0.66$ en prepúberes y $r = 0.2$ en puberales).

8. DISCUSION

Los resultados del presente trabajo pueden resumirse de la siguiente manera: El desarrollo de la desesperanza (conducta de inmovilidad) entre los grupos de edad juvenil en la PNF fue muy parecido; sin embargo el impacto de la preprueba fue mayor para los animales de edad puberal. En la prueba, se presentaron diferencias en la conducta tipo depresiva (representada por la inmovilidad) relacionadas a la edad, ya que las ratas puberales (40-41 días) y de edad mediana (12 meses) mostraron mayores niveles de conducta depresiva. La ir-SERT cambió de acuerdo a la edad de los animales, la estructura cerebral, y en algunos casos (grupos juveniles) al estrés por nado forzado. Los grupos con menores niveles de ir-SERT fueron los prepuberales y los de mediana edad, mientras que los más sensibles al estrés por nado forzado fueron los dos grupos de animales juveniles.

8.1 PREPRUEBA DE NADO FORZADO

La prueba de nado forzado es un modelo sensible a terapias antidepresivas farmacológicas y no farmacológicas. La primera sesión de nado forzado tiene la finalidad de promover el desarrollo de la desesperanza y de inducir cambios neuroquímicos y conductuales que permiten la evaluación de los fármacos antidepresivos 24 horas después (Porsolt., 1977; Borsini y Meli, 1988). Un estudio previo en el cual se utilizó una versión modificada de la PNF mostró que las ratas prepuberales (21 días) son incapaces de desarrollar la conducta de inmovilidad en la segunda sesión de nado. De hecho, fue necesario el uso de un estresor adicional a la preprueba para mantener la conducta de inmovilidad 24 horas después (Bernal-Morales y cols., 2009). En contraste, el presente estudio demuestra, por un lado, que las ratas macho de diferentes edades, desarrollan la inmovilidad a lo largo de la sesión de preprueba, y por otro, que el estímulo estresante es tan intenso que mantiene la inmovilidad 24 horas después, independientemente de la edad de los sujetos. Es posible que las diferencias metodológicas entre ambos estudios se relacionen al desarrollo y mantenimiento de la inmovilidad en las ratas prepúberes. Las principales diferencias metodológicas son la forma del estanque, que es cilíndrica en nuestro estudio, la profundidad del agua, que rebasa la altura de la rata, y la medición de la inmovilidad y las conductas activas, que en nuestro estudio se determina cuantificando el número de episodios con un método de registro instantáneo.

Las ratas prepúberes mostraron menor inmovilidad que los puberales en los primeros 5 minutos de la preprueba, resultados que concuerdan con los datos sobre la prevalencia de la depresión en humanos, la cual se incrementa de la infancia hacia la adolescencia en más de 4 veces (Birmaher y cols., 1996; Kessler y cols., 2001). Por otro lado la preprueba generó mayor inmovilidad en las ratas puberales, confirmando que el modelo de PNF tiene mayor impacto sobre ratas con mayor desarrollo.

8.2 SESIÓN DE PRUEBA DE LA PNF

Durante la prueba de nado, las ratas pre-puberales mostraron significativamente menor inmovilidad y mayor escalamiento que las ratas puberales. Es posible que factores ligados al desarrollo participen en este perfil conductual, por ejemplo la elevación en la concentración plasmática de testosterona en la adolescencia media (Lupien, y col, 2009). Por otra parte, los resultados de las conductas activas, nado y escalamiento en ratas prepúberes, sugieren que los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico continúan en desarrollo en ésta edad (como lo confirman los resultados de la ir-SERT por edad). Se ha demostrado que la conducta de escalamiento se asocia a la activación de los sistemas noradrenérgico y dopaminérgico (Cryan y cols., 2002; 2005), mientras que la conducta de nado se relaciona con la activación del sistema serotoninérgico (Detke y cols., 1995). De forma interesante, las ratas prepúberes mostraron mayor conducta de escalamiento, lo cual podría estar relacionado con el desarrollo de las catecolaminas y su asociación con el sistema motor. Duncan y colaboradores, en 1993 reportó que los sistemas noradrenérgico y dopaminérgico están relacionados con la actividad motriz, a través de la activación del septum, y que este tipo de activación está asociado con las conductas observadas durante la PNF (Duncan y cols., 1993).

Los datos sobre prevalencia muestran que la depresión se incrementa a partir de la adolescencia (Birmaher y cols., 1996; Bylund y Reed, 2007) y en concordancia, nuestros resultados de la PNF muestran que la conducta de inmovilidad es mayor en la edad puberal. Para analizar estas diferencias, consideraremos aspectos de maduración neuronal, especialmente del eje HHA y del perfil endocrino de cada edad.

Para entender la maduración de los sistemas neuronales se han empleado diversos criterios como son el crecimiento dendrítico, los niveles de neurotransmisores y sus transportadores, así como el volumen de las regiones cerebrales, como el hipocampo y los lóbulos frontales (Bylund y Reed, 2007). Se sabe que durante la adolescencia se desarrollan varios sistemas neuronales (como el serotoninérgico y noradrenérgico; Bylund y Reed, 2007) y regiones cerebrales como el hipocampo y la corteza prefrontal (Mc Ewen, 2009), lo cual sugiere que el menor desarrollo en las ratas prepúberes pudiera estar implicado en las conductas observadas durante la PNF (baja inmovilidad y alto escalamiento). En este sentido, es común que algunos cambios en los sistemas de neurotransmisión por variables como la edad, el sexo y la condición endocrina sean evidenciados en varias pruebas conductuales hasta que se reta al organismo con los tratamientos farmacológicos (Fernández-Guasti y Martínez-Mota, 2003; Martínez-Mota y cols., 2008), por lo que es probable que a pesar de observar que las ratas juveniles muestran un desarrollo adecuado de las conductas en la PNF, similar a lo encontrado en adultos (Martínez-Mota y cols., 2005) sí existan modificaciones de los sistemas de neurotransmisión asociados al desarrollo. De hecho, algunos autores han reportado la falta de eficacia de tratamientos antidepresivos en animales prepuberales, y sugieren como tratamientos efectivos exclusivamente a los ISRS (Malkesman y Weller, 2009).

La expresión de la conducta de inmovilidad está ligada directamente a la activación del eje HHA. Investigaciones del grupo de Irving Lucki (López-Rubalcava y Lucki, 2000) han encontrado que cepas más vulnerables al estrés, como la Wistar Kyoto, exhiben mayor conducta de inmovilidad en la PNF respecto a otras cepas de ratas, y que dicho cambio conductual está positivamente correlacionado con la elevación de los niveles plasmáticos de corticosterona y ACTH, hormonas que son utilizadas como marcadores de la respuesta de estrés. Asimismo, la administración de diferentes fármacos antidepresivos y hormonas con acciones antidepresivas en la PNF disminuyen la conducta de inmovilidad a la par que reducen los niveles de corticosterona (Detke y cols., 1999; Kirby y cols. 1997; López-Rubalcava y Lucki, 2000). En este sentido, diferentes investigaciones han mostrado que el eje HHA sufre un proceso de desarrollo a lo largo de la vida de los mamíferos, mostrando mayor vulnerabilidad al estrés durante la edad prenatal y la infancia (Bylund, 2007; Lupien, 2009; Juruena, 2007). Sin embargo la edad puberal parece ser especialmente sensible al estrés y la depresión (Birmaher y cols., 1996; Lupien y cols., 2009; Purper y cols., 2002) ya que comienza a sufrir una influencia de parte del eje gonadal (Lupien y cols., 2009). Nuestros

resultados en la prueba de NF en el grupo de animales puberales, los cuales muestran mayores niveles de conducta de inmovilidad, apoyan esta idea.

Es posible especular que las diferencias conductuales encontradas entre los animales prepúberes y puberales se debe a la participación de las hormonas en la conducta depresiva. Algunos trabajos han mostrado que los niveles séricos de testosterona se incrementan con la adolescencia (Lamberts y cols., 1997). De acuerdo con estudios previos (Martínez-Mota y cols., en revisión) las edades en que fueron utilizados nuestros animales se caracterizan por mayores niveles de estradiol en ratas prepuberales, que a su vez presentan niveles de testosterona en el límite inferior de detección. En el trabajo realizado en nuestro equipo de investigación, se encontró que los niveles de estradiol en ratas prepúberes macho bajo el mismo esquema de PNF, se incrementan hasta 5 veces respecto de los niveles basales, mientras que en los adultos sólo se incrementa el doble (Martínez-Mota y cols., en revisión). En varios trabajos se ha demostrado que los estrógenos tienen un efecto antidepresivo en la PNF (Estrada-Camarena y cols., 2003). Por esta razón podemos proponer una relación entre el incremento de estrógenos con el nado forzado en ratas prepuberales y sus bajos niveles de inmovilidad. A su vez, los receptores a estradiol han sido identificados en distintas regiones cerebrales, entre ellas la amígdala, el septum y el rafe (McEwen, 1976, en Purves y cols., 2004), lo que permitiría una menor expresión de la inmovilidad en individuos juveniles, por acción de los estrógenos sobre sus propios receptores. Este mecanismo ha sido elucidado en ratas hembras, las cuales fueron tratadas con estradiol y con un antagonista de los receptores a estrógenos (Estrada-Camarena y cols., 2006).

Algunos trabajos sugieren que las hormonas gonadales modulan de diferente manera la maduración del eje HHA: mientras la testosterona reduce la reactividad del eje HHA ante el estrés (Viau, 1996; Romeo, 2010), los estrógenos y la progesterona la incrementan (Romeo, 2010). Además de sus acciones activacionales, las hormonas gonadales también interactúan a través de acciones organizacionales sobre el eje HHA. En un trabajo reciente se demostró que ratas macho castradas en edad prepuberal presentan una reducción de hasta el 50% de receptores a glucocorticoides en la formación hipocampal, indicando que las hormonas gonadales modulan positivamente los niveles cerebrales de GR en áreas involucradas con la función del eje HHA (Evuarherhe, 2009).

Diversos trabajos han demostrado que los niveles de estradiol tienen un efecto variable sobre la conducta depresiva, de manera que alteraciones en los niveles fisiológicos de estradiol, tanto a la baja como a la alta, pueden elevar las conductas depresivas en mujeres, como es el incremento de estrógenos durante la adolescencia o el decremento en la menopausia, así como aumentar las conductas de tipo depresivas en modelos animales, como la inmovilidad en la PNF (Kessler y Walters, 1998; Young y cols., 2000). En los trabajos de Walf y Frye (2005) se demostró que existe un rango de concentraciones de estradiol que tiene efectos benéficos en pruebas de ansiedad y depresión y que dosis superiores e inferiores a los niveles fisiológicos, incrementan las conductas ansioso depresivas (Walf y Frye, 2005). Como se mencionó más arriba, en nuestro equipo de trabajo se encontró que las ratas macho prepúberes presentan bajos niveles de T y elevados niveles de E₂, un perfil endócrino similar al de las hembras (Martínez-Mota y cols., en revisión), y ante el nado forzado se encontró que elevan los niveles de E₂ en mayor medida y muestran menor inmovilidad. Las diferencias encontradas en las ratas puberales y de edad media sugieren que existe una asociación entre las alteraciones endocrinas que ocurren en esta etapa (elevación de T en la pubertad y decremento con la edad media) con la mayor inmovilidad encontrada en estos grupos.

Datos del laboratorio indican que las ratas puberales macho presentan un perfil endocrino similar al de los machos adultos, con elevados niveles de T y reducidos niveles de estradiol, y ante el estrés por nado se incrementa principalmente la T. Existe la posibilidad de que aunque la T se metabolice a estradiol, vía aromatasa, no alcance una concentración suficiente para contrarrestar el impacto del NF sobre la conducta, y que por lo tanto se observe una mayor inmovilidad en los puberales respecto a los animales más juveniles (Se sabe que la actividad de esta enzima alcanza sus niveles más altos durante la juventud, Pombo, 1997).

Al igual que las ratas puberales (40-41 días), las de mediana edad (12-13 meses) mostraron mayor inmovilidad y menores conductas activas que las ratas prepúberes y las adultas jóvenes. Se sabe que con la edad media, inicia una etapa de deterioro de las funciones neuroendocrinas, lo cual se asocia con el hecho de que en la vejez se presenten los índices más elevados de depresión y suicidio en poblaciones como las de Estados Unidos (Reynolds III and Kupfer, 1999). Previamente, en nuestro grupo de trabajo se estudió el efecto del estrés crónico moderado (CMS) en ratas macho de esta misma edad, y se encontró una importante disminución en el consumo de sacarosa (anhedonia) además de un decremento en los niveles

plasmáticos de T y E₂, lo cual viene a confirmar la susceptibilidad de este grupo al estrés (Herrera-Pérez y cols., 2008), y sugiere que existe una disminución del efecto neuroprotector que confieren las hormonas gonadales. Existen reportes previos que indican además, una importante disminución de otros esteroides, como son la dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato (DHEAS) en la vejez (Lamberts, 1997). Por otra parte los individuos viejos presentan elevados niveles de GC (Herrera-Pérez y cols., 2008; Kakiuchi y cols., 2001). Los bajos niveles de hormonas gonadales, la elevación de GC y el deterioro neuroendocrino generalizado pudieran explicar la elevación de la conducta de inmovilidad observada durante la PNF. A su vez, nuestros datos confirman que la vejez es un factor de riesgo para incrementar la conducta depresiva, no sólo en un modelo de estrés crónico, como el CMS, sino también en un modelo de estrés agudo como la PNF. Esta mayor inmovilidad no se relaciona con el mayor peso corporal de los animales, ya que previamente se demostró que ratas machos de 3 meses, castradas, quienes alcanzan un peso equivalente al de los animales de mediana edad, no desarrollan la conducta de inmovilidad en la PNF (Martínez-Mota y cols., 2004).

8.3 EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR

Cambios en el SERT por Región

Las imágenes de la ir-SERT muestran patrones morfológicos característicos por región. En trabajos previos con anticuerpos contra los primeros 71 a.a. del extremo N-terminal del SERT mostraron un patrón de fibras finas, curvadas, ramificadas y con abundantes varicosidades en las terminales serotoninérgicas en la corteza frontal, los núcleos del rafe dorsal y el hipocampo, mientras que en las vías neuronales serotoninérgicas (hacia el hipocampo y el septum), se encontró un patrón de fibras gruesas, rectas y sin ramificaciones sugiriendo que la inmunoreactividad del anticuerpo estaba señalando fibras del sistema serotoninérgico (Zhou y cols., 1996). El anticuerpo que usamos en este estudio está dirigido a los primeros 85 a.a. del extremo N-terminal, por lo cual los patrones morfológicos mostrados son muy similares a los descritos por el equipo de Zhou (1996). No obstante, ni el equipo de Zhou ni otros investigadores, reportan patrones morfológicos del SERT en regiones relacionadas con el estrés y la depresión. Nuestras observaciones sugieren que el SERT y las fibras

serotoninérgicas donde se encuentran, tienen patrones morfológicos específicos en cada región cerebral.

Una ventaja de la técnica de inmunofluorescencia es que nos permite marcar y visualizar una proteína en su sitio de acción, con una gran especificidad de la región y subregión que queremos cuantificar. No son trascendentes las diferencias de volumen de las estructuras, ya que esta técnica nos permite evaluar proporciones del SERT en cada región seleccionada. Hasta el momento no existen reportes que hayan cuantificado al SERT en animales sometidos a la PNF, por lo que este es uno de los primeros trabajos que se realizan en este modelo.

Encontramos diferencias en los niveles del SERT de acuerdo a la región cerebral analizada, lo cual implica que el SERT se distribuye de una manera regionalmente diferencial. La expresión de este transportador fue menor en el septum y la corteza (Gráfica 7.6.), mayor en la amígdala y el rafe, asimismo, los niveles más altos se encontraron en el hipocampo. Estos resultados podrían tener relevancia en el sentido fenomenológico y farmacológico de la depresión. En el primer sentido, se ha mencionado que cada región participa de una manera determinada en la respuesta al estrés y en el desarrollo de la depresión (Kirby y cols., 1995; Cryan y cols., 2005). Es importante recordar que el rafe es el principal reservorio de 5HT en el cerebro y la mayor fuente de proyecciones serotoninérgicas: en el caso del rafe dorsal, estas proyecciones se dirigen hacia los lóbulos frontales, donde se encuentra el septum lateral. El septum es una región involucrada en la respuesta de alerta y la conducta activa ante el estrés, mientras que la amígdala participa en la memoria emocional, la respuesta de miedo y ansiedad involucrados en el estrés. Por esta razón, la distribución diferenciada del SERT implicaría una distinta participación de este transportador en la regulación del sistema serotoninérgico. El efecto antidepressivo de los ISRS se realiza especialmente en su interacción dentro del septum y al rafe dorsal (Kirby y Lucki, 1997; Cryan y cols., 2005), por lo que la expresión del SERT en estas regiones es fundamental para la respuesta al tratamiento con los ISRS.

Cambios en el SERT por Edad

Los humanos de diferentes edades no responden de la misma manera al tratamiento farmacológico con fármacos antidepressivos (Birmaher y cols., 2006), entre ellos a los que tienen como sitio blanco al SERT. El SERT juega un importante papel en la regulación

presináptica de la transmisión serotoninérgica (Zhou, 1996), neurotransmisor con una importante participación en el desarrollo (Lauders, 1990; Ansorge y cols. 2004; Malkesman, 2009) cuyas concentraciones varían a lo largo de la vida del individuo. Algunos autores sostienen que el SERT alcanza los niveles del adulto desde el nacimiento, mientras que los niveles de neurotransmisión e inervación del sistema serotoninérgico lo hacen a las 3 semanas posnatal (Bylund, 2007). Estudios con monos *rhesus* demostraron que individuos viejos presentan menor densidad y funcionalidad del SERT (Kakiuchi, 2001). Por esta razón nuestra hipótesis plantea que el SERT se incrementa con la edad y decae con la vejez. En este estudio encontramos que en efecto, en la rata macho Wistar, la expresión del SERT se incrementa hacia la edad adulta, y decae con la edad media. Esto sugiere que los bajos niveles del sitio blanco, pudieran guardar una asociación con la pobre respuesta antidepressiva observada con los tratamientos de ISRS en individuos en desarrollo y durante la vejez.

Cambios en el SERT por Estrés

Los resultados indican que el estrés por nado forzado está asociado con una tendencia al decremento de los niveles del SERT en regiones cerebrales asociadas a la depresión. De forma interesante el análisis estadístico mostró diferencias en la interacción entre la condición de estrés por nado más la edad, lo cual indica que el estrés por nado no afecta de la misma manera los distintos grupos de edad. De manera más clara, la gráfica correspondiente (gráfica 7.8) nos muestra que los grupos juveniles fueron más sensibles al nado forzado, el cual indujo un decremento de la expresión del SERT. Por el contrario, los grupos de animales adultos mostraron una resistencia a modificar el SERT después del nado forzado. La función del SERT es recapturar la 5HT (Zhou y cols., 1998). El bloqueo de esta proteína, por fármacos específicos, conlleva un incremento en los niveles de 5HT (Stahl, 1998). Por esta razón los resultados refuerzan la idea de que el estrés por nado reduce los niveles y funcionalidad del SERT de una manera regionalmente específica (Joeyen-Waldorf et al, 2009; Fumagalli y cols., 1996) de manera más sensible en el septum lateral y el rafé dorsal (*vide infra*) de las ratas juveniles. Si esta idea es cierta, es probable que la exposición constante al estrés en etapas tempranas del desarrollo tenga una repercusión importante en la neurotransmisión serotoninérgica en la edad adulta, y por lo tanto en las diferencias en la respuesta a los ISRS en pacientes con depresión.

Varios trabajos han relacionado la respuesta prolongada del eje HHA en niños y adolescentes durante el estrés con a una incompleta maduración del asa de retroalimentación negativa (Lupien, 2009; Bylund y Reed, 2007). Algunos datos en ratas evidencian altos niveles basales de glucocorticoides en ratas juveniles (Nirupa, 2006) así como altos niveles de CRH en respuesta al estrés (Lupien y cols., 2009), lo cual indicaría mayor susceptibilidad al estrés, aunque no existan evidencias conductuales suficientes de este efecto central. Estas investigaciones junto con nuestros resultados, corroboran que los grupos juveniles son más susceptibles a los efectos del estrés agudo sobre la expresión del SERT, aunque éste sea evidente sólo en los animales puberales con una mayor expresión de la conducta de inmovilidad en la PNF respecto a los prepúberales. Es posible que este resultado se relacione a las diferencias regionales encontradas en los grupos de prepúberes y puberales sometidos a NF, ya que los prepúberes tuvieron una mayor expresión del SERT en el septum y una tendencia a menor expresión del SERT en rafe, mientras que los animales puberales mostraron una disminución en los niveles del SERT en ambas estructuras en condiciones de estrés, como lo indica la correlación negativa. En el septum lateral se han encontrado receptores a glucocorticoides. Implantes de corticosterona o dexametasona en el septum de roedores bloquean la liberación de ACTH inducida por adrenalectomía (Armario, 2006) lo cual sugiere que esta región pudiera participar en el mecanismo de retroalimentación negativa del eje HHA. Asimismo se ha reportado que los receptores a vasopresina V_{1b} en el septum, están asociados con los efectos antidepresivos de los antagonistas a este receptor (Stemmeli y cols., 2005) lo cual indicaría que la AVP liberada con la activación del eje HHA puede tener efectos de inhibición sobre el septum lateral.

Se ha demostrado que fármacos antidepresivos como la fluoxetina y el citalopram activan varios subtipos de proteínas cinasas (PK), como las PKA, PKC y PKG que inducen la fosforilación del SERT, con lo cual bloquean su función (White y cols., 2005). Otros estudios han mostrado que estrógenos como el E_2 tienen efectos antidepresivos mediante el bloqueo del SERT (Ghrif et al, 1983; Michel et al, 1987, en Estrada-Camarena y cols., 2003). Con estos antecedentes podemos sugerir que el mayor incremento de estrógenos en ratas prepúberes durante la PNF pudiera estar asociado con el bloqueo del SERT, como un efecto neuroprotector ante el estrés por nado.

Por otra parte, diferentes autores sugieren que la vejez también está asociada con una mayor vulnerabilidad al estrés. Las investigaciones de Kakiuchi (2001) con monos *rhesus* demostraron que los individuos viejos presentan mayores niveles de cortisol en la sangre que los sujetos jóvenes (Kakiuchi y cols, 2001), lo cual explicaría en parte, la mayor incidencia de la depresión en población anciana. Trabajos en nuestro laboratorio mostraron que el estrés crónico aumenta la proporción de ratas de mediana edad que desarrolla anhedonia (respecto a los jóvenes adultos), reforzando la hipótesis de que la edad aumenta la susceptibilidad a la depresión (Herrera-Pérez y cols., 2008). Investigaciones con dexametasona sugieren que los glucocorticoides exacerban algunas anormalidades en la función serotoninérgica durante la vejez, lo que contribuye a reducir la efectividad de los antidepresivos (Fumagalli y cols., 1996). Por otro lado, datos de nuestro laboratorio indican que las ratas de 15 meses tienen menor expresión del SERT en el rafe dorsal respecto a los adultos jóvenes. Sin embargo nuestro trabajo no mostró efectos significativos del estrés por nado sobre la expresión del SERT en ratas de edad media (13 meses), debido quizá a las diferencias de edad, lo que nos lleva a plantear la necesidad de estudiar la expresión del SERT en ratas de mayor edad durante la PNF.

El grupo de adultos jóvenes mostró un patrón de distribución y una respuesta al estrés por nado más estable. Mientras que los grupos de ratas prepúberes y de edad media mostraron más alteraciones en la PNF y más variantes en la distribución del SERT. Estos datos son de gran importancia si los relacionamos con los hallazgos de un estudio reciente con ratones *knock out*, heterócigos y homócigos al gen del SERT, donde se confirma que la abundancia del SERT está directamente relacionada con un mejor perfil de desempeño conductual en una serie de modelos relacionados a trastornos de personalidad y afecto, mientras que la ausencia del SERT está asociada con una mayor vulnerabilidad al estrés crónico (Joeyen-Waldorf y cols., 2009). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo nos sugieren que la menor expresión del área ir-SERT en estructuras cerebrales relacionadas con los trastornos afectivos, está asociada con una mayor vulnerabilidad al estrés y la depresión.

El efecto más significativo sobre los niveles del SERT fue encontrado en animales juveniles que fueron expuestos al estrés por NF, ya que se produjo un efecto bidireccional en sus niveles de SERT en el septum lateral y una tendencia a disminuir dichos niveles en el rafe dorsal. Se sabe que los núcleos del rafe y el septum lateral participan en la fisiopatología de la

depresión y el efecto de los fármacos antidepresivos (Purves y cols. 2002; Iversen y cols., en Kandel y cols, 2001). A su vez, trabajos previos sugieren que el estrés por nado modula la transmisión de la 5-HT de una manera regionalmente específica (Kirby y cols., 1995). Estos autores encontraron que la exposición a 30 minutos de nado forzado reduce los niveles extracelulares de 5HT en la amígdala y el septum, se incrementan en el rafe y se mantienen invariables en el hipocampo y la corteza prefrontal. En nuestro trabajo no encontramos diferencias significativas de interacción entre los factores estrés y región cerebral sobre los niveles del SERT. Sin embargo al estudiar el efecto del estrés en cada región en los animales juveniles, encontramos que existen diferencias en los niveles del SERT tanto en el septum como en el rafe dorsal (*vide infra*).

Una importante conclusión de los trabajos de Cryan y Lucki, es la que se refiere al mecanismo de acción del CRH durante el estrés por nado (Cryan y cols., 2005). Ellos sugieren que durante la exposición aguda al nado, proyecciones GABAérgicas hacia el rafe dorsal inhiben las neuronas serotoninérgicas que proyectan hacia el septum; la pérdida de los niveles fisiológicos de 5HT en el septum desinhibe la actividad septal generando la conducta activa observada. En cambio, cuando se presenta una exposición repetida al nado, de acuerdo con Cryan y colaboradores, ocurre una “desensibilización” (*sic*) del mecanismo de acción del CRH hacia el rafe dorsal; esto facilita la transmisión serotoninérgica hacia el septum, lo cual inhibe su actividad; el resultado es la respuesta pasiva observada (Cryan y cols., 2005).

Las proyecciones serotoninérgicas del rafe dorsal hacia el septum tienen funciones regulatorias de esta estructura (Cryan y cols., 2005). Los trabajos de Kirby y Lucki en los cuales midieron 5HT extracelular mediante microdiálisis, mostraron una reducción importante de los niveles de 5HT en septum lateral después de una sesión de 30 minutos de NF (Kirby y cols., 1995). De acuerdo a sus propias hipótesis, esta reducción de 5HT sucede como consecuencia de la activación de neuronas gabaérgicas en el rafe dorsal, que inhiben las neuronas que proyectan al septum. Nuestras mediciones corresponden a una segunda sesión de nado, es decir de acuerdo con la hipótesis de Cryan, durante la “desensibilización” del mecanismo CRH. De acuerdo a esta hipótesis, bajos niveles del SERT tras el nado forzado repetido (como los que encontramos en ratas puberales), podrían estar asociados con una elevación de los niveles de 5HT en el septum, lo cual concuerda con la respuesta pasiva observada en la conducta de inmovilidad en esta edad.

Resulta de interés la concordancia entre este efecto bidireccional del estrés por nado en la expresión del SERT en el septum y la conducta de inmovilidad observada durante la PNF. En el septum lateral las ratas prepúberes sometidas al NF mostraron menor conducta de inmovilidad y elevados niveles de ir-SERT, mientras que las ratas puberales mostraron altos niveles de inmovilidad y bajos niveles de ir-SERT. Los valores de correlación pudieran indicar que hay una relación entre las conductas activas y los niveles del SERT en septum lateral en ratas juveniles.

Otras investigaciones demostraron que el E₂ participa de manera positiva en la expresión de RNAm del SERT en el rafe dorsal con mayor intensidad que la T (McQueen y cols., 1997). Por esta razón podemos sugerir que los elevados niveles de estradiol que se han reportado en las ratas prepúberes sometidas a NF pudieran estar asociados con una mayor expresión del RNAm del SERT en los núcleos del rafe.

Como se mencionó en las diferencias por edad, el incremento de la ir-SERT hacia la edad adulta y el decremento hacia la edad media fue distinto en cada región. Se encontró un mayor ir-SERT en la corteza, el septum, la amígdala y el hipocampo hacia la edad adulta, y menor ir-SERT en la amígdala y el hipocampo (con una tendencia a la baja en el septum) hacia la edad media. No hubo diferencias significativas en la corteza prefrontal y en el rafe. Es de notar que incluimos ratas en edad media, por lo cual sería importante estudiar la expresión del SERT en ratas de mayor edad. No obstante, estos resultados nos sugieren que los niveles del SERT no se incrementan y decaen en la misma forma en todas las regiones, es decir, que el aumento de la ir-SERT en la juventud y su posterior decaimiento en la vejez, también es regionalmente diferencial. Al observar la distribución regional del área ir-SERT (gráfica 7.13) y de acuerdo a la significancia encontrada, podemos sugerir que el decaimiento de esta proteína en la rata pudiera ocurrir primero en amígdala, luego en hipocampo, posteriormente en septum y más tarde en corteza prefrontal y rafe. Estas diferencias regionales pueden estar implicadas en las particularidades observadas en la depresión y el estrés en cada grupo de edad, así como a la diferente respuesta a los fármacos ISRS.

9. CONCLUSIÓN

Este trabajo nos permite llegar a la conclusión de que la PNF es un modelo sensible a un importante rango de edades cruciales en la rata. Encontramos que la conducta de inmovilidad se acentúa a partir de la edad puberal, grupo que junto a las ratas de edad media, son las que muestran mayores niveles de inmovilidad en este modelo, permitiéndonos sugerir que estas dos edades son más susceptibles de desarrollar la conducta de tipo depresiva en un modelo de estrés agudo.

El estudio de la ir-SERT nos permite concluir que existen patrones morfológicos de distribución del SERT característicos de cada estructura cerebral y que los niveles de esta proteína están determinada por la edad, ya que se incrementan durante el desarrollo, se establecen en la edad adulta y decaen con la vejez, lo cual refuerza la noción de que el sistema serotoninérgico continúa en desarrollo durante la adolescencia y sufre un deterioro con la vejez.

Asimismo, encontramos que el estrés por nado afecta de forma diferencial a los grupos de edad y a las regiones involucradas en el estrés y la depresión, con mayor influencia sobre las ratas prepúberes y puberales, lo cual nos sugiere que los individuos juveniles son los más vulnerables al estrés agudo. En este caso, la PNF parece tener una asociación con los niveles de ir-SERT en septum lateral y rafé dorsal. Esto sugiere que los niveles de transportador en el septum lateral pudieran participar en la regulación de la conducta activa de esta estructura.

10. PERSPECTIVAS

Dadas las conclusiones obtenidas en este trabajo, resulta de particular interés estudiar la expresión del SERT en edades más avanzadas, lo cual nos permitiría conocer mejor los patrones de distribución y los efectos del estrés. También es de nuestro interés extender el estudio a ratas hembra, lo cual pudiera arrojar más información sobre la participación de las hormonas gonadales en la respuesta al estrés. Por otro lado podríamos complementar este trabajo con el estudio de fármacos antidepresivos, especialmente ISRS como la fluoxetina y el citalopram. Se prevé que los grupos con mayor expresión del SERT tendrán una mejor respuesta al tratamiento con inhibidores de la recaptura de 5HT. Considero importante el empleo de técnicas alternativas como el radioinmunoensayo para cuantificar hormonas esteroides y el uso de técnicas cuantitativas para medir proteínas, como el Westernblot, para complementar la información sobre la participación del SERT en la fisiopatología de la depresión. Finalmente es necesario mencionar la ventaja de combinar las técnicas inmunohistoquímicas con el estudio conductual, lo cual nos permite tener un conocimiento más integral de algunos aspectos de la depresión.

Nuestro interés principal en este trabajo fue conocer los efectos del estrés en un barrido de edades, sin embargo, posteriormente será importante estudiar las diferencias dentro de una misma estructura por subregión, nivel de los cortes cerebrales y bilateralidad.

11. REFERENCIAS

1. American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition, Text Revision (DSM-IV-TR®). 2002.
2. Anisman H. and Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models (Review). *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2005 (29): 525–546.
3. Ansorge MS, Zhou M, Lira A, Hen R, Gingrich JA. Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science*. 2004 (306)5697:879-881.
4. Armario A. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: What can it Tell us About Stressors? *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*. 2006 (5): 485-501.
5. Arora RC, Gulati A, Crayton JW. Aging and 3H-paroxetine binding in rat brain: effect of imipramine and tetrahydroacridine. *Life Sciences*. 1993 (52)22: 1767-75.
6. SK, Bathia CB, Childhood and Adolescent Depression. *American Family Physician*. 2007 (75)1: 73-80
7. Belló M, Puentes-Rosas E, Medina-Mora ME, Lozano R. Prevalencia y diagnóstico de depresión en población adulta en México. *Salud Pública México* 2005 (47) supl 1:S4-S11.
8. Benmansour S, Cecchi M, Morilak DA. Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level. *The Journal of Neuroscience*. 1999 (19): 10494 - 10501.
9. Benmansour S, Owens WA, Cecchi M, Morilak DA, Frazer A. Serotonin clearance in vivo is altered to a greater extent by antidepressant-induced downregulation of the serotonin transporter than by acute blockade of this transporter. *The Journal of Neuroscience*. 2002(22): 6766-72.
10. Bernal-Morales B, Contreras CM, Cueto-Escobedo J. Acute restraint stress produces behavioral despair in weanling rats in the forced swim test. *Behavioural Processes*. 2009 Oct (82)2: 219-22.
11. Birmaher B, Ryan ND, Williamson DE, Brent DA, Kaufman J, Dahl RE, Perel J, Nelson B. Childhood and adolescent depression: a review of the past 10 years. Part I (Review). *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1996 (35) 11:1427-39.
12. Borsini, F. y Meli, A. (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity?. *Psychopharmacology*, 94(2), 147-160.

13. Blazer D. The diagnosis of depression in the elderly. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1980 (28)2: 52-58.
14. Bruce S. and McEwen. Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology*. 2008 (583)2-3: 174–85.
15. Bylund DB. and Reed AL. Childhood and Adolescent Depression: Why do Children and Adults Respond Differently to Antidepressant Drugs? *Neurochemistry International*. 2007 (51)5: 246–53.
16. Cameron HA, Tanapat P, Gould E. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience*. 1998 (82) 2: 349-54.
17. Castrén E, Võikar V, Rantamäki T. Role of neurotrophic factors in depression. *Current Opinion in Pharmacology*. 2007 Feb (7)1: 18-21.
18. Charney DS, M.D. Psychobiological Mechanisms of Resilience and Vulnerability: Implications for Successful Adaptation to Extreme Stress. *American Journal of Psychiatry*. 2004 (161): 195-216.
19. Contreras CM, Chacón L, Rodríguez-Landa JF, Bernal-Morales B, Gutierrez-García A.G, Saavedra M. Spontaneous firing rate of lateral septal neurons decreases after forced swimming test in Wistar rat. *Progress in Neuro-Psychoph & Biological Psychiatry*. 2004 (28): 343-48.
20. Contreras CM, Rodríguez-Landa JF, Gutiérrez-García AG, Bernal-Morales B. The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurones in the rat. *Journal of Psychopharmacology*(Oxford, England). 2001 (15) 4: 231– 236.
21. Cornil CA, Dalla C, Papadopoulou-Daifoti Z, Baillien M, Balthazart J. Estradiol rapidly activates male sexual behavior and affects brain monoamine levels in the quail brain. *Behavioural Brain Research*. 2006 (166)1: 110-23.
22. Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2005 (29): 547–569.
23. Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*(Berl.). 1995 (121)1: 66-72.
24. Duncan GE, Johnson KB, Breese GR. Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of Fos-like immunoreactivity. *Journal of Neuroscience*. 1993 Sep (13)9:3932.3943.
25. Estrada-Camarena E, Fernández-Guasti AF, López-Rubalcava C. Antidepressant-Like Effect of Different Estrogenic Compounds in the Forced Swimming Test.

Neuropsychopharmacology. 2003 (28)5: 830-38.

26. Estrada-Camarena E, Fernández-Guasti AF, López-Rubalcava C. Participation of the 5-HT_{1A} Receptor in the Antidepressant-Like Effect of Estrogens in the Forced Swimming Test. *Neuropsychopharmacology*. 2006 (31)2: 247-255.
27. Evuarherhe O, Leggett JD, Waite EJ, Kershaw YM, Atkinson HC, Lightman SL. Organizational role for pubertal androgens on adult hypothalamic–pituitary–adrenal sensitivity to testosterone in the male rat. *Journal of Physiology*. 2009 (587): 2977-85.
28. Fenter CT, Naslund MJ, Shah MB, Eaddy MT, Black L. The Cost of Treating the 10 Most Prevalent Diseases in Men 50 Years of Age or Older. *American Journal of Managerd Care*. 2006 (12) Suppl.4: 90-98.
29. Frokjaer VG, Vinberg M, Erritzoe D, Svarer C, Baaré W, Budtz-Joergensen E, Madsen K, Madsen J, Kessing LV, Knudsen GM. High familial risk for mood disorder is associated with low dorsolateral prefrontal cortex serotonin transporter binding. *NeuroImage*. 2009 (46): 360–366.
30. Fumagalli F, Jones SR, Caron MG, Seidler FJ, Slotkin TA. 1996. Expression of mRNA coding for the serotonin transporter in aged vs. young rat brain: differential effects of glucocorticoids. *Brain Research*. 1996 (719)1-2:225-8.
31. Garcia A, Steiner B, Kronenberg G, Bick-Sander A, Kempermann G. Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell*. 2004 (3)6: 363-71.
32. Gold PW, Chrousos GP. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Molecular Psychiatry*. 2002 (7)3: 254-75.
33. González de Rivera JL. Introducción a la neuroendocrinología de la depresión. En “*Progresos en Psicofarmacología*”. Cepyp. España. 1980 (Tomo II): 9-14.
34. Gould E., McEwen B.S., Tanapat P., Galea L.A.M. and Fuchs E. Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Tree Shrew Is Regulated by Psychosocial Stress and NMDA Receptor Activation. *The Journal of Neuroscience*. 1997 (17)7:2492–2498.
35. Gould GG , Pardon MC , Morilak DA , Frazer A. Regulatory effects of reboxetine treatment alone, or following paroxetine treatment, on brain noradrenergic and serotonergic systems. *Neuropsychopharmacology*. 2003 (28): 1633-41.
36. Greenstein B, Greenstein A, Color Atlas of Neuroscience: Neuroanatomy and Neurophysiology. *Thieme Stuttgart*. N.Y. USA. 2000. 438pp.

37. Grupo Genética Psiquiátrica. Diferencias del metabolismo en estructuras límbicas de acuerdo a la variación alélica del polimorfismo 5HTTLPR del gen AL transportador de serotonina: un estudio piloto con PET. *Salud Mental*. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente Muñiz. 2004 (27) 001: 11-21.
38. Gulati A, Arora RC, Crayton J, Hensler JG, Ferry RC, Labow DM. Central serotonergic uptake mechanisms in hypertensive rats: effects of clonidine and cethaquin. *European Journal of Pharmacology*. 1993 (231)2: 151-56.
39. Herrera-Pérez JJ, Martínez-Mota, L, Fernández-Guasti A. Aging increases the susceptibility to develop anhedonia in male rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2008 (32)8:1798-803. .
40. Herrera-Pérez JJ. Influencia de la Edad sobre la Depresión Experimental y el Tratamiento con Citalopram en Ratas Macho. *Tesis de Maestría en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental*. CINVESTAV. IPN. 2007.
41. Himpel S, Bartels J, Zimdars K, Huether G, Adler L, Dawirs RR, Moll GH. Association between body weight of newborn rats and density of serotonin transporters in the frontal cortex at adulthood. *Journal of Neural Transmission*. 2006 113(3): 295-302.
42. Jayanthi LD. and Ramamoorthy S. Regulation of monoamine Transporters: Influence of Psychoestimulants and Therapeutic Antidepressants. *The AAPS Journal*. 2005 (7)3: E728 –E738
43. Jiang X, Wang J, Luo T, Li Q. Impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its feedback regulation in serotonin transporter knockout mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 (34)3: 317-31.
44. Joeyen-Waldorf J, Edgar N, Sibille E. The roles of sex and serotonin transporter levels in age- and stress-related emotionality in mice. *Brain Research*. 2009(1286): 84-93.
45. Juruena, MF, Clearea AJ, Pariante, CM, The Hypothalamic Pituitary Adrenal axis, Glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2004 (26)3: 189-201.
46. Kakiuchi TI., Tsukada H, Fukumoto D, Nishiyama S. Effects of Aging on Serotonin Transporter Availability and its Response to Fluvoxamine in the Living Brain: PET Study with [¹¹C](+)McN5652 and [¹¹C](-)McN5652 in Conscious Monkeys. *Synapse*. 2001 (40):170-179.
47. Kandel ER, Schwartz JH, y Jessell TM. Principios de Neurociencia. 4a Edición. *McGraw-Hill*. Madrid, España. 2001. 1400pp.
48. Kellie JW, Crystal CW, Eric LB. Serotonin Transporters: Implications for Antidepressant Drug Development. *The AAPS Journal*. 2005 (7)2: Art 42.
49. Kessler RC, Avenevoli S, Ries Merikangas K. Mood disorders in children and adolescents: an epidemiologic perspective. *Biological Psychiatry*. 2001 (49)12:

1002-14.

50. Kessler RC, Avenevoli S, Ries MK. Mood disorders in children and adolescents: an epidemiologic perspective. *Biological Psychiatry*. 2001 (49)12: 1002-14.
51. Kessler RC, Walters EE. Epidemiology of DSM-III-R major depression and minor depression among adolescents and young adults in the National Comorbidity Survey. *Depress and Anxiety*. (7)1: 3-14.
52. Kirby LG, Allen AR, Lucki I. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Research*. 1995 (682)1-2: 189-96.
53. Kirby LG, Chou-Green JM, Davis K, Lucki I. The effects of different stressors on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Research*. 1997 (760)1-2: 218-30.
54. Kirby LG, Pan YZ, Freeman-Daniels E, Rani S, Nunan JD, Akanwa A, Beck SG. Cellular effects of swim stress in the dorsal raphe nucleus. *Psychoneuroendocrinology*. 2007 (32)8-10: 1167.
55. Kovachich GB, Aronson CE, Brunswick DJ. Effect of repeated administration of antidepressants on serotonin uptake sites in limbic and neocortical structures of rat brain determined by quantitative autoradiography. *Neuropsychopharmacology*. 1992 (7)4:317-24.
56. Kovachich GB, Frazer A. Quantitative autoradiography of the serotonin transporter to assess the distribution of serotonergic projections from the dorsal raphe nucleus. *Synapse* (New York, N.Y.) 1994 (17)1: 1-15.
57. Lamberts SWJ, Van den Beld AW, Van der Lely AJ. The Endocrinology of Aging. *Science*. 1997 (278)5337: 419-424.
58. Lauder JM. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann NY Acad Sci*. 1990 (600): 297-314.
59. Lebowitz BD, Pearson JL, Schneider LS, Reynolds CF 3rd, Alexopoulos GS, Bruce ML, Conwell Y, Katz IR, Meyers BS, Morrison MF, Mossey J, Niederehe G, Parmelee P. Diagnosis and treatment of depression in late life: consensus statement update. *The Journal of the American Medical Association*. 1997 (278)14: 1186-90.
60. López-Rubalcava C, Mostalac-Preciado Ch, Estrada-Camarena E. The rat forced swimming test: An animal model for the study of antidepressant drugs. En *Models of Neuropsychopharmacology*, Rocha-Arrieta LL y Granados-Soto V (Editores). 2009 (Capítulo 10): 149-168.
61. López-Rubalcava C. and Lucki I. Strain Differences in the Behavioral Effects of Antidepressant Drugs in the Rat Forced Swimming Test. *Neuropsychopharmacology*. 2000. (22)2:191-9

62. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009 (10): 434-45.
63. Malkesman O, Weller A. Two different putative genetic animal models of childhood depression, a review. *Progress in Neurobiology*. 2009 (88)3: 153-69. .
64. Mamdani MM, Parikh SV, Austin PC, Upshur REG. Use of Antidepressants among Elderly Subjects: Trends and Contributing Factors. *American Journal of Psychiatry*. 2000 (157): 360-67.
65. Mann JJ, Arango V, Marzuk PM, Theccanat S, Reis DJ. Evidence for the 5-HT hypothesis of suicide. A review of post-mortem studies. *The British Journal of Psychiatry Supplement* 1989 (8): 7-14.
66. Markou A, Chiamulera C, Geyer MA, Tricklebank M, Steckler T. Removing Obstacles in Neuroscience Drug Discovery: The Future Path for Animal Models. *Reviews. Neuropsychopharmacology*. 2009 (34)1: 74–89.
67. Markou A, Matthews K, Overstreet DH, Koob GF, Geyer MA. Flinders resistant hypocholinergic rats exhibit startle sensitization and reduced startle thresholds. *Biol Psychiatry*. 1994 (36)10: 680-8.
68. Martínez-Mota L., Ulloa R.E., Herrera-Pérez J.J. Chavira R. and Fernández-Guasti A. Sex and age differences in the impact of the forced swimming test on the levels of steroid hormones. *Artículo en revision*. 2010.
69. McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology*. 2008. 583(2-3): 174–185.
70. McQueen J.K., Wilson H., Sumner B.E.H., Fink G. Serotonin transporter (SERT) mRNA and binding site densities in male rat brain affected by steroids. *Brain Research Molecular Brain Research*. 1999 (63)2: 241-247.
71. Mirescu C. and Gould E. Stress and Adult Neurogenesis. *Hippocampus*. 2006 (16): 233-238.
72. Murray CJ. and López AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of disease study. *Lancet*. 1997 (349)9064: 1498-1504.
73. Murrin LC, Sanders JD, Bylund DB. Comparison of the Maturation of the Adrenergic and Serotonergic Neurotransmitter Systems in the Brain: Implications for Differential Drug Effects on Juveniles and Adults. *Biochemical Pharmacology*. 2007 (73)8: 1225-36.
74. Nelson JC, Mazure CM, Jatlow PI. Desipramine Treatment of Major Depression in Patients over 75 Years of Age. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 1995 (15)2: 99-105.

75. Nirupa G. and Tracy LB. Identifying Early Behavioral and Molecular Markers of future stress sensitivity. *Endocrinology*. 2007 (148)10: 4585-91.
76. Norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, publicada en el *Diario oficial de la federación* el 22 de agosto de 2001.
77. Paré WP. Passive-avoidance behavior in Wistar-Kyoto (WKY), Wistar, and Fischer-344 rats. *Physiology & Behavior*. 1993 (54)5: 845-52.
78. Paxinos, G, Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Fourth Edition *Academic Press*. 1998. 456 pp.
79. Pombo AM, Editor. Tratado de endocrinología Pediátrica. 2ª Edición. *Ed. Díaz de Santos*. 1997. 1440pp
80. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*. 1978 (47)4: 379-91.
81. Porsolt RD, 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.
82. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977 (266)5604: 730-32.
83. Price ML, Kirby LG, Valentino RJ, Lucki I. Evidence for corticotropin-releasing factor regulation of serotonin in the lateral septum during acute swim stress: adaptation produced by repeated swimming. *Psychopharmacology*(Berl). 2002 (162)4: 406-14.
84. Purper-Ouakil D, Michel G, Mouren-Siméoni MC. Vulnerability to depression in children and adolescents: update and perspective. *Encephale*. 2002 (28)3 Pt 1:234-240.
85. Purves, D., Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM (Editores). *Neuroscience*, 3a Edición. Sinauer Associates, Inc. 2004. 832pp
86. Racca S, Spaccamiglio A, Esculapio P, Abbadessa G, Cangemi L, DiCarlo F, Portaleone P. Effects of swim stress and alpha-MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2005 (81)4: 894-900.
87. Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, et al. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 (90)6: 2542-46.
88. Reed AL, Happe HK, Petty F, Bylund DB. Juvenile rats in the forced-swim test model the human response to antidepressant treatment for pediatric depression.

Psychopharmacology(Berl). 2008 (197)3: 433-41.

89. Reynolds III CF. and Kupfer DJ. Depression and aging: a look to the future. *Psychiatry Services*. 1999 (50): 1167-72.
90. Rho JM and Storey TW. Molecular ontogeny of major neurotransmitter receptor systems in the mammalian central nervous system. *Journal of Child Neurology*. 2001 (16)4: 271-280.
91. Rittenhouse PA, López-Rubalcava C, Stanwood GD, Lucki I. Amplified behavioral and endocrine responses to forced swim stress in the Wistar-Kyoto rat. *Psychoneuroendocrinology*. 2002 (27)3: 303-18.
92. Romeo RD. Adolescence: A Central Event in Shaping Stress Reactivity. *Developmental Psychobiology*. 2010 (52)3: 244-53.
93. Romeo RD. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. Review. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2010 (31)2 232-40.
94. Stahl SM. Basic Psychopharmacology of Antidepressants, Part 1: Antidepressants Have Seven Distinct Mechanisms of Action. *The Journal of Psychiatry*. 1998 (59) suppl 4: 5-14.
95. Stemmelin J, Lukovic L, Salome N, Griebel G. Evidence that the Lateral Septum is Involved in the Antidepressant-Like Effects of the Vasopressin V1b Receptor Antagonist, SSR149415. *Neuropsychopharmacology*. 2005 (30)1: 35-42.
96. Sterling P, Eyer J. en: Handbook of Life Stress, Cognition and Health. Fisher S., Reason J. (Editores) J. Wiley Ltd. 1988, p. 631.
97. Sterling P. and Eyer J. Biological basis of stress-related mortality. *Social Science and Medicine. Part E, Medical Psychology*. 1981 (15)1: 3-42.
98. Valentino KL, Eberwine JH, Barchas JD. In Situ Hybridization, Applications to Neurobiology. *Oxford University Press*, N.Y. 1987 (122).
99. Viau V, Meaney MJ, The inhibitory effect of testosterone on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress is mediated by the medial preoptic area. *The Journal of Neuroscience*. 1996 (16): 1866-76.
100. Walf AA and Frye CA. Antianxiety and Antidepressive Behavior Produced by Physiological Estradiol Regimen may be Modulated by Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity. *Neuropsychopharmacology*. 2005 (30)7: 1288-1301.
101. Willner P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 2005 (52)2: 90-110.

102. World Health Organization (WHO). International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th (ICD-10). Revision Version for 2007.
103. Yau JL, Kelly PA, Olsson T, Noble J, Seckl JR. Chronic amitriptyline administration increases serotonin transporter binding sites in the hippocampus of aged rats. *Neuroscience Letters*. 1999 (261)3: 183-85.
104. Young EA, Korszun A. Sex, trauma, stress hormones and depression. *Molecular Psychiatry*. 2010 (15)1: 23-28.
105. Young EA, Lopez JF, Murphy-Weinberg V, Watson SJ, Akil H. Hormonal Evidence for Altered Responsiveness to Social Stress in Major Depression. *Neuropsychopharmacology*. 2000 (23)4: 411-18.
106. Zandio M, Ferrín MJ, Cuesta. Neurobiología de la depresión. *ANALES Sis. San Navarra Pamplona, España*. 2002 (25) Supl. 3: 43-62.
107. Zhou FC, Sari Y, Zhang JK. Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain. *Brain Research. Developmental Brain Research*. 2000 (119)1: 33-45.
108. Zhou FC, Tao-Cheng JH, et al. Serotonin Transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Research*. 1998 (805)1-2: 241-54.
109. Zhou FC, Xu Y, Bledsoe S, Lin R, Kelley MR. Serotonin transporter antibodies: production, characterization, and localization in the brain. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 1996 (43)1-2: 267-278

12. APENDICE

1. TINCIÓN DE NISSL

La tinción de Nissl es un procedimiento que utiliza violeta de cresilo, un colorante acidófilo, para teñir los núcleos y el retículo endoplásmico rugoso, llamado sustancia tigroide de las neuronas (cuerpos de Nissl) por su aspecto moteado en las tinciones. Es empleado para tinción general del sistema nervioso, por lo que en este trabajo se realizó esta tinción a las muestras para tener un referente histológico general de las regiones elegidas, tanto en ratas control como en ratas estresadas.

La tinción de Nissl se llevó a cabo conforme al siguiente protocolo:

- El colorante se preparó al 0.2% (200mg de violeta de cresilo en 100ml de agua destilada). Se indica que puede ser de hasta 0.5% la solución. Se mezcló y filtró.
- Se recomienda disolver el violeta de cresilo en una solución tampón con acetato de sodio y agua destilada, y agregar una vez disueltos, ácido acético glacial (0.92 ml/100ml)
- Antes de utilizar la solución para teñir, le fueron agregados 300µl de ácido acético glacial a la mezcla de colorante
- Los cortes fueron montados sobre portaobjetos gelatinizados conforme a la receta (ver apéndice 12.3) y puestos a secar.
- Las muestras fueron rehidratadas con agua destilada por 1 minuto
- Los cortes se tiñeron por 20 minutos en la solución de violeta de cresilo
- Posteriormente fueron lavados en agua por 2 min.
- Enseguida fueron deshidratados en alcoholes de 70°, 80° y 96° .
- Las muestras se pusieron en alcohol absoluto por 10 min y fueron lavadas en un segundo recipiente de alcohol absoluto limpio
- Se pasaron a xilol por 10 minutos y lavadas en un segundo xilol limpio
- Las muestras fueron montadas con resina sintética “*Entellan*” y observadas al microscopio.

2. SOLUCIONES PARA PERFUSIÓN

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS-SALINA (PBS)

SOLUCION PBS 0.01 M (10X)

SAL	PM	M	g/L
NaCl	58.44	1.3	75.972
Na ₂ HPO ₄	141.96	0.07	9.9372
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	137.99	0.03	4.1397

SOLUCIÓN DE PBS 0.001 M (1X)

Dilución 1:10 de la solución 10X de PBS.

Ajustar el pH a 7.2 con NaOH

Filtrar al vacío en envases de acrílico con papel filtro de grado 1 y adicionar 1ml de heparina por cada litro de PBS 1X

SOLUCION DE PARAFORMALDEHIDO 4%

Calentar 500ml de agua destilada a 60°C.

Añadir 40g de paraformaldehido (Sigma Aldrich)

Añadir algunas gotas (aproximadamente 0.5 ml/l) de NaOH 1M para aumentar la solubilidad, agitando constantemente hasta disolver

Añadir 100ml de solución 10X de PBS.

Dejar enfriar y ajustar pH a 7.2

Aforar a 1 litro

Filtrar al vacío en envases de acrílico con papel filtro de grado 1.

3. GELATINIZACIÓN DE PORTAOBJETOS

- Espolvorear 2 g de gelatina (Q.P. Bayer, al 0.5%) en 100 ml de agua destilada a temperatura ambiente. Dejar hidratar durante 30 minutos
- Disolver 0.2g de cromo alúmina (sigma) al 0.05% (o sulfato de cromo y potasio [CrK(SO₄)₂.12H₂O]) en 140 ml de agua destilada caliente (40-60°C) en agitación
- Añadir gelatina hidratada a la solución de cromo caliente en agitación
- Dejar enfriar a temperatura ambiente
- Añadir 160 ml de etanol absoluto (ó 96%)
- Guardar el concentrado a 4°C (es reciclable varias veces filtrándolo)

Antes de gelatinizar los portaobjetos, introducirlos 20 minutos en solución de HCl 0.2 N en etanol 95%. Lavar 3 veces en agua destilada (5 min c/u)

Para la gelatinización se introducen lentamente los portaobjetos en las gradillas de cajas *copling* horizontales, sacando lentamente. Apoyar la gradilla en papel absorbente para quitar el exceso de gelatina y pasarlo a otro papel. Dejar secar a temperatura ambiente dentro de las cajas *copling* horizontales bien tapadas (Valentino y cols., 1987).

4. ANESTÉSICO Y RELAJANTE MUSCULAR

Ketamina = 100mg / Kg. Doplan, vertbrands. Anestésico, Dosis: 1ml / Kg

Xilacina = 20mg / Kg Ropum, Bayer. Sedante, analgésico, anestésico y relajante muscular.
Dosis: 1ml / Kg

La solución anestésica se prepara al momento de usarse, mezclando directamente en la jeringa las parte proporcionales de ambos componentes sin usar disolventes adicionales al vehículo. Se aplicó de manera intraperitoneal en una sola inyección ambos anestésicos.