



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA

**INHIBICIÓN PRENATAL DE LA SÍNTESIS DE SEROTONINA DURANTE
DIFERENTES ETAPAS DE LA ONTOGENIA DEL SISTEMA 5-HT:
EVALUACIÓN ANATÓMICA Y CONDUCTUAL**

T E S I S :

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

P R E S E N T A :

ALMA DELIA CHÁVEZ ARRIETA

DIRECTORA : DRA. MARÍA GUADALUPE FLORES CRUZ

REVISORA : DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ

SINODALES :

**DRA. PILAR DURAN HERNÁNDEZ
DRA. ALEJANDRA EVELYN RUÍZ CONTRERAS
DRA. BEATRIZ GÓMEZ GONZÁLEZ**

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2014



**© Facultad
de Psicología**



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.

Agradecimientos

Con mucho amor a mis padres quienes me han apoyado en todos mis proyectos ya que sin ellos no estaría en donde estoy, a mi hermano que siempre ha estado ahí en las buenas y en las malas.

A mí a veces amiga, a veces madre, a veces hermana pero siempre profesora Guadalupe Flores Cruz. Al Dr. Alfonso Escobar que me brindo un lugar para la realización de este trabajo y a Beatriz Gómez Gonzáles por tener siempre un momento para escucharme, enseñarme y aconsejarme.

A mis tíos y tías que siempre han sido buenos conmigo, a mis abuelos que se alegran de verme crecer, aunque algunos ya no estén presentes. A mis amigos y mi novio quienes aguantaron un largo tiempo mis quejas y mis pláticas de cosas que no entendían y terminaron entendiendo y que no me dejaron convertirme en rata de laboratorio.

A mi revisora Martha Lilia Escobar Hernández, mis sinodales: Dra. Pilar Duran Hernández, Dra. Beatriz Gómez Gonzáles, Dra. Alejandra Evelyn Ruíz Contreras, quienes amablemente dedicaron su tiempo a la lectura de esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una educación de alto nivel y con libertad de pensamiento.

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Alfonso Escobar Izquierdo, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Fue dirigida por la Dra. María Guadalupe Flores Cruz, con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. Proyecto PAPIIT IN2007510-3: “Efectos de la depuración farmacológica y dietaria de serotonina en el periodo prenatal sobre la estructura y función serotoninérgica” y el proyecto IN210113 “Participación del sistema serotoninérgico en el desarrollo cortical: migración neuronal, polaridad celular y mantenimiento del árbol dendrítico”

A todas las personas que han pasado en mi vida, a las que se quedaron y a las que no, a las que me dieron la mano y a las que me pusieron el pie, por que todas las experiencias adquiridas en el camino me hacen ser quien soy.

Y sobre todo a todas las ratitas que fueron ocupadas en este trabajo ya que sin ellas nada de esto seria posible.



Tabla de contenido

Resumen	1
Antecedentes	2
Antecedentes históricos	2
Síntesis de serotonina	2
Anatomía del sistema serotoninérgico	3
Fisiología del sistema serotoninérgico	6
Ontogenia del sistema serotoninérgico	9
Estrategias de inhibición del sistema serotoninérgico	13
Efectos de la depuración de serotonina durante la vida postnatal	14
Efectos de la depuración de serotonina durante la vida prenatal	15
Justificación	17
Objetivos	18
Generales	18
Específicos	18
Hipótesis	18
Método	19
Sujetos	19
Diseño experimental	19
Procedimientos	20
Gestación	20
Administración farmacológica	20
Sacrificios	21
Inmunohistoquímica	22
Cuantificación de serotonina mediante HPLC	22
Cuantificación de proteínas	22
Análisis conductual	23
Análisis estadístico	23
Resultados	
Efecto de la administración prenatal de PCPA sobre el peso corporal de las hembras gestantes	24
Tasa de natalidad, mortalidad y abortos por condición	24
Efectos de la administración prenatal de PCPA sobre el peso corporal de las crías	25
Ventana 8-12	25

Ventana 13-17	26
Efectos de la administración prenatal de PCPA sobre el peso cerebral de las crías	27
Ventana 8-12	27
Ventana 13-17	28
Efectos de la administración prenatal de PCPA sobre el número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano en el núcleo dorsal del rafe	29
Ventana 8-12	29
Ventana 13-17	29
Cuantificación de serotonina (HPLC)	30
Niveles de serotonina en P0	31
Niveles de serotonina en P40	32
Análisis conductual	34
Discusión	35
Conclusiones	41
ANEXO I	42
ANEXO II	43
ANEXO III	44
Tabla ANEXA I	45
Referencias	46

“Mi propio cerebro es la más inexplicable de las maquinarias, siempre zumbando, tarareando, alzándose, precipitándose, gritando, y luego enterrado en el fango” *Virginia Woolf*

“El cerebro es más grande que el cielo si los pones uno junto al otro el primero contiene al segundo y sin dificultad te incluye a ti también” *Emily Dickinson*

RESUMEN

La serotonina es un neurotransmisor que se sintetiza a partir del triptófano. Las neuronas serotoninérgicas se agrupan en 9 núcleos a lo largo del tallo cerebral, que a su vez se subdividen en grupo rostral y grupo caudal. El núcleo del rafe dorsal (NRD) es parte del grupo rostral y es el núcleo en el que se agrupan la mayor cantidad de neuronas serotoninérgicas. El desarrollo del sistema serotoninérgico ocurre en etapas tempranas de la gestación, las neuronas serotoninérgicas adquieren el compromiso celular aproximadamente en el día embrionario (DE) 8 en la rata, en el DE 12 se observan las primeras neuronas diferenciadas que sintetizan serotonina, en el DE 15 ocurre el pico de proliferación, mientras que el establecimiento de sinapsis concluye durante los primeros días de vida postnatal.

Dado que a partir del DE 12 es posible detectar serotonina en ausencia de sinapsis y que los procesos de diferenciación y proliferación ocurren en días muy específicos del desarrollo, este proyecto tuvo como objetivo estudiar el efecto de la disminución de serotonina durante distintos momentos del desarrollo prenatal del sistema serotoninérgico con el fin de determinar si existen periodos más sensibles a la falta de serotonina.

En el presente trabajo se inhibió la síntesis de serotonina con para-cloro-fenilalanina (PCPA) en dos momentos diferentes del desarrollo del sistema serotoninérgico. El primer periodo fue durante los DE 8-12 (grupo 1), en los cuales ocurre la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas, y el segundo durante los DE 13-17 (grupo 2), momento en el que ocurre la proliferación de estas neuronas. Se evaluó la ganancia de peso corporal de la rata durante la gestación, la tasa de natalidad-mortalidad, el peso cerebral, así como el peso corporal de las crías, la morfología del NRD, así como los niveles de serotonina en corteza cerebral, tallo y la conducta espontánea de la rata.

En los grupos a los que se les administro PCPA durante la gestación independientemente del periodo de administración se encontró: un menor número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano en el NRD, así como una redistribución en este, mientras que la disminución en los DG 13-17 tuvo efectos sobre la cantidad de crías vivas post nacimiento, en el peso cerebral y corporal de las crías, aunado a un aumento en la cantidad de serotonina en la corteza cerebral en el día P40.

Debido a que en ambas condiciones se presenta disminución de la cantidad de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano, no se puede concluir que exista un periodo más sensible que otro a la inhibición de la síntesis de serotonina.

ANTECEDENTES

Historia

La 5-hidroxitriptamina (5-HT o serotonina) fue descubierta en la sangre y en el tracto intestinal como un factor capaz de producir vasoconstricción, (Page y cols., 1932) la identificaron como responsable del aumento en el tono vascular, y se le dio el nombre de serotonina debido a que se encontraba en el suero (plasma) de la sangre. Análogamente (Esparmer y Vialli, 1937) caracterizaron una sustancia liberada por las células cromafines del tracto intestinal capaz de contraer el músculo liso y le llamó "enteramina". En 1952, Esparmer reportó que la serotonina y la enteramina eran la misma sustancia y en 1953 Page determinó la presencia de serotonina en el sistema nervioso central (SNC) (revisado en Siegel *et al.*, 2006).

Síntesis de serotonina

La serotonina pertenece al grupo de los indoles; posee un ciclópentano unido a un anillo benceno (Kandel, 2000), como se muestra en la Figura 1.

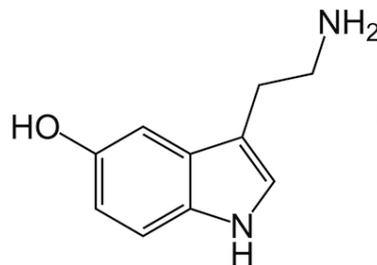


Figura 1. Estructura molecular de la serotonina.

La 5-HT se sintetiza a partir del aminoácido L- triptófano; los mamíferos no pueden sintetizar triptófano, por lo que la única vía de abastecimiento es dietética. Los alimentos ricos en este aminoácidos son: el amaranto, el plátano, el chocolate, la avena, los dátiles, garbanzos, semillas de girasol, cacahuates, etc. uno de los pocos alimentos que no contiene triptófano es el maíz por lo que las dietas basadas en este alimento se han empleado como estrategia de inhibición de la serotonina (Choi, 2011). Una vez que el triptófano se encuentra en el organismo la enzima 5-monooxigenasa de triptófano, o hidroxilasa de triptófano (TryOH), lo transforma en 5-hidroxitriptofano (5-HTP) con ayuda del cofactor tetrahidrobiopterina; una vez ocurrido este proceso la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos transforma a la 5-HTP en 5-hidroxitriptamina, teniendo al 5-fosfato de piridoxal como cofactor (Kandel, 2000).

La distribución de la serotonina en el ser humano no es uniforme, el 90% se encuentra en el tracto gastrointestinal, 8% en plaquetas y entre el 1 y 2% en el SNC. A pesar de la distribución tanto periférica como central, la serotonina periférica es incapaz de llegar al SNC debido a que no puede atravesar la barrera hematoencefálica ya que posee características hidrofílicas, mientras que la barrera hematoencefálica posee características lipofílicas, así mismo existe una gran presencia de la enzima monoaminoxidasa en las células endoteliales (la cual se encarga de la degradación de la serotonina) y ausencia de transportadores de serotonina (Tang & Melethil, 1995; Lucca *et al.*, 1992).

En el SNC las neuronas serotoninérgicas son aquellas que poseen las enzimas necesarias para la síntesis de 5-HT. Estas se localizan en nueve núcleos en el tallo cerebral (Dählstrom & Fuxe, 1964), los más conocidos son los núcleos del Rafe.

Anatomía del sistema serotoninérgico

Los núcleos serotoninérgicos se encuentran localizados a lo largo de la línea media del tallo cerebral en un arreglo bilateral nombrándolos en conjunto Núcleos del Rafe. Dählstrom y Fuxe en 1964 describieron 9 núcleos serotoninérgicos, nombrándolos B1-B9 (ver Figura 2). Estos núcleos se distribuyen en dirección caudal-rostral, correspondiendo a la porción caudal, los núcleos B1-B4; y la porción rostral a los núcleos B5-B9 (Siegel *et al.*, 2006). De acuerdo a esta clasificación, en roedores, B1 corresponde al núcleo del rafe pálido, B2 al rafe oscuro, B3 al rafe magno, B4 a la porción dorsolateral del núcleo del rafe oscuro, B5 a la parte caudal del rafe mediano, B6 a la parte caudal del rafe dorsal, B7 a la parte rostral del rafe dorsal, B8 a la parte rostral del núcleo del rafe mediano y B9 al núcleo *pontis oralis* (Siegel *et al.*, 2006).

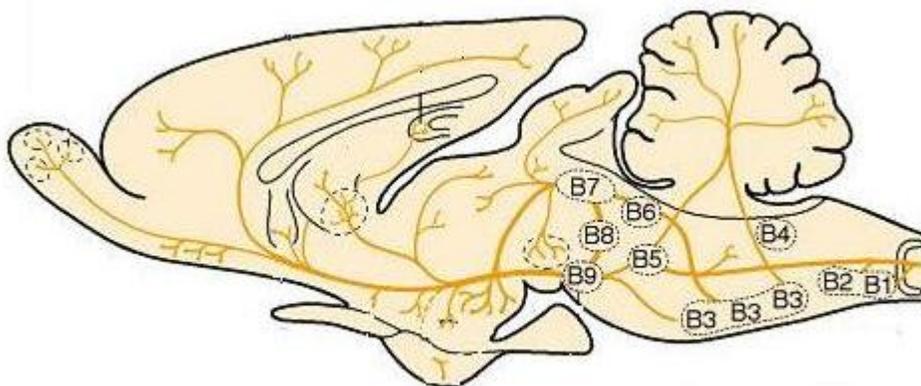


Figura 2. Distribución rostro-caudal de los núcleos del rafe en la rata. Se muestra la distribución de los núcleos del Rafe tanto en la porción rostral (B5-B9) como caudal (B1-B4). Tomada de Siegel *et al.*, 2006.

Grupo rostral.

El grupo rostral está constituido por tres grupos: i) el núcleo del rafe mediano, ii) el conjunto de los núcleos caudal lineal interpeduncular y el área tegmental ventral, iii) el núcleo del rafe dorsal (NRD) (Hornung, 2003).

Tanto en roedores como en el humano el NRD es uno de los núcleos más importantes del grupo rostral, debido a su robusta innervación serotoninérgica a la corteza e hipocampo así como a su población neuronal, ya que el 60% de esta es serotoninérgica, además de ser parte de los tres principales núcleos que inervan el telencéfalo (Harding, 2004; Hornung, 2003). Este núcleo se divide en 3 partes (rostral, medial y caudal) de acuerdo a la división propuesta por Altman y Bayer (1995). En la Figura 3 se muestra la morfología del NRD (señalado en rojo) tanto en crías recién nacidas A) como en adulto B), así mismo en C) se muestra la distribución de las neuronas serotoninérgicas en el núcleo del rafe dorsal al nacimiento y en D) la distribución de neuronas serotoninérgicas en adulto.

Grupo caudal.

El grupo caudal está constituido por los núcleos magno del rafe, pálido, oscuro y por una pequeña población neuronal en la porción lateral de la formación reticular. El grupo caudal posee aproximadamente el 15% de las neuronas serotoninérgicas en el SNC (Hornung, 2003).

Las neuronas del rafe oscuro están localizadas alrededor de la línea media, en la mitad dorsal del bulbo raquídeo. En la rata el rafe pálido es el más pequeño, con aproximadamente 1,300 neuronas. Este se encuentra localizado alrededor de la línea media entre las pirámides y superpuesto al lemnisco medio (Lowry *et al.*, 2008; Hornung, 2003).

Las eferencias del grupo caudal terminan en núcleos motores y viscerales, así como en la porción lateral de la formación reticular en el tallo cerebral. Los axones que provienen de los núcleos caudales descienden por la médula espinal a lo largo de varias vías, las fibras provenientes del núcleo del rafe magno corren por el fascículo dorsolateral y terminan en el asta dorsal de la médula espinal, mientras que las proyecciones del núcleo pálido, así como las del núcleo oscuro llegan al asta ventral de la médula espinal (Hornung, 2003).

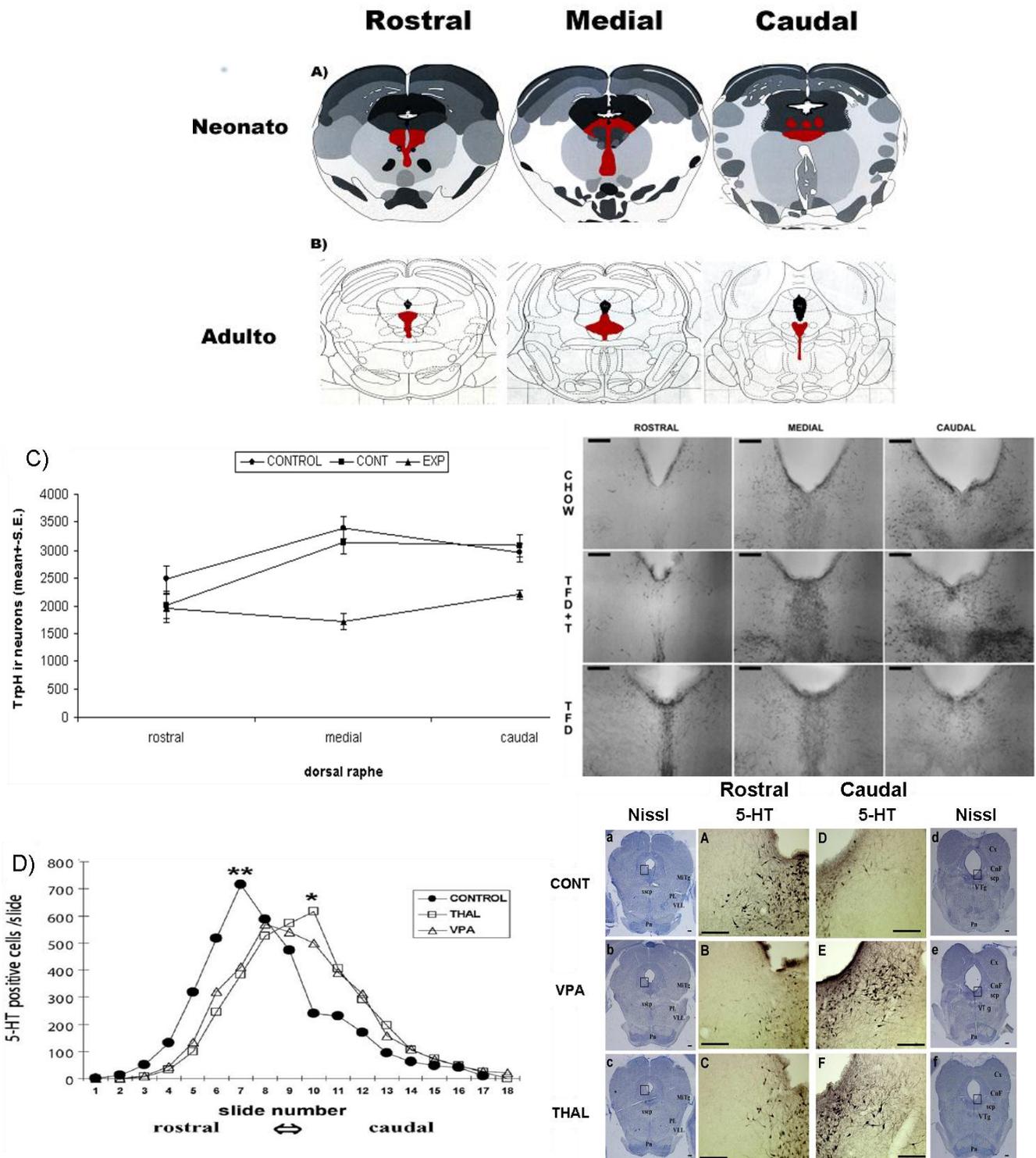


Figura 3. Cortes coronales representativas de la división rostral media y caudal del NRD del cerebro de rata (marcados con rojo), en A) Se muestra la anatomía del NRD en crías en el día postnatal 0 (Altman y Bayer 1995). En B se muestra la anatomía del NRD en adulto (Paxinos & Watson 1998). En C y D se muestra la distribución representativa de la porción rostral medial y caudal de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano en el NRD de dos estudios. C, Flores y Escobar 2012, distribución en el día P0 y Miyasaki & cols., 2005, distribución en el día P40.

Fisiología del sistema serotoninérgico

La serotonina se ha relacionado con una gran cantidad de funciones en el SNC tales como la regulación de estados conductuales, regulación del ciclo de sueño-vigilia, modulación neuroendocrina, respuesta sensorial, ingestión de alimentos, etc. (Daubert *et al.*, 2010, Siegel *et al.*, 2006). Además, la serotonina funciona como un factor de crecimiento durante la embriogénesis ya que interactúa con el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de astrocitos ($S100\beta$) y otros mensajeros químicos (Lauder 1995; Azmitia *et al.*, 2001; 1996; 1990).

El efecto de la 5-HT se encuentra mediado por 13 diferentes receptores que se encuentran distribuidos en el organismo, tanto de manera central como periférica. Estos regulan diversas funciones entre las cuales se encuentran la regulación de los estados de ánimo y algunas respuestas fisiológicas como contracciones uterinas (Siegel *et al.*, 2006), sin embargo, aun falta un largo camino en el estudio de estos receptores.

Existen doce receptores del tipo metabotrópico (5-HT_{1A}, -1B, -1D, -1E, -1F, -2A, -2B, -2C, -4, -5, -6,-7) y uno ionotrópico (5-HT₃), para mas información ver Tabla 1. La familia de receptores 5-HT₁ tiene 5 subtipos que poseen una homología de entre el 40 y el 63% y actúan como inhibidores de la adenilato ciclasa mediante proteína G i/o; las familias 5-HT₂ y 5-HT₅ actúan mediante proteína G_q y el resto de los receptores actúa mediante proteína G_s (Siegel *et al.* 2006).

Tabla I: Características generales de los receptores a serotonina en el SNC

Receptor	Localización	Función	Proteína G	Agonista Antagonista	Patología	Referencia
5-HT 1A	Hipocampo, amígdala, septum de la corteza entorrinal, hipotálamo núcleos del rafe	Relacionado con funciones integrativas, cognitivas y estados emocionales	Gi	Agonista: 8-OH-DPAT Antagonista: WAY 100635	Desordenes afectivos como ansiedad y depresión	Savits et al., 2009 Siegel et al., 2006
5-HT 1B	Ganglios basales (globo pálido y sustancia negra)	Regula la liberación de otros neurotransmisores tales como acetil colina y dopamina	Gi	Agonista: Sumatriptan, L694247 Antagonista: GR 55562, SB224289	Sus antagonistas se emplean para el tratamiento de la migraña	Hannon et al., 2011
5-HT 1D	Ganglios basales (globo pálido, caudado, putamen y sustancia negra) hipocampo y corteza	Funciona como autoreceptor, tanto en núcleos del rafe como terminales nerviosas serotoninérgicas	Gi	Agonista: PNU109291 Sumatriptan Antagonista: BRL15572	Relacionado con la migraña	Siegel et al., 2006 Jason et al., 2011
5-HT 1E	Su ARNm se ha encontrado en corteza (particularmente en la corteza entorrinal), caudado y putamen	Relacionado con funciones cognitivas visuales	Gi	Desconocidos	Desconocida	Filip et al., 2009
5-HT 1F	Hipocampo (capas CA1-CA3), giro dentado, núcleo del tracto solitario, (corteza entorrinal y cíngulo), médula espinal	Relacionado con funciones cognitivas visuales	Gi	Agonista: Desconocido Antagonista: LY334370	Desconocida	Barnes et al., 1999 Siegel et al., 2006
5-HT 2A	Laminas corticales I y IV-V, se expresa en neuronas piramidales e interneuronas en neocorteza	Su activación produce alucinaciones	Gq	Agonista: Dietilamida del ácido lisérgico (LSD) 2,5-dimethoxy-4-iodoanfetamina (DOI) Antagonista: Ketanserin MDL100907	Relacionado con esquizofrenia y síntomas psicóticos	Hannon et al., 2008
5-HT 2B	Cerebelo, septum, hipotálamo dorsal y amígdala medial	Mediación de la hiperfagia	Gq	Agonista: BW723C86 Antagonista: SB200646 SB204741	Desconocida	Hannon et al., 2008

Continuación Tabla I

5-HT 2C	Plexo coroideo, hipocampo (CA3), amígdala, núcleo endopiriforme, ganglios basales, núcleos subtalámicos y sustancia negra	Mecanismos de recompensa producidos por drogas como el alcohol y la cocaína	Gq	Agonista: Ro600175 Antagonista: Mesulergine SB242084	Relacionado con esquizofrenia y depresión mayor	Hannon et al., 2008
5-HT 3	Corteza, hipocampo, núcleo del tracto solitario, área postrema	Relacionado con nocicepción, en la iniciación y coordinación del reflejo de vomito, favorecimiento en la liberación de sustancia P	_____	Agonista: SR57227 M-chlorophenyl- biguanide Antagonista: Granisetron Ondansetron Tropisetron	Relacionado con ansiedad y psicosis	Barnes et al., 1999
5-HT 4	Tubérculo olfatorio, sustancia negra, cuerpo estriado, septum, hipocampo y amígdala	Modula liberación de neurotransmisores como acetilcolina, dopamina y GABA	Gs	Agonista: BIMU8 RS677506 ML10302 Antagonista: GR1138018 SB204070 RS100235	Sus agonistas son usados en el tratamiento de constipación predominante de intestino irritable	Siegel et al., 2006 Hannon et al., 2008
5-HT 5A	Corteza (capas II, III y V), hipocampo y en las células de Purkinje en cerebelo	Relacionado con conductas adaptativas bajo situaciones de estrés	Gq	Agonista: Desconocido Antagonista: A-843277	Psicosis y depresión	Hannon et., al 2008
5-HT 6	Estriado, núcleo acumbens, tubérculo olfatorio, hipocampo y corteza	Participa en la regulación de la actividad colinérgica central	Gs	Agonista: Desconocido Antagonista: Ro630563 SB271046	Relacionado con ansiedad y depresión	Hayes et al., 2011
5-HT 7	Corteza, septum, tálamo, amígdala e hipocampo	Regulación de ritmos circadianos modulando la actividad neuronal en el núcleo supraquiasmático, sueño, así como termorregulación	Gs	Agonista: Desconocido Antagonista: SB258719 SB279970	Relacionado con procesos sensoriales y afectivos	Leopoldo et al., 2011

Ontogenia del sistema serotoninérgico en roedores

Durante el desarrollo, la placa neural se forma a lo largo de la línea media dorsal del embrión; posteriormente se convierte en el tubo neural, que se divide en 3 vesículas: prosencéfalo o cerebro anterior, mesencéfalo o cerebro medio y rombencéfalo o cerebro posterior, ver figura 4 (Rubenstein, 1998)

Cada región de las distintas vesículas se divide en neurómeros, que son dominios moleculares transitorios en el tubo neural. Los neurómeros que se encuentran en el rombencéfalo se conocen como rombómeros y se numeran del 1 al 7 (Rubenstein, 1998)

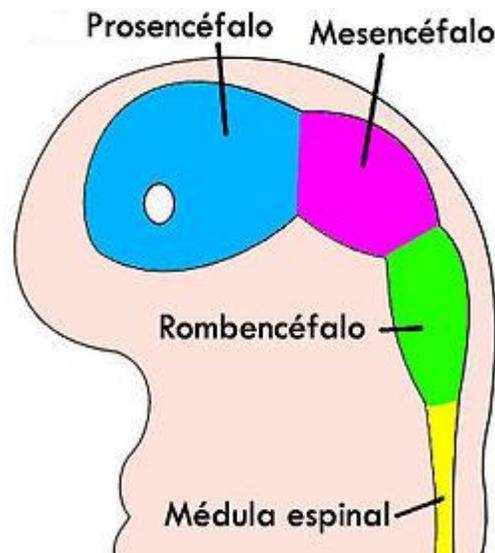


Figura 4. División vesicular del tubo neural, mostrando en color verde la zona en la cual se generan las neuronas serotoninérgicas (rombencéfalo).

El tubo neural se divide en diferentes regiones: la placa del techo o placa alar y la placa basal o placa de piso. La placa del techo produce proteínas que inducen el desarrollo de neuronas sensoriales y sustancias quimiotrópicas que dirigen el crecimiento axonal; la placa basal contiene motoneuronas y otros tipos celulares tales como células serotoninérgicas y dopaminérgicas (Rubenstein, 1998).

La notocorda se encuentra debajo de la placa de piso y produce a la proteína Sonic Hedgehog (Shh), la cual es importante para la inducción de diferentes tipos celulares entre los que se encuentran las neuronas serotoninérgicas (Rubenstein, 1998).

Otras moléculas, como el factor de crecimiento derivado de fibroblastos 8 y 4 respectivamente (FGF8 y FGF4) junto con Shh, definen el centro de inducción para la diferenciación de neuronas serotoninérgicas. Esta diferenciación ocurre en las rombómeras 1 a 3 mediada por FGF8 y en las rombómeras 5 a 7 por FGF4. En la rombómera 4 se presenta la expresión del gen Phox2, el cual actúa como inhibidor de la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas, pudiendo diferenciar en la porción ventral del rombencéfalo 2 grupos de neuronas que expresan serotonina (Rubenstein, 1998).

La liberación de Shh lleva a la activación de 2 genes que actúan como precursores del desarrollo y especificación temprana: el gen de homeodominio (Nkx2.2) el cual induce la diferenciación de neuronas serotoninérgicas en las rombómeras 2 y 3, en la rombómera 1 es necesario gen Nkx6.1 para la diferenciación de neuronas serotoninérgicas (Kiyasova *et al.*, 2011).

De manera paralela a la regulación producida por los genes Nkx, el gen proneural (Ascl1/Mash 1) juega un papel importante en la generación de precursores postmitóticos y en la especificación celular de las futuras neuronas serotoninérgicas, tanto a nivel caudal como rostral (Pattyn *et al.*, 2003).

Siguiendo con la cascada de señalización se produce la activación de los factores de transcripción a través del factor de transcripción Gata2, (rombómeras 1-3 y 5-7) y Gata3 (rombómeras 5-7); la activación de estos factores de transcripción desencadena la activación del factor de transcripción de homeodominio Lim (Lmx1b); por último, el factor de crecimiento expresado en plasmacitoma 1 (Pet 1) se relaciona con la maduración del fenotipo serotoninérgico, ya que si este no se expresa, hay una pérdida de aproximadamente el 70% de las neuronas serotoninérgicas, es decir no hay diferenciación a neurona serotoninérgica (Kiyasova, 2011), ver Figura 5.

Todos estos procesos son la antesala a la expresión del fenotipo de la neurona serotoninérgica, desencadenándose en etapas tempranas del desarrollo, entre los DE 9.5 y 11.5 en el ratón (Pattyn *et al.*, 2003) y en la rata aproximadamente un día después. En general si alguno de estos procesos falla o se ve alterado no se llevará a cabo la diferenciación correcta de las neuronas serotoninérgicas, teniendo como resultado en todos los casos una reducción en la cantidad de neuronas serotoninérgicas (Kiyasova *et al.*, 2011).

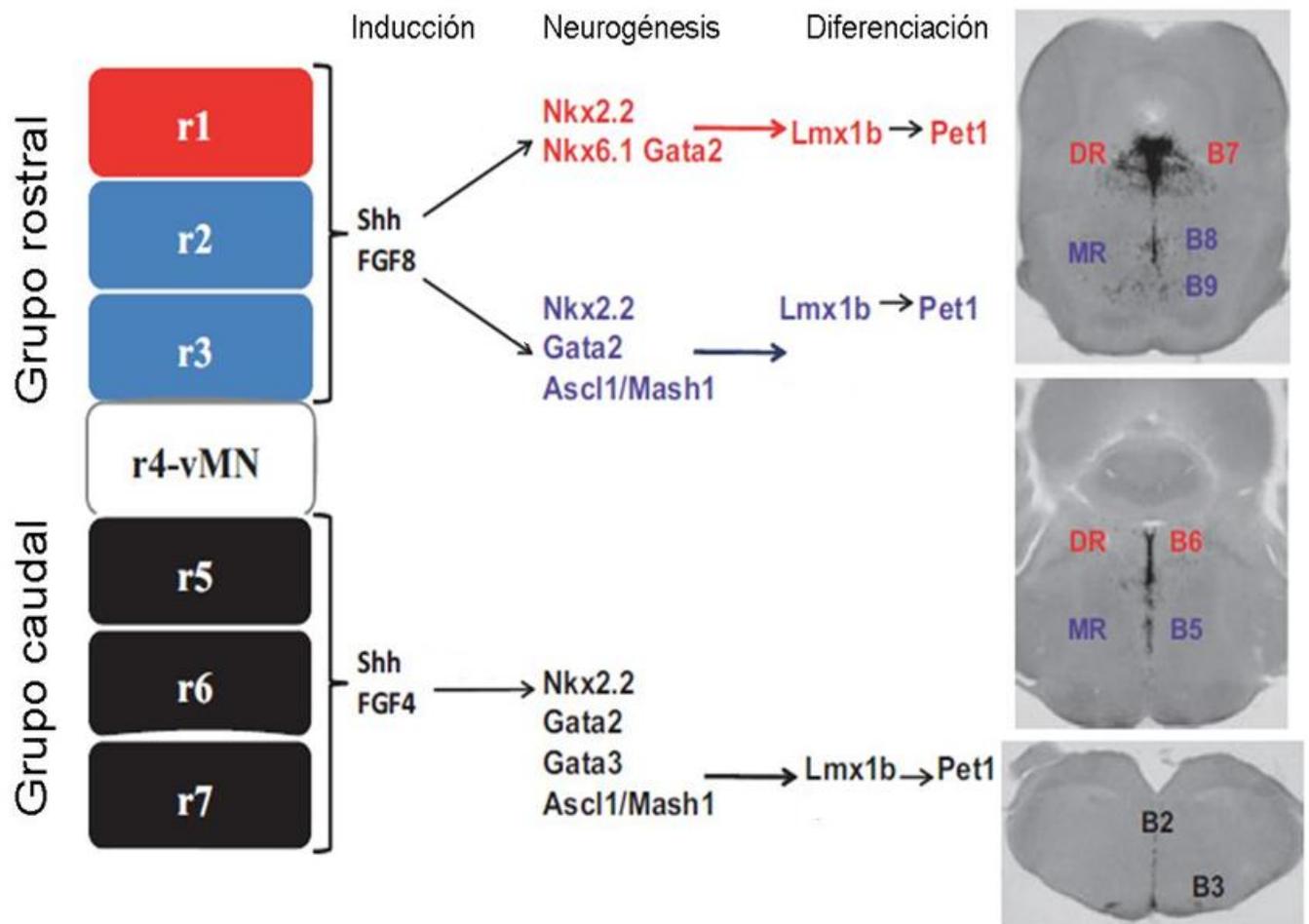


Figura 5. Factores involucrados en la diferenciación de neuronas serotoninérgicas durante el desarrollo, se muestran las rombomeras que dan origen a los núcleos del grupo rostral B5-B9 (r1-r3) y caudal B1-B4 (r5-r6), así como los factores de transcripción involucrados en el proceso de inducción, neurogénesis, así como diferenciación y mantenimiento del fenotipo de las neuronas serotoninérgicas. Se muestra el núcleo dorsal del rafe (B7-B6), el núcleo mediano del rafe (B5,B8-B9). Modificado de Kiyasoba *et al.*, 2011.

En el sistema nervioso central de rata las primeras neuronas serotoninérgicas diferenciadas aparecen en el DE12 en la parte caudal de la flexura mesencefálica, hacia el DE13 se observan algunas neuronas serotoninérgicas dispersas en la flexura mesencefálica, en ambos lados de la placa del piso en la porción rostral del rombencéfalo, este complejo neuronal es el esbozo de los núcleos dorsal y medial del rafe (B7-B8) (Lidov & Molliver, 1982).

En el DE14 el número de neuronas 5-HT se ha incrementado rápidamente y en el DE15 se alcanza el pico de proliferación (Wallace & Lauder ,1983; Lauder *et al.*, 1982). En el DE15 las células inmuno reactivas a serotonina se localizan en dos grupos uno superior y otro inferior, siendo el grupo superior más denso y diferenciado que el inferior (Lidov & Moliver, 1982). Entre los DE12 a DE18 las neuronas serotoninérgicas incrementan su número y adquieren un complejo árbol dendrítico mientras migran a su posición permanente (Tork *et al.*, 1988). En el DE16 se observa en ambos grupos (superior e inferior) un mayor número de neuronas serotoninérgicas menos compactas que en DE15 (Lidov & Moliver, 1982). Para el DE17 la división que ocurrió en el DE16 se hace más evidente distinguiéndose 4 regiones, rostral, lateral, medial y ventral. Las neuronas que se encontraban localizadas entre la flexura mesencefálica y pontina presentan un desplazamiento medio-lateral y dorso-ventral con respecto a E15; debido a este desplazamiento ya es posible la identificación del complejo B4-B9 (Wallace & Lauder ,1983) (ver Figura 6).

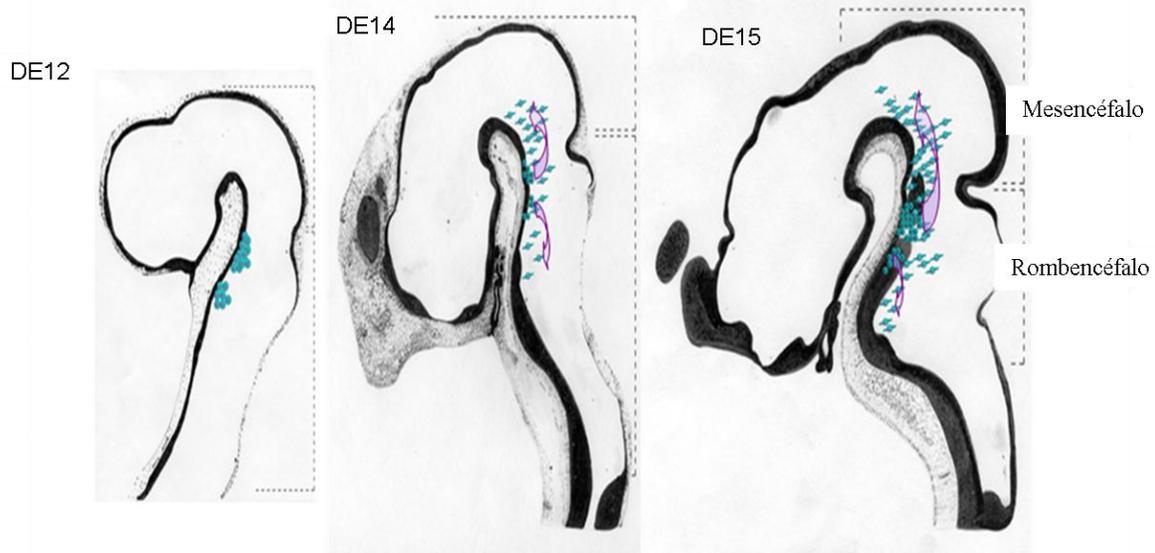


Figura 6. Distribución de las neuronas 5-HT durante los DE12, DE14 y DE15 en el embrión. En el DE12 se observan dos grupos de neuronas serotoninérgicas en el rombencéfalo (marcadas en verde); en DE14 se muestra que estos núcleos comienzan a distribuirse a lo largo del tubo neural mientras que para el DE15 se observa un mayor número de neuronas serotoninérgicas (pico de diferenciación). Tomado de Flores-Cruz & Escobar (2012).

Así mismo, se observa la aparición de axones que formarán las diferentes vías ascendentes provenientes del complejo B4-B9 en el DE14 (Lidov & Moliver, 1982). Estos corren lateralmente a través del primordio y las capas marginales hasta llegar a regiones talámicas e hipotalámicas en el DE16, estos axones proyectan entre el complejo mamilar y el tálamo ventral, corriendo a través de las porciones ventrolaterales del hipotálamo, alcanzando áreas septales y el polo frontal de la neocorteza en el DE17 (Lauder *et al.*, 1982).

Durante la ontogenia los procesos de diferenciación, proliferación, migración y formación de vías se pueden ver afectados por un gran número de factores tales como: nutrición, estrés, infecciones, polimorfismos genéticos, exposición a fármacos y drogas de abuso (Daubert *et al.*, 2010). Si estos procesos se ven afectados pueden tener diferentes consecuencias tanto a nivel molecular, anatómico y conductual, entre los cuales se encuentran cambios en la polaridad de las neuronas piramidales, alteración en la corteza somatósensorial, alteración en la maduración de otros sistemas de transmisión, etc. (Vataeva *et al.*, 2008, Dasari *et al.*, 2007, Nakajima *et al.*, 1998).

Estrategias de inhibición del sistema serotoninérgico

Para conocer la participación de la serotonina en los procesos cerebrales se han empleado diversas estrategias, algunas consisten en suprimir la síntesis de 5-HT mediante fármacos, bien depurar de triptófano al sujeto, causar lesiones en los núcleos del rafe, administrar neurotoxinas o la inhibición de la expresión de genes involucrados con la producción de serotonina (Kohler *et al.*, 1977., Biggio, 1974).

La administración de dietas libres o reducidas en triptófano ha sido utilizada para conocer la participación de la serotonina en múltiples procesos cerebrales (Biggio *et al.*, 1974). Los fármacos que modifican los niveles de 5-HT son varios, tales como: la 3,4 metilenedoxi-metanfetamina (MDMA) la cual inhibe la recaptura de serotonina e incrementa la cantidad de dopamina y adrenalina, o la para-cloro-fenilalanina (PCPA) que inhibe la síntesis de serotonina mediante el bloqueo a la enzima paso limitante (hidroxilasa de triptófano). Otros fármacos como la 5,6 y la 5,7- Dihidroxitriptamina (5,6 DHT y 5-7, DHT respectivamente), así como la 4-cloranfetamina (PCA) actúan como agentes neurotóxicos de las neuronas serotoninérgicas (Jha *et al.*, 2006, Dasari *et al.*, 2007).

Sin embargo, la estrategia farmacológica más utilizada es la administración de paraclorofenilalanina (PCPA), el cual comenzó a emplearse en 1966 por Koe y cols., la cual actúa como un inhibidor irreversible de la hidroxilasa de triptófano pegándose al sitio activo de la enzima, inhibiendo así la formación de serotonina; debido a que puede atravesar barrera hematoencefálica la inhibición es tanto periférica como central. La entrada de este fármaco al sistema nervioso central es rápida, encontrándose efectos a partir de las 4h posteriores a la administración (Koe *et al.*, 1966), su eficacia máxima obtenida durante la depuración esta entre el 82 al 88% durante un periodo de 3 a 5 días de administración, presentando el pico de inhibición 72h después de la primer administración (Vataeva *et al.*, 2008; Vataeva, 2007., Nakajima, 1998; Lauder *et al.*, 1985). La vida media de la PCPA es larga, ya que la recuperación del sistema comienza 48h después de la administración única del fármaco y los niveles normales de serotonina se recuperan aproximadamente 6 días después (Koe *et al.*, 1966; 1968). Este efecto se debe en parte a que el metabolito del PCPA, el ácido paraclorofenilpirivico actúa de manera similar al PCPA, aunque con menor eficiencia (Gál, 1993; Koen *et al.*, 1968). El siguiente metabolito en la vía de eliminación del PCPA es la paraclorofenetilamina la cual es eliminada rápidamente del cerebro (Koe *et al.*, 1966; 1968).

Este fármaco ha sido empleado para conocer el efecto de la inhibición de serotonina durante la vida post natal así como prenatal en diferentes modelos experimentales tanto en modelos *in Vitro* como en vertebrados e invertebrados (Azmitia & Whitaker Azmitia 1987; Nakajima *et al.*, 1998; Butkevich *et al.*, 2003; Abalo *et al.*, 2007) por lo que en este estudio se decidió emplear dicho fármaco.

Efectos de la depuración de 5-HT durante la vida postnatal

La inhibición de la síntesis de serotonina cerebral ha sido un método empleado históricamente en diferentes estudios que buscan conocer la participación de la serotonina en la regulación de la conducta, en la regulación de la migración, procesos de desarrollo del mismo sistema, etc; por ejemplo, la administración de paracloranfetamina -PCA- (15 mg/Kg) ó 5,7 Dihidroxitriptamina (50 µg/5 ml solución salina) en los días P3 y P4 disminuyó el número de espinas dendríticas de las células granulares en hipocampo en los días postnatales (P)14, 21, 60, 120 (Yan *et al.*, 1997).

En estudios realizados durante la vida postnatal en ratas, la administración de PCPA (100 mg/Kg) durante el periodo de sinaptogénesis (P10 y P20) provocó disminución en la cantidad de la proteína Map-2 encontrada en hipocampo mediante inmunodensitometría en los días postnatales 30 y 62, así mismo se encontró una disminución en la cantidad de sinaptofisina presente en hipocampo en el día postnatal 30 pero no en el 62.

Conductualmente, no se encontraron diferencias en la latencia para encontrar el reforzador en la prueba de laberinto elevado en cruz (la cual consiste en una plataforma en forma de cruz que se encuentra elevada a aproximadamente medio metro del suelo, en la que dos brazos están cerrados por paredes, mientras que los otros dos se encuentran descubiertos) en el día postnatal 52, se realizó una segunda prueba en el día postnatal 63 en la que los brazos del laberinto se modificaron y se encontró que las ratas administradas con PCPA fueron incapaces de aprender las nuevas posiciones de los reforzadores. Mientras que en el laberinto radial se encontró un aumento en la cantidad de errores en las ratas administradas con PCPA en los días postnatales 55 y 62 (Mazer, 1997).

Por otra parte, la administración de PCPA (300 mg/Kg durante 2 días y de 100 mg/Kg en los 3 posteriores) a los 3 meses de edad durante 5 días ó de 5,7 Dihidroxitriptamina (200 mg/ animal) produjeron disminución en la inervación serotoninérgica en el hipocampo. Por otro lado, se encontró una disminución en el número y supervivencia de células progenitoras hipocámpicas de la zona subgranular y de la capa de células granulares en las ratas administradas con PCPA, no así en las administradas con 5,7 Dihidroxitriptamina (Jha *et al.*, 2006).

Una vez que se encontró que la disminución en los niveles de serotonina tiene como consecuencia cambios en el sujeto (en este caso ratas) se comenzó a indagar en los efectos de la disminución de los niveles de serotonina durante la vida prenatal.

Efectos de la depuración de 5-HT durante la vida prenatal

En los últimos años se han empleado métodos genéticos para explorar los efectos de la disminución de serotonina durante el desarrollo, encontrando que el ratón *knockout* (KO) para el gen *Pet-1* *-/-* produce la pérdida de aproximadamente el 70% de las células serotoninérgicas (Erikson *et al.*, 2007; Kiyasoba *et al.*, 2011). Así mismo, en la prueba conductual de laberinto elevado en cruz realizada a estos ratones KO durante la vida adulta

se encontró mayor latencia a permanecer en los brazos abiertos del laberinto (Kiyasoba *et al.*, 2011).

El modelo KO del gen que codifica para la enzima hidroxilasa de triptófano en el sistema nervioso central Tph2 *-/-* produce 96-99% de reducción en la cantidad de serotonina central, mientras que el doble KO Tph1 (hidroxilasa de triptófano periférica)/Tph2 reduce un 94-99% la cantidad de serotonina central (Kiyasoba *et al.*, 2011).

Por otro lado, estudios en los que se administró PCPA durante los días de gestación 12-17 (DG 12-17) (300mg/kg, seguido de 100 mg/kg) se encontró una disminución en los niveles de serotonina cerebral en el grupo experimental 6 horas después de la administración, alcanzándose el máximo nivel de inhibición a las 72 horas posteriores a ésta; aunado a esto se encontró disminución en el peso corporal en el día P30 y 80, disminución en el peso cerebral en los días P 13, 20, 30 y 80, así como cambios en las neuronas corticales en el día P8 en el grupo experimental. En los días P0 y 8 se encontró que no hay cambios en los niveles de inmunoreactividad para Map2 en las células piramidales, pero sí una disminución en la arborización dendrítica en las capas III y V en el grupo administrado con PCPA (Vitalis *et al.*, 2007).

Lauder y cols. (1985) administraron PCPA a hembras gestantes durante los DG13-14 ó 14-15, utilizando en el primer día una dosis de carga de 300 mg/Kg y para la segunda administración 100 mg/Kg, un día después de la administración (día 15 ó 16) se extrajeron los fetos, en los que encontró una disminución de aproximadamente el 50% de neuronas serotoninérgicas en los núcleos del rafe.

Estudios en los que se proporcionan dietas libres de triptófano a las ratas de manera crónica durante la gestación (DG 8-22) se ha encontrado una disminución del 35% en el número de neuronas inmunoreactivas a serotonina en el NRD en el día P0, así como un rearrreglo en la distribución de estas neuronas en el NRD (Flores-Cruz y Escobar 2012).

En estudios realizados por Vataeva y cols (2007) se encontró una disminución en los niveles de 5-HT cerebral en los días E14 y E17 como consecuencia de la administración de PCPA en los DG 8-11 (200/100/100/50 mg/Kg) en ratas, así mismo, se encontró aumento en la actividad en campo abierto así como disminución en la respuesta a estímulos aversivos o novedosos (Vateava *et al.*, 2008).

JUSTIFICACIÓN

El sistema serotoninérgico es un sistema de neurotransmisión que aparece en etapas tempranas del desarrollo, se sabe que durante esta etapa participa en diferentes procesos como: migración, diferenciación, sinaptogenesis, entre otros (Lauder, 1981; Vitalis, 1998; Whitaker-Azmitia, 1996, 2001; Gaspar 2003; Bonnin, 2007), mientras que durante la vida post natal actúa como reguladora de diferentes conductas (Azmitia *et al.*, 1996, Gaspar *et al.*, 2010).

Se ha observado que todos estos procesos se ven afectados ante cambios en la cantidad de serotonina en el sistema causando diferentes alteraciones, por ejemplo: la disminución en los niveles de serotonina durante el desarrollo de su mismo sistema tiene como consecuencia, disminución en la cantidad de neuronas serotoninérgicas, así como disminución en el peso cerebral y corporal de las crías en días posteriores al nacimiento (Lauder *et al.*, 1985; Azmitia *et al.*, 2001; Gaspar *et al.*, 2003; Vitalis *et al.*, 2007).

Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados no toman en cuenta los eventos que ocurren durante el desarrollo del sistema serotoninérgico, por lo que se desconoce la existencia de periodos críticos durante el desarrollo de este sistema de neurotransmisión.

En este proyecto se buscó disminuir la cantidad de serotonina en dos momentos específicos del desarrollo del sistema serotoninérgico de la rata (proliferación y diferenciación, ya que ambos procesos se presentan en días específicos del desarrollo del sistema serotoninérgico), con la finalidad de determinar si estos se modifican de manera diferencial o si dicha disminución los afecta de igual manera existiendo un periodo más sensible ante la disminución de serotonina en el sistema que otro. Por lo que la pregunta de investigación es:

¿Qué momento del desarrollo del sistema serotoninérgico es más sensible a la disminución de serotonina durante el desarrollo del sistema serotoninérgico: proliferación o migración?

OBJETIVOS

Generales

- Estudiar el efecto de la disminución de serotonina durante distintos periodos del desarrollo prenatal del sistema serotoninérgico, con el fin de determinar si existen periodos más sensibles a la falta de serotonina.

Específicos

- Determinar el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina durante el periodo de diferenciación o de proliferación celular del sistema sobre:
 - La ganancia de peso corporal de las ratas durante la gestación, la cantidad de crías muertas y vivas al nacimiento, la tasa de supervivencia de las crías, así como el peso corporal y cerebral de las crías.
 - La morfología y el número de neuronas que sintetizan serotonina en el núcleo del rafe dorsal.
 - La cantidad de serotonina cerebral total durante la vida postnatal.
 - La conducta espontánea de los sujetos en la etapa juvenil.
- Determinar si la disminución de serotonina afecta a cada uno los periodos (proliferación y diferenciación) de manera distinta, siendo alguno más sensible a la manipulación que el otro.

Hipótesis

- La depuración de serotonina durante el proceso de diferenciación o proliferación celular del sistema serotoninérgico tendrá como consecuencia cambios específicos dependiendo del momento de inhibición serotoninérgica en: la ganancia de peso corporal de las ratas durante la gestación, la cantidad de crías muertas y vivas al nacimiento, la tasa de supervivencia de las crías, el peso corporal y cerebral de las crías, en la morfología en el núcleo del rafe dorsal, la cantidad del neurotransmisor y la conducta del sujeto.
- Como consecuencia de los cambios específicos en los procesos diferenciación o proliferación se podrá determinar cual de los dos es más sensible a la disminución en la cantidad de serotonina.

MÉTODO

Sujetos

Se utilizaron 61 ratas Wistar nulíparas, las cuales se pusieron a gestar para obtener crías para las manipulaciones descritas mas adelante. El peso inicial de las hembras fue de 250-300g, las ratas gestantes permanecieron alojadas en parejas en cajas ámbar de plexiglás hasta llegar al día 20 de gestación, momento en el cuál se les alojó individualmente. Tanto las ratas gestantes como las crías permanecieron en una sala privada del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con temperatura constante y controlada (22°C), ciclo luz-oscuridad 12-12 y acceso libre a agua y alimento.

Diseño experimental

En el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar gestantes a las cuales se les administro el fármaco PCPA con la finalidad de inhibir la síntesis de serotonina, dado que el momento en que las primeras neuronas serotoninérgicas diferenciadas aparecen en el DE 12 y el pico de proliferación ocurre en el DE 15 se decidió establecer dos ventanas temporales para la inhibición de la síntesis de serotonina. El fármaco PCPA presenta la mayor eficiencia de inhibición 72 hrs. posteriores a la administración por lo que las ventanas temporales a las cuales se asignaron las ratas fueron: i) administración de PCPA en los días de gestación 8-12 (diferenciación), ii) administración de PCPA en los días de gestación 13-17 (proliferación), iii) administración de vehículo (solución salina) en los días de gestación 8-12, iv) administración vehículo en los días de gestación 13-17 y v) control sin manipulación.

Se observo la ganancia de peso de las ratas durante la gestación, para esto se pesó a la rata desde el día de gestación 1 hasta el 20 de igual manera se pesó a las crías en los días postnatal (P) 0, P20, P30 y P40 para determinar si la manipulación tuvo efecto sobre la ganancia de peso de las crías, así mismo se determinó el peso cerebral sacrificando a la cría después de pesarla, para este procedimiento se emplearon tanto hembras como machos a excepción del día P40 en el cual se utilizaron únicamente machos. Para el día P0 se empleó una n=9 por grupo, tanto para la condición 8-12 como 13-17; para P20 se empleó una n=8 en cada grupo para la condición 8-12 y n=5 para la condición 13-17; para P30 se empleó una n= 5 por grupo, tanto para la condición 8-12 como 13-17 y por ultimo en P40 una n= 10 por grupo, en el caso de la condición 8-12 y n= 6 en el caso de la condición 13-17.

Para la cuantificación de neuronas se asignó una n=6 por grupo para inmunohistoquímica anti-hidroxilasa de triptófano en el día P0, así mismo una n=5 por grupo para cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en los días P0 y 40 y una n=4 por grupo para estudios conductuales en el día P40, dichos procedimientos se explican más adelante.

Procedimientos

Gestación

Las ratas nulíparas se pusieron a gestar colocando 3 ratas hembras y un macho por caja habitación, al día siguiente se tomó una muestra de fluido vaginal y se examinó en el microscopio tomando como el DE 0 aquel en el que se encontraron células cornificadas y espermatozoides (Marcondes *et al.*, 2002). Las ratas gestantes se pesaron a partir del DE 1 para que se habituaran a la manipulación disminuyendo así el estrés durante la administración farmacológica. Así mismo, se registró al nacimiento el número de crías vivas y muertas de todas las ratas gestantes utilizadas. Incluso aquellas en cuyo embarazo las crías murieron al interior de la madre, en este caso se realizó una cesárea y se extrajo a las crías para realizar en conteo de estas.

Administración farmacológica

La administración se llevó a cabo entre las 14:00 y 15:00 horas. Para determinar la cantidad de fármaco o vehículo se pesó a la rata en la balanza granataria, en el caso del grupo experimental se administró una dosis de carga el primer día (200 mg/Kg) y los días posteriores (100 mg/ Kg), mientras que para el grupo control se administró solución salina (2ml/kg). La administración se llevó a cabo de manera intraperitoneal (ip) con jeringa de insulina (BD Ultrafine), la inyección se realizó del lado izquierdo en todos los animales, esto debido a que se registró un mayor número de muerte experimental en las ratas gestantes que se administraban en ambos lados (derecha e izquierda).

Sacrificios

Las crías sacrificadas en los días postnatales P0 y 40 con pentobarbital sódico 50mL/Kg, se perfundieron transcárdialmente con amortiguador de fosfatos-salina (PBS) 0.1 M pH 7.2 y paraformaldehído (PFA) al 4%, los cerebros se extrajeron para su posterior

análisis histológico mediante inmunohistoquímica anti hidroxilasa de triptófano, mientras que para el análisis de HPLC se perfundieron con PBS y se sonicaron con PCA, por ultimo para explorar el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina durante la vida postnatal sobre el peso cerebral se sacrifico a las crías en los días P 0, 20, 30 y 40, las cuales se perfundieron con PBS y posteriormente se registró el peso cerebral, los días antes mencionados se eligieron con la finalidad de observar si es que existian cambios a lo largo de la vida de los sujetos.

Inmunohistoquímica

Con el fin de evaluar la morfología del NRD así como cuantificar el número de neuronas productoras de serotonina al nacimiento (P0) se realizó inmunohistoquímica para la enzima hidroxilasa de triptófano, ya que esta se encuentra únicamente en neuronas serotoninérgicas. Cabe mencionar que el fármaco PCPA inhibe a esta enzima ocupando el sitio activo y no interfiere con su síntesis por lo que la manipulación no afecta el conteo de células inmunoreactivas a esta enzima. Después de la perfusión con PBS-PFA, se extrajeron los cerebros y se dejaron en post-fijación por inmersión en PFA 4% durante 3 días seguido de 3 días en sacarosa al 30%, a 4° C.

Se realizaron cortes coronales de 70 μm en microtomo de congelación, los cortes se colectaron en pozos con PBS a 4° C. Se bloquearon peroxidasas endógenas con solución de H_2O_2 al 1.8% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS, e incubaron a 4° C durante 48 horas en anticuerpo primario policlonal de oveja anti hidroxilasa de triptófano (1:1000 en una solución de 1% de suero normal de conejo y 0,3% de Triton X100 en PBS). Los cortes se lavaron con PBS e incubaron a 4° C durante 48 horas en anticuerpo secundario biotinilado anti-oveja (1:200 en 1% de suero normal de conejo y 0.3% de Tritón X100 en PBS). Al finalizar la incubación se realizaron lavados con PBS y se incubaron con el Kit AB (9 μl / mL de PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron con PBS. El revelado se hizo con el kit de diaminobenzidina, deteniendo la reacción con PBS. Los cortes se montaron en laminillas pretratadas con poly-L lisina y se cubrieron con Entellan (Merck Cat: 7961).

Conteo de neuronas positivas a TryOH

La cuantificación neuronal se realizó tomando fotomicrografías del núcleo dorsal del rafe con el microscopio (Zeiss Axio Imager A1), las cuáles se guardaron en formato JPEG. Se obtuvieron cortes de de 70 micras y solo se consideraron para el conteo las neuronas que se encontraron en el primer plano del objetivo 20x, con lo cual se eliminó la posibilidad de contar dos veces a la misma neurona. Se obtuvo un promedio de 9 cortes por sujeto que contenían al NRD, correspondientes a las láminas 19, 20 y 21 del día 21 del atlas del desarrollo de rata de Altman y Bayer (1995). La totalidad del NRD fue capturado en fotomicrografías (aprox 15 fotos por corte), las cuales se analizaron con el programa ImageJ (NIH) utilizando el contador de células, el cual permite identificar de manera independiente cada una de las neuronas en la fotomicrografía.

Cuantificación de 5-HT mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Con el fin de conocer la producción de 5-HT posterior a la manipulación gestacional y durante el desarrollo postnatal se realizó HPLC del tejido cerebral total, lo que permitió conocer el perfil de producción del neurotransmisor durante el desarrollo.

La cuantificación de serotonina mediante HPLC con sistema de detección UV se llevó a cabo en P0 y P40. Las ratas se perfundieron transcárdialmente con PBS, se les decapitó y extrajo el cerebro, este fue disectado en tallo y corteza (CX) y depositado en alícuotas de 2mL con 30 μ L de ácido perclórico 0.1M y EDTA 0.1 mM posteriormente fueron sonicados 3 x 20 s y ultracentrifugados a 4°C durante 20 min a 12,000 rpm. El sobrenadante fue colectado y transferido a otra alícuota para centrifugar por segunda vez; se tomó una muestra de 15 μ L para la cuantificación de proteínas y el resto se transfirió a otra alícuota y fue almacenado a -20 °C. Posteriormente fueron llevados para su análisis a la unidad de HPLC del Instituto de Investigaciones Biomédicas, donde el sobrenadante obtenido mediante el procedimiento descrito previamente, se filtró y se inyectó un volumen de 10 μ L en la columna, con un flujo de la fase móvil de 1.0 mL/min. La serotonina se detectó a una longitud de onda de 270nm.

Cuantificación de proteínas

Se realizó la curva estándar de acuerdo al Kit de cuantificación Bio-Rad con PBS y BSA, posteriormente se colocaron 5 μ L de la muestra por duplicado en placas para ELISA de

96 pozos. Se utilizó 1 mL de la solución A del kit de cuantificación de proteínas de Bio Rad más 20 μ L de la solución S, colocando 25 μ l de dicha solución en las muestras. Luego se agregaron 200 μ l de la solución B del kit, se incubó durante 10 min y se llevo al lector de placas ajustándolo a 630 nm; los datos se ajustaron a los μ g de serotonina / μ g de proteína.

Análisis conductual

Con el fin de evaluar la integridad perceptual de la rata se utilizó la prueba de campo abierto (CA); se utilizaron 4 ratas macho de 40 días de vida por condición experimental. Esta prueba consistió poner a la rata en la arena durante 5 min. Dicha arena consistió en un cuadrante de 90 x 90 x 40 cm, en condición de iluminación intensa para determinar la conducta ante situaciones aversivas (500W=341500 luxes). Los ensayos se realizaron durante la fase de oscuridad, dos horas después del apagado de las luces. Cada ensayo fue videograbado, evaluándose los siguientes parámetros: tiempo de inmovilidad, tiempo de congelamiento, tiempo de acicalamiento, distancia recorrida (# de cruces en el CA), tiempo en la periferia, tiempo en el centro, rascado, exploración vertical (*rearing*), número de bolos fecales.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados para determinar normalidad y homogeneidad de varianzas, se realizó la prueba *post hoc* de Tukey Honestly Significant Difference, por sus siglas en ingles (HSD) cuando se asuma que hay homogeneidad de varianza y la prueba Dunnett T3 en caso de que no haya homogeneidad de varianza. El análisis de ganancia de peso de las hembras gestantes se realizó la prueba ANOVA mixto para identificar las interacciones de la ganancia de peso entre las condiciones.

Para los análisis de natalidad y mortalidad de crías, peso corporal, cerebral, cuantificación de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano, HPLC y campo abierto se realizo la prueba ANOVA de una vía con la finalidad de identificar si existían diferencias entre entre condiciones, teniendo como variable independiente los parámetros antes mencionados y como variable dependiente la condición, el nivel de significancia estadística fue fijado en $p < 0.05$.

RESULTADOS

Efecto de la administración prenatal de PCPA y vehículo sobre el peso corporal de las hembras gestantes.

Para el análisis de la ganancia de peso de las ratas gestantes se tomó a las 3 ratas control empleadas en este experimento, para la condición salina 13-17 se eligieron 4 ratas al azar, mientras que para las condiciones salina 8-12, PCPA 8-12 y PCPA 13-17 se tomó en cuenta una n=5. Las ratas se pesaron a partir del día 1 de gestación hasta el 20, para obtener la ganancia de peso por día se tomó en cuenta el peso inicial de la rata y este fue restado a cada uno de los pesos subsecuentes hasta el día 20 de gestación.

La prueba ANOVA de medidas repetidas no mostró cambios estadísticamente significativos, lo cual sugiere que la disminución en la tendencia a la baja en el peso corporal de la madre se debe a efectos de la manipulación y no a efectos del fármaco (Ver Anexo I).

Tasa de natalidad, mortalidad y abortos por condición

Con el fin de conocer el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina en ambas ventanas temporales sobre la gestación materna, así como el número total de crías llegadas a término y aquellas que sobrevivieron después del nacimiento se evaluaron los promedios de crías vivas al nacimiento, crías muertas al nacimiento, crías muertas del día 0 al 3 del nacimiento y abortos por cada una de las condiciones.

Se encontró que las ratas cuya inhibición de la síntesis de serotonina ocurrió durante los DG 13-17 presentan una mayor tasa de mortalidad post nacimiento en comparación con los controles de esta ventana, [F (2,23)= 6.510 p=0.004], así como con la condición salina 13-17 [F (2,23)= 6.510 p=0.012]. Así mismo, se observa un aumento de aproximadamente del 50% en la cantidad de abortos durante la administración de PCPA durante los días E13-17 (ver Tabla II a continuación).

Tabla II:

Promedio de natalidad y mortalidad en las crías por cada una de las condiciones. La N representa el número de camadas para cada condición. Se muestran cambios estadísticamente significativos en el número de crías muertas post nacimiento entre el grupo PCPA 13-17(indicado con: *) con respecto al grupo control y salina 8-12 $p=0.004$ y $.012$ respectivamente (ANOVA de una vía, post hoc Dunnett T3) los resultados se muestran en media +/- el error estándar.

Condición	N	Crías vivas al nacimiento	Crías muertas al nacimiento	Crías muertas post nacimiento	Abortos
Control	3	11.333 +/- 1.452	0.666 +/- 0.333	0	0
Salina 8-12	11	10.4 +/- 1.016	0.2 +/- 0	1.2 +/- 1.042	1
PCPA 8-12	15	8.090 +/- 1.325	0.272 +/- 0.134	1.545 +/- 1.386	2
Salina 13-17	11	9.555 +/- 1.167	0.111 +/- 0.111	0.555 +/- 0.555	2
PCPA 13-17	21	7.833 +/- 0.927	0.666 +/- 0.512	4.583 +/- 1.097 *	9

Efecto de la administración prenatal de PCPA y vehículo sobre el peso corporal de las crías.

Peso corporal crías 8-12

Las crías de cada una de las condiciones se pesaron en el día P0 (n=9), P20 (n= 8), P30 (n=5) y P40 (n=10) por condición, para la realización del análisis estadístico sólo se tomó en cuenta el peso correspondiente al día de sacrificio (día en el cual se extrajo el cerebro). Posteriormente se realizó un promedio del peso en cada uno de los puntos temporales por condición, se encontró que la inhibición de la síntesis de serotonina en los días 8-12 no modifica la ganancia de peso corporal de las crías, sin embargo, se observó una disminución en el peso corporal en las crías de la condición salina 8-12 en los días P0 [F (2,24)= 5.920, $p=0.008$] y P20 [F (2,22)= 11.400, $P=0.000$], con respecto al grupo control y PCPA 8-12 como se muestra en la Figura 7, lo cual sugiere que la administración de solución salina durante los días 8-12 genera estrés en las crías.

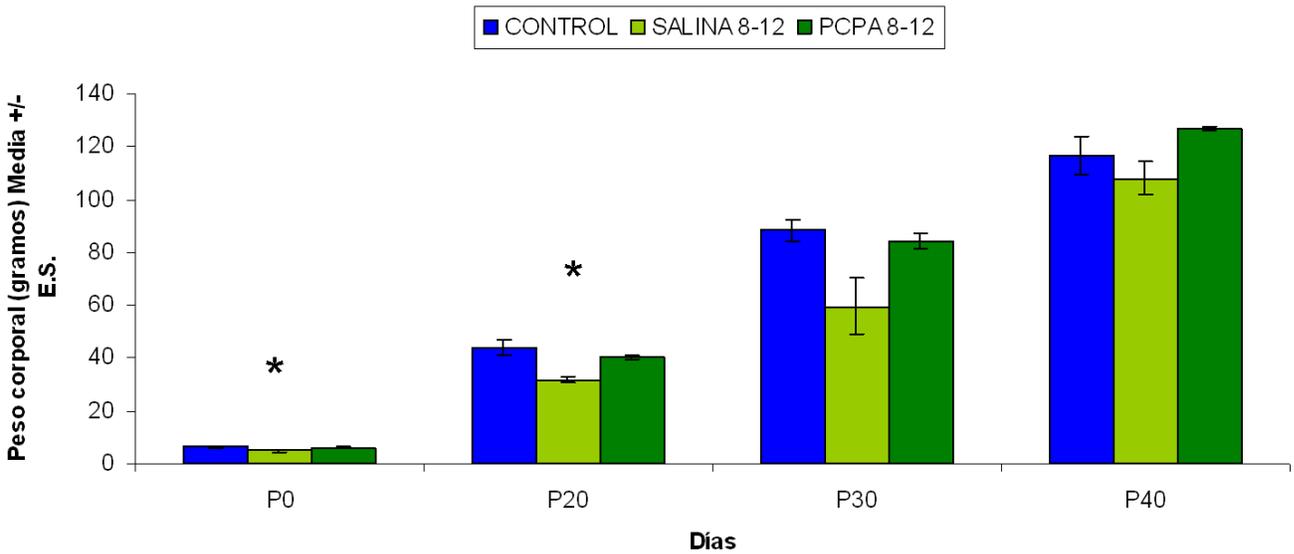


Figura 7. Peso corporal en los días P0, P20, P30 y P40 en los grupos administrados entre los días 8 y 12 de gestación. Se muestra una disminución del peso corporal en la condición salina 8-12 en el día posnatal 0 y 20 con respecto al grupo control y PCPA 8-12 (ANOVA de una vía, *post hoc* P0 Tukey, P20 Dunnett T3, $p < .05$, marcada con *). Los resultados se muestran en media +/- el error estándar.

Peso corporal crías 13-17

Para evaluar el efecto de la síntesis de serotonina en la ganancia de peso corporal de las crías durante los días de administración 13-17 se empleó una $n=9$ para el día P0, $n=5$ para los días P20 y P30, por último, se empleó una $n=6$ para el día P40 por condición. Se encontró que la inhibición de la síntesis de serotonina durante los días 13-17 tuvo como resultado disminución en el peso corporal en el día P20 en el grupo PCPA 13-17 con respecto al grupo salina 13-17 y control [F (2,11)= 6.875, $P=0.012$] (ver Figura 8).

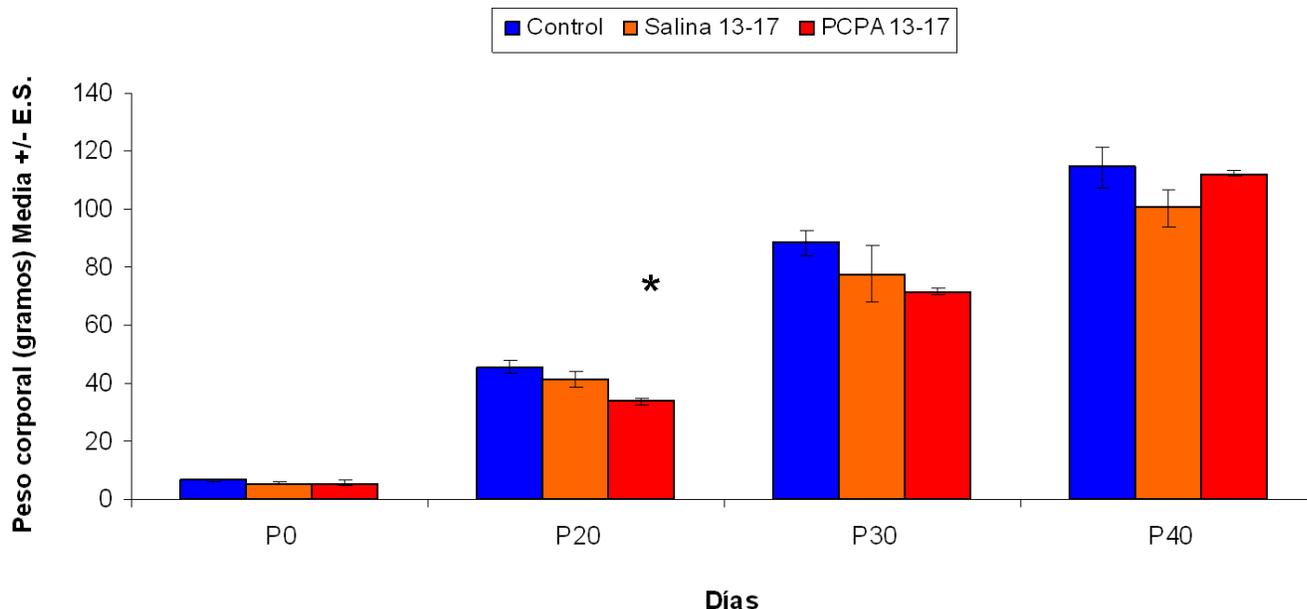


Figura 8. Peso corporal en los días P0, P20, P30 y P40 en los grupos administrados entre los días 13 y 17 de gestación. Se muestra una disminución del peso corporal en la condición PCPA 13-17 en el día posnatal 20 con respecto al grupo control y salina 13-17 (ANOVA de una vía, $p < .05$, marcada con *). Los resultados se muestran en media +/- el error estándar.

Efecto de la administración prenatal de PCPA y vehículo sobre el peso cerebral de las crías

Peso cerebral 8-12

Con el fin de conocer el efecto de la inhibición en la síntesis de serotonina sobre el peso cerebral de las crías se registró el peso en los días P0 (n=9), P20 (n=8), P30 (n=5) y P40 (n=10). Los pesos cerebrales corresponden a cada una de las crías pesadas por lo que la n es igual tanto para el peso corporal como cerebral. Se encontró que la inhibición de la síntesis de serotonina no mostró cambios en el peso cerebral entre el grupo control y experimental, pero sí mostró una disminución en el peso cerebral en el grupo Salina 8-12 en el día P30 con respecto al grupo control y PCPA 8-12 [$F(2,12) = 11.796, P = 0.001$] (Ver Figura 9).

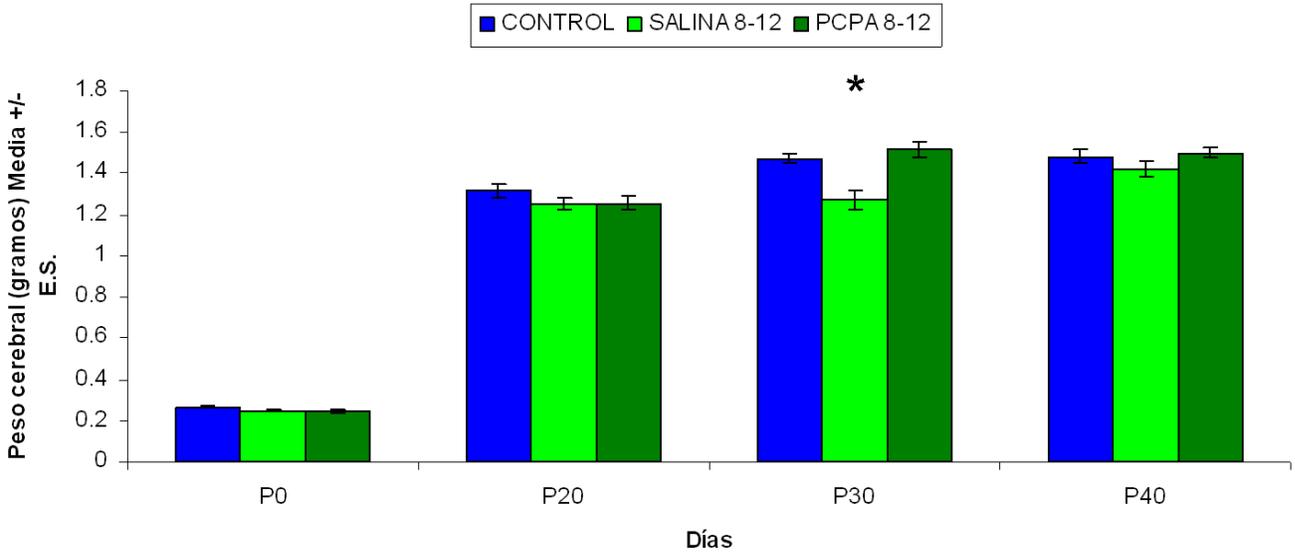


Figura 9. Peso cerebral en los días P0, P20, P30 y P40 en los grupos administrados entre los días 8 y 12 de gestación. Se muestra una disminución del peso corporal en la condición Salina 8-12 en el día posnatal 30 con respecto al grupo control y PCPA 8-12 (ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey, $p < .05$, marcada con *). Los resultados se muestran en media +/- el error estándar.

Peso cerebral 13-17

Para la evaluación del peso cerebral de las crías durante la inhibición de la síntesis de serotonina en los días 13-17 se empleó por condición una $n = 9$ para P0, $n = 5$ para P20 y P30, por último $n = 6$ para P40. Se encontró que la inhibición tuvo como efecto una disminución en la ganancia de peso cerebral de las crías en los días P20 [$F(2,11) = 13.790$, $p = 0.001$] y P30 [$F(2,12) = 13.269$, $p = 0.001$] en el grupo PCPA 13-17 con respecto al grupo control, así como al grupo Salina 13-17 (Ver Figura 10).

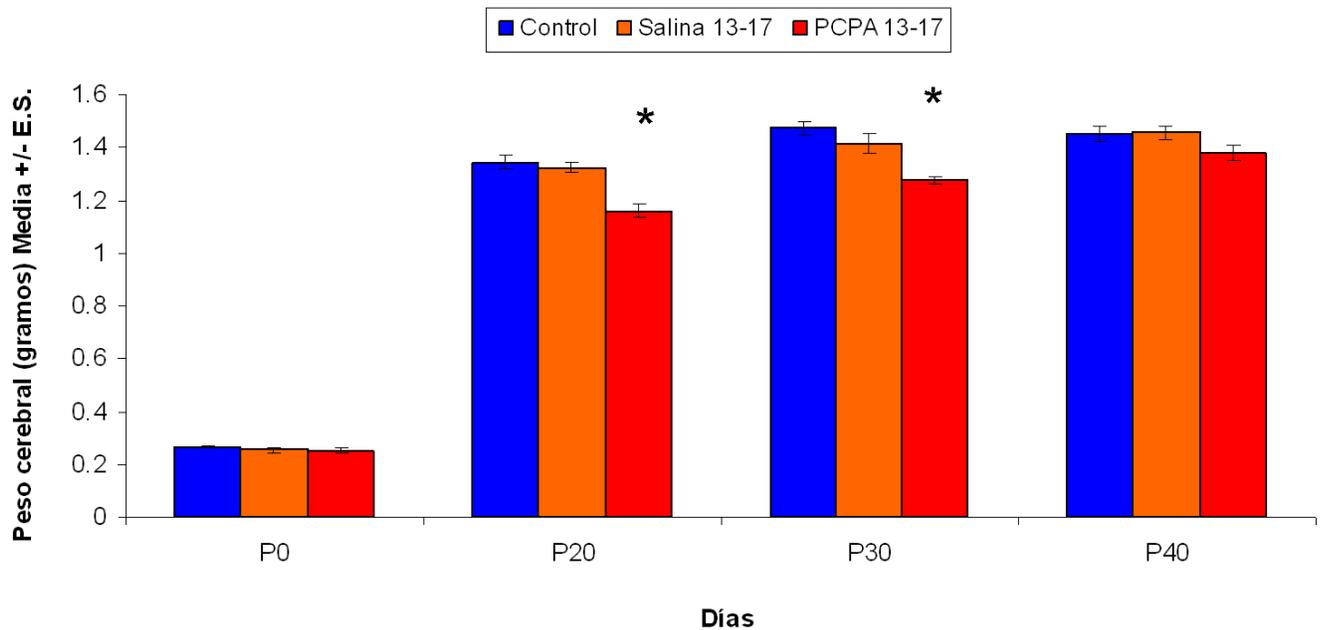


Figura 10. Peso cerebral en los días P0, P20, P30 y P40 en los grupos administrados entre los días 13 y 17 de gestación. Se muestra una disminución del peso cerebral en la condición PCPA 13-17 en el día posnatal 20 y 30 con respecto al grupo control y salina 13-17 (ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey, $p < .05$, marcada con *). Los resultados se muestran en media +/- el error estándar.

Efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina prenatal sobre el número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano en el NRD

Conteo celular ventana 8-12

Con el fin de conocer el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina sobre el número de neuronas serotoninérgicas se realizó una inmunohistoquímica para hidroxilasa de triptófano, las secciones correspondientes al NRD fueron analizadas con ayuda del programa ImageJ. Se encontró que la inhibición durante los días 8-12 modificó el número de neuronas inmuno reactivas a hidroxilasa de triptófano, encontrándose una disminución en el grupo PCPA 8-12 [$F(2,15) = 11.816$ $p = 0.001$] con respecto al grupo control y salina 8-12 (Ver Figura 11).

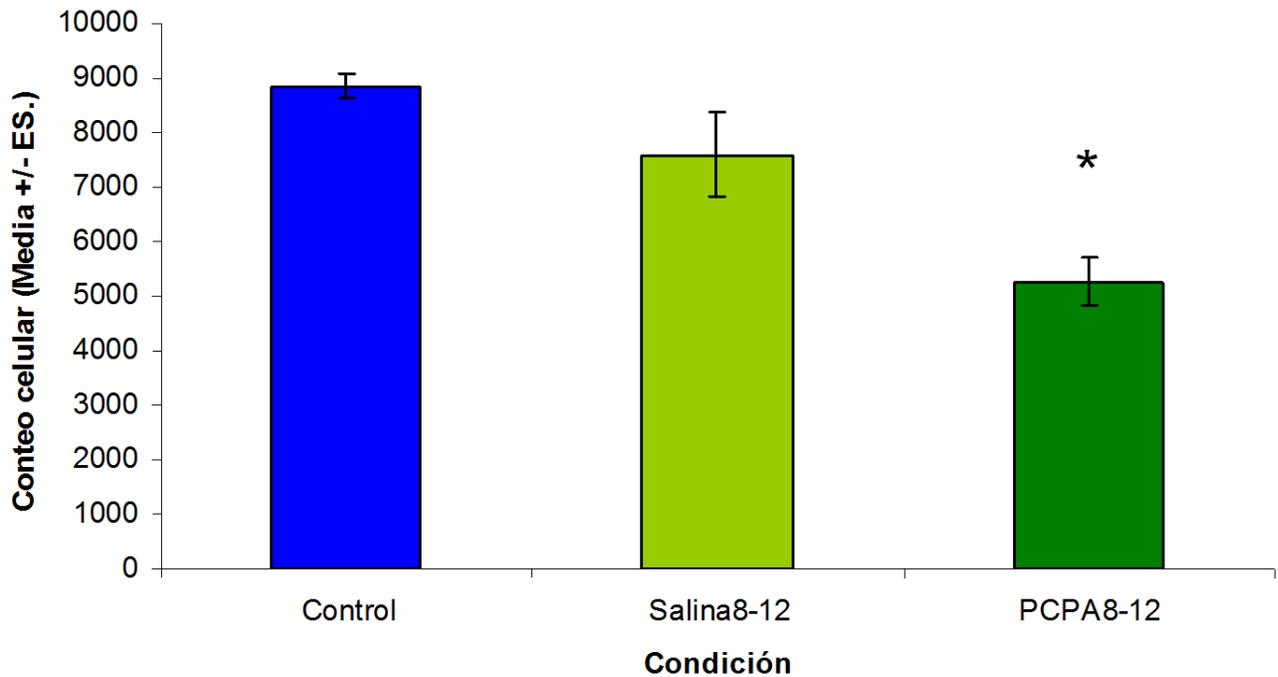


Figura 11. Número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano. Se muestra una disminución en el número de neuronas serotoninérgicas en la condición PCPA 8-12 con respecto al grupo control y salina 8-12 (ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey, $p < .05$ marcada con *). Los resultados se muestran en media +/- el error estándar.

Conteo celular ventana 13-17

Para la evaluación del número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano en los días de inhibición 13-17 se empleó una $n = 6$ en las condiciones control y S13-17, $n = 5$ en la condición PCPA 13-17. La inhibición de la síntesis de serotonina modificó el número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano disminuyendo el número de estas en el grupo PCPA 13-17, [$F(2,14) = 6.948$, $p = .008$] con respecto al grupo control y Salina 13-17 (ver Figura 12).

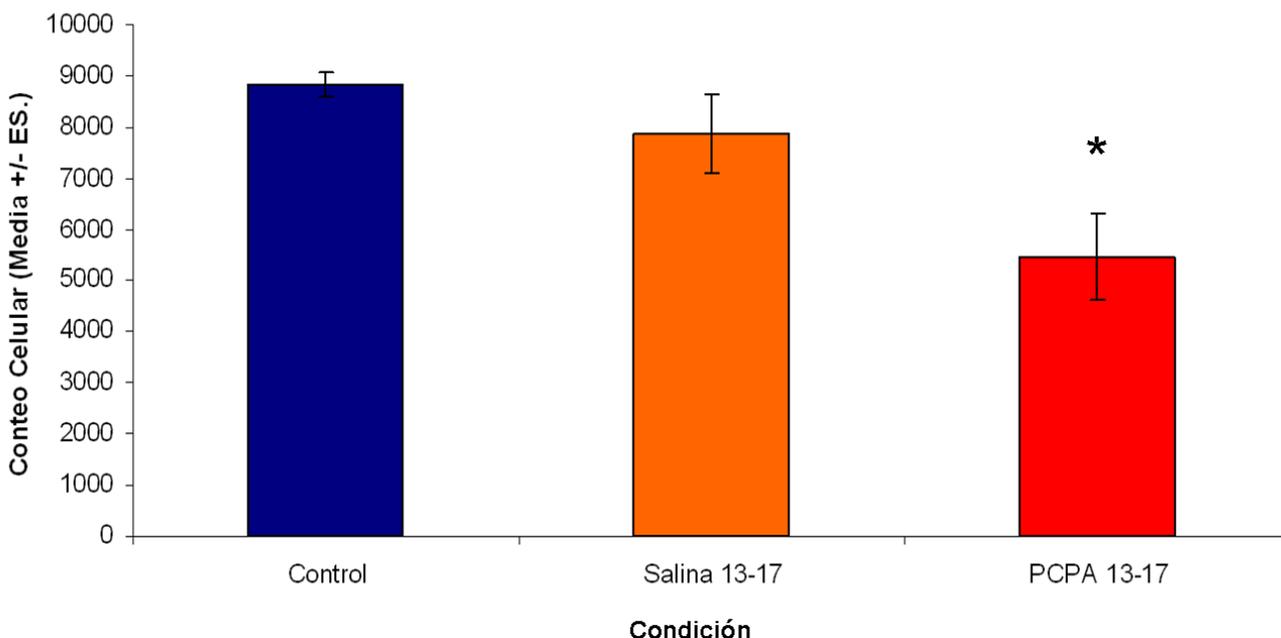


Figura 12. Número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano. Se muestra una disminución en el número de neuronas serotoninérgicas en la condición PCPA 13-17 en comparación con el grupo control y salina 13-17 (ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey, $p < .05$ marcada con *). Los resultados se muestran en media +/- el error estándar.

Cuantificación de serotonina (HPLC) P0

Para conocer el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina sobre la cantidad de serotonina cerebral al nacimiento se extrajo el cerebro en el día P0, este se procesó mediante el procedimiento descrito en la sección de método y se conservó a -20°C hasta su posterior análisis en la Subunidad de Cromatografía Líquida del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

La n empleada para este procedimiento en los días de inhibición 8-12 fue de: $n=5$ para el grupo control y PCPA 8-12, mientras que para el grupo Salina 8-12 se empleó una $n=6$. Para la inhibición en los días 13-17 se empleó una $n=5$ para el grupo control, $n=4$ para el grupo Salina 13-17 y $n=3$ para el grupo PCPA 13-17.

No se encontraron cambios estadísticamente significativos en la concentración de serotonina cerebral como consecuencia de la inhibición de la síntesis de serotonina en ninguna de las condiciones (ver Anexo I).

Cuantificación de serotonina (HPLC) P40

Cuantificación de serotonina en el tallo cerebral

Con la finalidad de conocer el efecto de la inhibición de serotonina prenatal sobre la cantidad de serotonina en la vida adulta se realizó la prueba de HPLC. El cerebro se seccionó en tallo y corteza, los cuales fueron procesados y almacenados a -20°C , según el protocolo descrito en la sección de método. La n empleada para este análisis en los días de inhibición 8-12 fue de: $n=5$ para los grupos control y salina 8-12, y $n=3$ para el grupo PCPA 8-12; para los días de inhibición 13-17 fue de: $n=5$ para el grupo control y $n=4$ en los grupos salina y PCPA13-17°. Se encontró que la inhibición de la síntesis de serotonina durante los días de gestación 8-12 ó 13-17 no tiene efectos sobre la cantidad de serotonina en tallo cerebral sobre ninguno de los grupos. (Ver Anexo II).

Cuantificación de serotonina en corteza

Una vez seccionado el tallo el cerebro fue cortado por la línea media y se tomó la corteza derecha para realizar la evaluación de los niveles de serotonina mediante HPLC. La inhibición en los niveles de serotonina durante los días de gestación 8-12 no tuvo efectos estadísticamente significativos entre la condición control y PCPA 8-12, sin embargo si presentó cambios en el grupo Salina 8-12 [$F(2,10) = 6.472$, $p = 0.016$] con respecto al grupo control, encontrándose un incremento en la cantidad de serotonina (ver Figura 13).

Por otro lado, con la inhibición de la síntesis de serotonina durante los días 13-17 se encontró aumento en la cantidad de serotonina en el grupo PCPA 13-17 [$F(2,10) = 20.954$, $p < 0.001$] en comparación con el grupo control y Salina 13-17 (ver Figura 13).

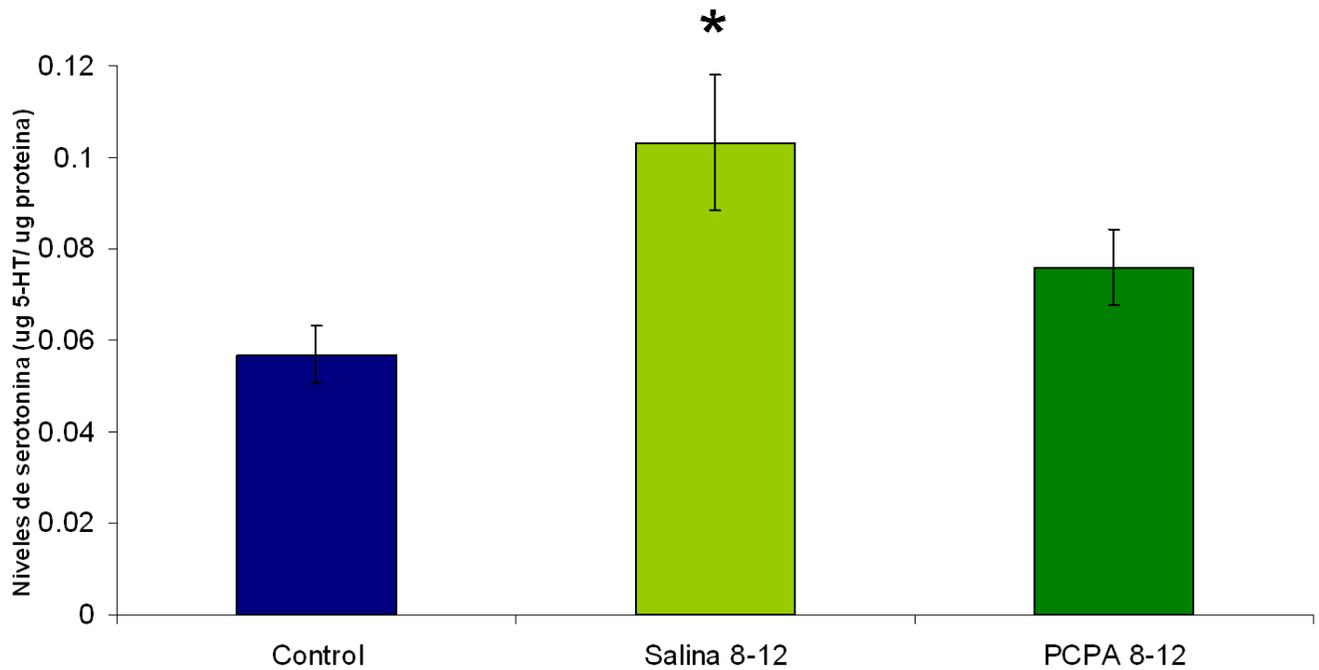


Figura 13. Cantidad de serotonina en corteza cerebral. Se muestra un aumento en la cantidad de serotonina en corteza en el día P40 en la condición salina 8-12 con respecto al grupo control (ANOVA de una vía, $p < .05$, marcada con *). Los resultados se muestran en media +/- el error estándar.

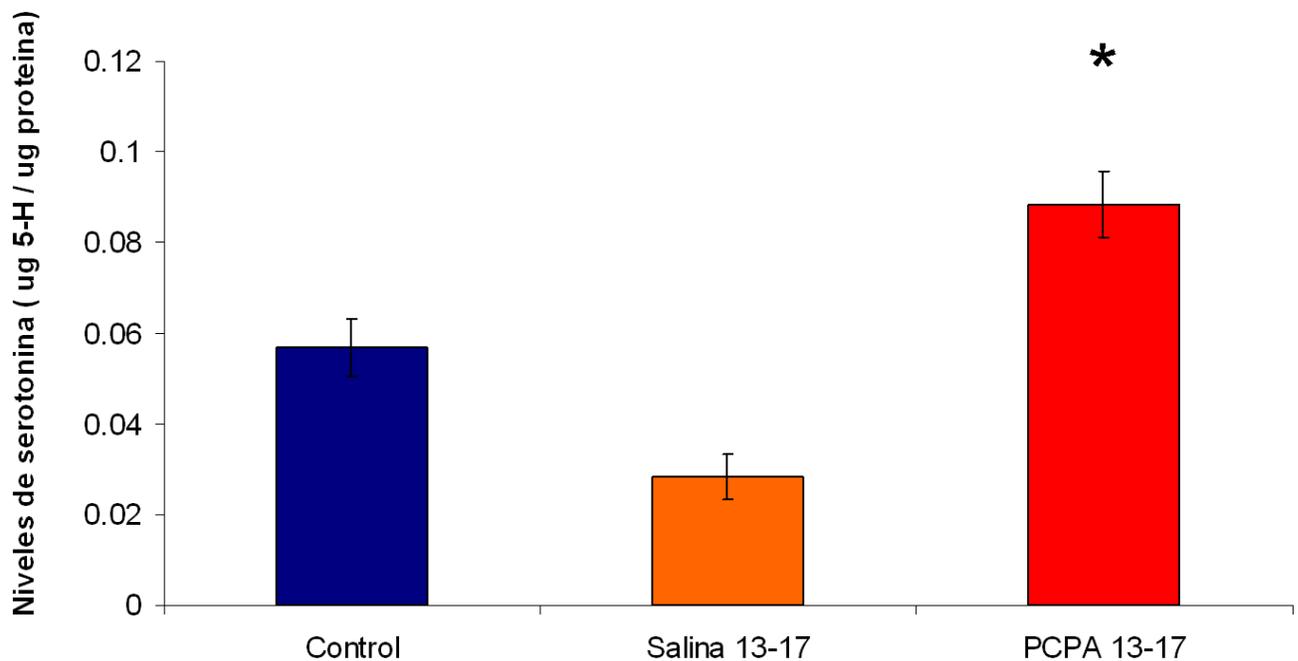


Figura 14. Cantidad de serotonina en corteza cerebral. Se muestra un aumento en la cantidad de serotonina en corteza en el día P40 en la condición PCPA 13-17 con respecto al grupo control y salina 13-17 (ANOVA de una vía, $p < .05$ marcada con *). Los resultados se muestran en media +/- el error estándar.

Análisis conductual

Prueba de campo abierto

Con el fin de explorar si la depuración de serotonina durante la vida prenatal tenía efecto sobre la conducta de los animales en situaciones aversivas se realizó la prueba de campo abierto. En esta prueba se sometió a las ratas a un pulso de luz de 500 watts durante 5 minutos, se evaluó el tiempo que el animal estaba dentro de un cuadrante moviendo únicamente vibrisas (inmovilidad), el tiempo que la rata permaneció completamente inmóvil (congelamiento), el tiempo de acicalamiento, la distancia recorrida (exploración horizontal), el tiempo en la periferia, el tiempo en el centro, rascado, exploración vertical (levantarse en 2 patas), y número de defecaciones (bolos fecales) minuto a minuto.

Se empleó una n=4 en los grupos: control, salina 8-12, PCPA 8-12 y salina 13-17, mientras que para el grupo PCPA 13-17 se empleó una n=3. Se encontró que la inhibición de la síntesis de serotonina prenatal no modificó ninguno de los parámetros evaluados en la prueba (ver Tabla Anexa III).

Discusión

El presente trabajo tuvo como propósito investigar la presencia de periodos sensibles a la inhibición de la síntesis de serotonina durante el desarrollo del sistema serotoninérgico, específicamente en el periodo en que aparecen las primeras neuronas diferenciadas (días de gestación 8-12) y el momento en que ocurre el pico de proliferación (días de gestación 13-17). Se encontró que la inhibición de la síntesis de serotonina en los días de gestación 8-12 no modificó la ganancia de peso de las madres, la cantidad de abortos, ni el número de crías muertas o vivas al nacimiento. Sin embargo, sí modificó el número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano, así como la distribución de éstas a lo largo del NRD.

Por otro lado, se observó que la administración de solución salina durante los días de gestación 8-12 provocó disminución en el peso corporal y cerebral de las crías, así como un aumento en la cantidad de serotonina en corteza cerebral en el día P40, apuntando así a la hipótesis de que los efectos de este grupo se debieron a estrés (esto se discutirá a detalle más adelante).

En cuanto al grupo cuya inhibición de la síntesis de serotonina ocurrió durante los días de gestación 13-17 se encontró que dicha inhibición tiene como consecuencia aumento en el número de muertes posteriores al nacimiento (0-3 días), así como disminución en el peso corporal y cerebral de las crías en días posteriores al nacimiento. De igual manera, esta manipulación tuvo como consecuencia disminución en el número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano, así como modificación en la distribución del NRD.

Efecto de la administración prenatal de PCPA y vehículo sobre el peso corporal de las hembras gestantes.

La prueba estadística de medidas repetidas no mostro cambios en ninguno de los grupos observándose que la baja en el peso observada en el Anexo I no se debe a la administración del fármaco si no mas bien al efecto de la administración intraperitoneal (ip) y no a la manipulación experimental.

Tasa de natalidad, mortalidad y abortos por condición

Al evaluarse la mortalidad post natal, se observó un incremento significativo en el grupo experimental PCPA 13-17; en esta condición las crías murieron debido a negligencia o canibalismo materno (conducta muricida). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vitalis y cols. (2007), quienes administraron PCPA en los días DE12-17 y observaron un aumento en la tasa de muerte postnatal de aproximadamente el 30% entre las 8-12 hrs. posteriores al nacimiento. Estudios de Copenhaver y cols. (1977) reportan una mayor frecuencia de conducta muricida por parte de las hembras expuestas a PCPA en las 24 horas siguientes al nacimiento; de igual manera, la inhibición de serotonina mediante la administración de PCA o dietas libres en triptófano promueve esta conducta (Eisestein, 1982).

Se sabe que cuando la cantidad de serotonina cerebral disminuye hay un incremento en la conducta agresiva de las ratas, una de las conductas en las que se ha observado dicho aumento es la conducta muricida (Pucilowski *et al.*, 1983). Esto se ha encontrado en diferentes experimentos en los que la lesión de los núcleos NRD y NRM (Barr *et al.*, 1976; Banerjee 1974; Vergnes *et al.*, 1973), la administración de una dieta libre de triptófano (Gibbons *et al.*, 1979), la administración de PCPA, así como con la administración de los agentes neurotóxicos 5,6-DHT ó 6,7-DHT (Breese *et al.*, 1974; Eichelman, 1973; Barr, 1976 y Paxinos & Atrens, 1977) tienen como consecuencia aumento en la conducta muricida. Por lo anterior, es posible que en las ratas a las que se les administró PCPA durante los días de gestación 8-12, la conducta agresiva se presente con menor frecuencia, debido a que los días de administración están más alejados del momento del nacimiento y el sistema puede recuperarse en comparación con la administración en los días de gestación 13-17.

Efecto de la administración prenatal de PCPA y vehículo sobre el peso corporal de las crías.

En cuanto al peso corporal de las crías post nacimiento, se encontró que la inhibición de la síntesis de serotonina durante los días 8-12 no modificó el peso corporal en las crías de la condición experimental al nacimiento, pero sí se modificó la ganancia de peso de las crías del grupo salina 8-12, presentando una disminución en los días P0 y 20 con respecto al grupo control. Estos resultados pueden deberse a efectos de estrés debidos a la administración ip. Peters (1990) utilizó como modelo de estrés la administración diaria de

una inyección de 0.1ml ip de solución salina desde el día de gestación 4 hasta el nacimiento. De manera similar, la administración ip de solución salina durante la última semana de gestación aumentó la secreción de corticosterona y hormona adrenocorticotropa (ACTH) en las crías evaluadas en P14 (Kofman 2002), lo cual supone que la madre estuvo estresada durante la administración de la solución salina, sin embargo en este trabajo sería necesario medir los niveles de corticosterona y ACTH para corroborar esta hipótesis.

La inhibición de la síntesis de serotonina durante los días 13-17 produjo disminución en la ganancia de peso de las crías en el día P20. Resultados similares se han encontrado en diferentes estudios como: Nakajima & cols. (1998) en donde muestran un menor peso corporal post-nacimiento en los días P1, 15, 20 y 25, después de una administración de PCPA en los DG 9-21; por otro lado Vitalis & cols. (2007) encontraron cambios en el peso corporal en los días P30 y 80 administrando PCPA en los DG 12-17 (dosis de carga: 300 mg/ Kg; 5 inyecciones subsecuentes de 100 mg/kg). Finalmente, Flores y Escobar (2012) encontraron que, al administrar una dieta libre de triptófano a partir del día 8 de gestación hasta el nacimiento, las crías muestran un menor peso corporal en los días P0, 10 y 20.

Efecto de la administración prenatal de PCPA y vehículo sobre el peso cerebral de las crías

La inhibición de la síntesis de serotonina durante los días 8-12 no modificó la ganancia de peso corporal en el grupo experimental, sin embargo, la administración de solución salina ip durante los días 8-12 produjo disminución en el peso cerebral en el día P30, lo cual daría una pauta más para suponer que los efectos encontrados en esta condición podrían ser debidos a estrés. Mientras que la inhibición de la síntesis de serotonina en los días de gestación 13-17 tuvo como consecuencia disminución en el peso cerebral de las crías de la condición PCPA en los días P20 y P30, resultados similares se encontraron en el grupo de Vitalis & cols (2007) los cuales reportaron disminución en el peso cerebral en los días P10, 20, 30 y 80, administrando PCPA en los días de gestación 12-17 (con una dosis de carga de 300 mg/kg y 5 inyecciones subsecuentes de 100mg/kg).

Efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina prenatal sobre el número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano en el NRD

Al realizar el conteo celular se encontró que la inhibición de la síntesis de serotonina produjo una disminución significativa en la cantidad de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano del NRD tanto en el grupo experimental 8-12 como en el 13-17. Resultados similares se han encontrado en los estudios de Lauder & cols. (1985), quienes administraron PCPA en una dosis inicial de 300 mg/kg en el DG 8 y de 100mg/kg en los días posteriores hasta llegar a los días de gestación 13, 14 ó 15 días en los cuales se sacrificó a la madre y las crías fueron extraídas, encontrando disminución del 50% en el número de neuronas serotoninérgicas en los núcleos B4-B9 mediante la técnica de densidad óptica. Otra evidencia es la aportada por Flores y Escobar (2012) quienes encontraron una disminución del 35% en el número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano en el NRD mediante una dieta libre de triptófano (DG8-22).

Miyazaki y cols. (2005) encontraron una redistribución del NRD en crías de madres administradas en el DG9 tanto con ácido valpróico como con talidomida (los cuales causan hiperserotoninemia) en el día P40. Dicha redistribución consistió en que todo el perfil del núcleo se desplazó hacia la porción caudal sin cambiar el número de neuronas inmunoreactivas a serotonina ni la forma de V invertida. Por otro lado Flores y Escobar (2012) encontraron una redistribución del NRD ante la depuración de triptófano en la dieta, en este caso se encontró que aunado a la disminución del número de neuronas inmunoreactivas a serotonina (aproximadamente 35%) el número de neuronas en la porción medial se ve drásticamente abatido.

Por otro lado estudios en donde se manipula genéticamente al sistema serotoninérgico (Hynes *et al.*, 2000. Cheng *et al.*, 2003., Kiyasoba *et al.*, 2011), han encontrado neuronas serotoninérgicas ectópicas, es decir las neuronas se encuentran fuera de su núcleo.

Tanto en el presente trabajo como en los trabajos mencionados anteriormente se muestra evidencia de que la cantidad de serotonina en el sistema modifica el número de neuronas inmunoreactivas a serotonina. Por lo que uno de los procesos en los que se tendría que ahondar es la relación que existe entre la cantidad de serotonina en el sistema y los procesos de autorregulación en los que podría estar participando, ya que como antes se

menciona un aumento en la cantidad de serotonina no modifica el número de neuronas serotoninérgicas, mientras que la disminución produce tanto decremento como anomalías en la distribución de las neuronas serotoninérgicas. Sin embargo no se puede descartar la muerte neuronal o incluso la disminución en la diferenciación de estas neuronas como posibilidades que para explicar la disminución en el número de neuronas serotoninérgicas y su redistribución en el núcleo, siendo necesarios estudios más concretos que nos permitan esclarecer a qué se debe el decremento en el número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano.

Cuantificación de serotonina (HPLC)

En cuanto a la cuantificación de serotonina (HPLC) se encontró que la disminución en la síntesis de serotonina no modifica la cantidad de serotonina en el día P0, esto podría deberse a que el fármaco está degradado para este día y a que la enzima hidroxilasa de triptófano se convierte en serotonina una vez liberado el sitio activo. Por otro lado se podría pensar que el sistema tiene algún mecanismo de compensación ya que se esperaría que la disminución en el número de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano tuviera como resultado disminución en la cantidad de serotonina cerebral.

En cuanto a la cuantificación de serotonina en el día P40 no se encontraron cambios en los niveles en el tallo cerebral. Estos resultados son similares a los encontrados por Kot y cols (2012), quienes no encontraron cambios en los niveles de serotonina en el tallo cerebral al administrar una dieta deficiente en triptófano a ratas adultas durante una semana.

En la corteza cerebral se encontró que en la ventana temporal 8-12 hay un incremento en la cantidad de serotonina en la condición salina 8-12, lo cual apoya la propuesta de que este grupo presenta estrés. Peters y cols. (1982), encontraron que el estrés crónico causado por inyecciones de solución salina administradas durante toda la gestación tuvo como consecuencia el incremento en los niveles de serotonina y el metabolito ácido 5-indolacético en la corteza cerebral en el día P16.

Por otro lado, la ventana 13-17 presentó un incremento en los niveles de serotonina en el grupo PCPA 13-17, con lo que se podría pensar que efectivamente el sistema tiene un mecanismo de compensación, sin embargo; es necesario realizar un experimento más detallado para corroborar esta hipótesis.

Para ello se propone llevar a cabo la prueba de HPLC para medir la cantidad de triptófano en el sistema, la enzima hidroxilasa de triptófano, así como los niveles del metabolito de serotonina ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), esto con la finalidad de observar si existen cambios en la cantidad entre las crías administradas con el fármaco y las que no, por otra parte se propone la realización de western blot para medir la cantidad del autorreceptor 5-HT_{1A}, el cual participa en la liberación de serotonina, por último se propone explorar la cantidad de enzima monoamino oxidasa mediante un ensayo enzimático para identificar cual de estos factores podría estar promoviendo dicha compensación.

Análisis conductual

Los estudios conductuales no mostraron ningún cambio en la conducta espontánea de la rata en ninguno de los parámetros evaluados (tiempo de inmovilidad, tiempo de congelamiento, tiempo de acicalamiento, distancia recorrida, tiempo en la periferia, tiempo en el centro, rascado, levantarse en dos patas, número de defecaciones). Esto concuerda con el estudio realizado por Vataeva y cols. (2007) en el cual administraron PCPA en los DG 8-11 ó 14-17 y en el día P30 sometieron a la prueba de campo abierto a las ratas, ellos observaron que no hay cambios en el número de cruces en ninguno de los grupos, por otro lado, Flores & cols (sin publicar) no encontraron cambios en los parámetros antes mencionados salvo en el levantarse en 2 patas al administrar una dieta libre de triptófano durante los DG 8-22.

Limitaciones y futuras direcciones

Dado que la prueba de campo abierto es una prueba muy general, se propone realizar en próximas investigaciones la aplicación de pruebas más especializadas como laberinto elevado o la prueba de nado forzado para observar la conducta de la rata.

Las limitaciones del presente trabajo fueron: la tasa de mortalidad de las madres, así como la cantidad de abortos y el canibalismo materno durante los días de administración 13-1, lo que tuvo como consecuencia una n reducida de esta condición, por lo cual se propone explorar una manera alternativa para disminuir la cantidad de serotonina cerebral, por ejemplo in agonista inespecífico de los receptores a serotonina o una dieta libre de triptófano.

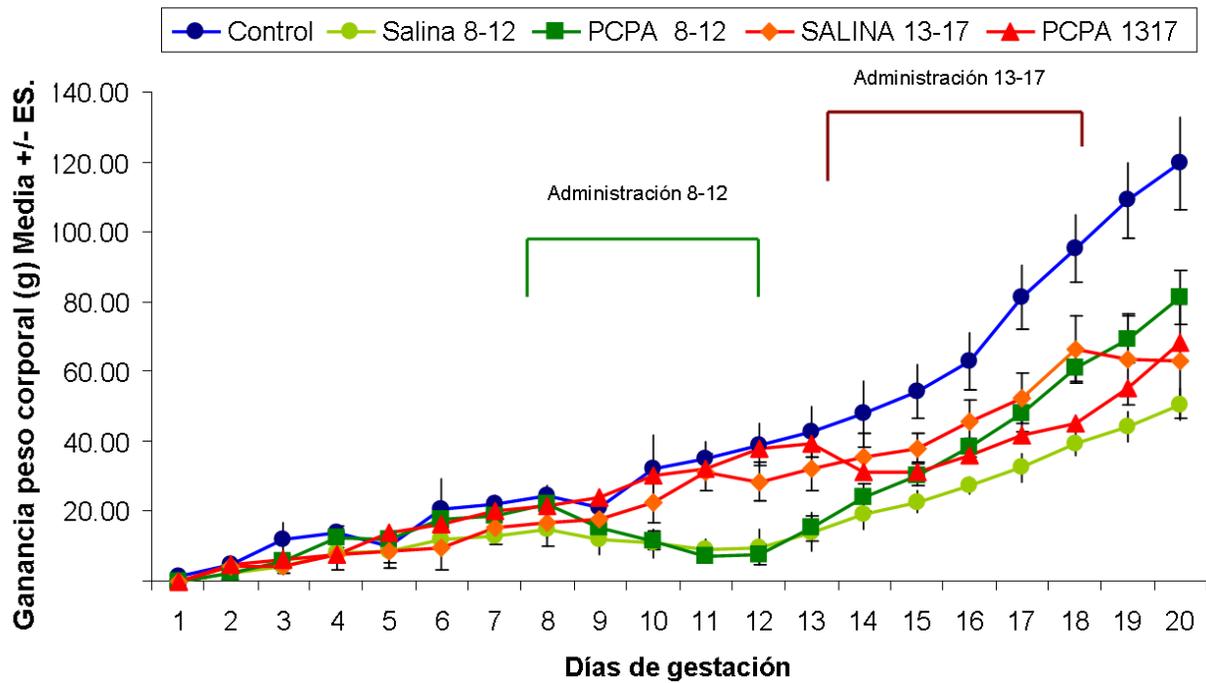
Por otro lado es necesario realizar la prueba de HPLC en el último día de administración de cada una de las ventanas de administración tanto en la madre como en las crías para determinar el porcentaje de inhibición de serotonina alcanzado en el sistema.

Así mismo se propone la elaboración de un modelo experimental que permita conocer cual es el mecanismo involucrado en la disminución de la cantidad de neuronas serotoninérgicas, los mecanismos que se propone explorar son: Diferenciación, muerte celular y migración.

CONCLUSIONES

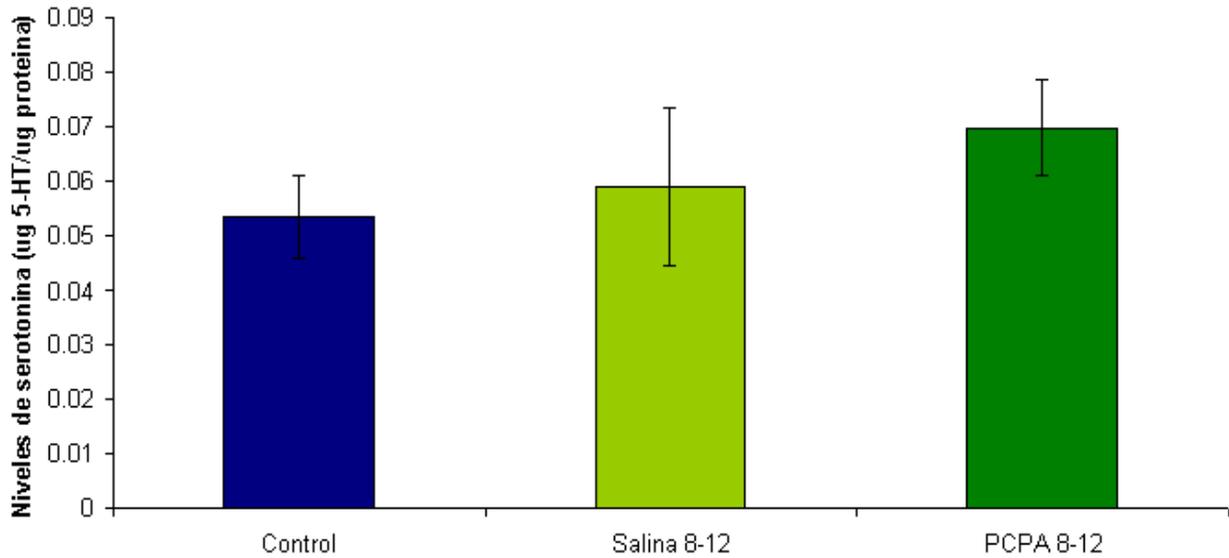
- La disminución de serotonina durante la gestación tiene efectos adversos en la conducta materna durante los días de inhibición 13-17, aumentando el canibalismo materno.
- La disminución de serotonina modifica la cantidad de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano en ambos momentos del desarrollo, así mismo modifica de manera diferencial la distribución del NRD dependiendo del momento de administración (días de gestación 8-12 ó 13-17), apoyando de esta manera la hipótesis de que la serotonina esta implicada en la regulación de la migración de neuronas serotoninérgicas durante el desarrollo de su propio sistema.
- La disminución de serotonina durante los días de gestación 13-17 aumenta la cantidad de serotonina en corteza cerebral, sugiriendo un mecanismo de compensación ante la disminución de neuronas serotoninérgicas.
- Debido a que en ambas condiciones se presenta disminución de la cantidad de neuronas inmunoreactivas a hidroxilasa de triptófano, no se puede concluir que exista un periodo más sensible que otro a la inhibición de la síntesis de serotonina.

Anexo I

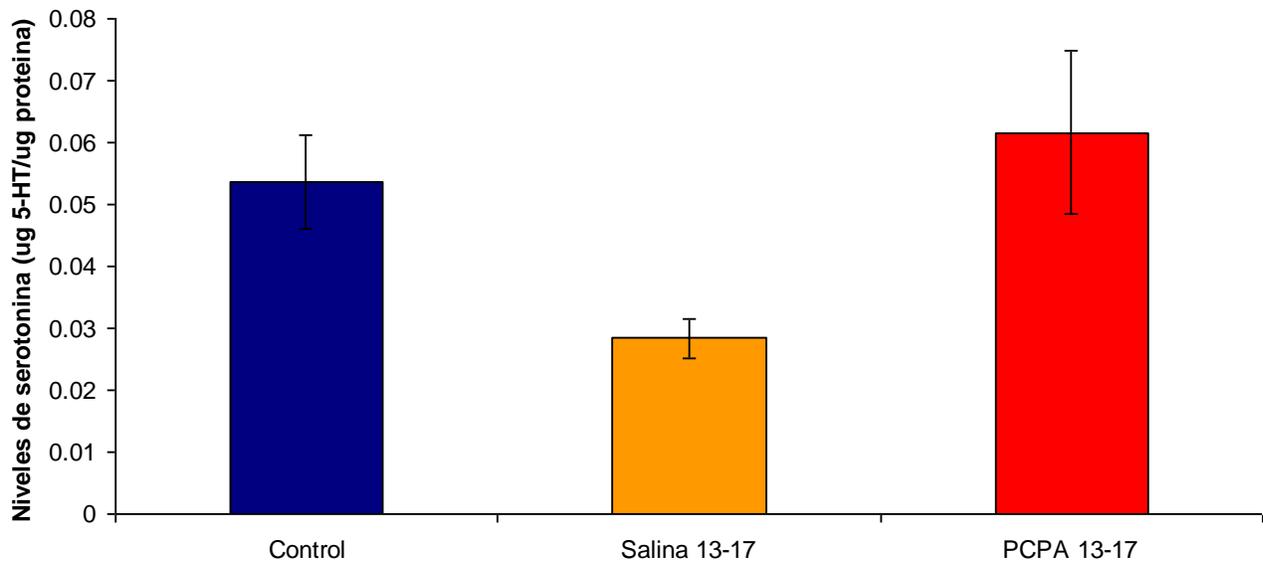


Ganancia de peso corporal durante la gestación. Promedio de ganancia de peso corporal en gramos +/- la error estándar; los grupos a los que se le administro el tratamiento entre los días de gestación 8-12, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prueba de ANOVA mixto.

Anexo II

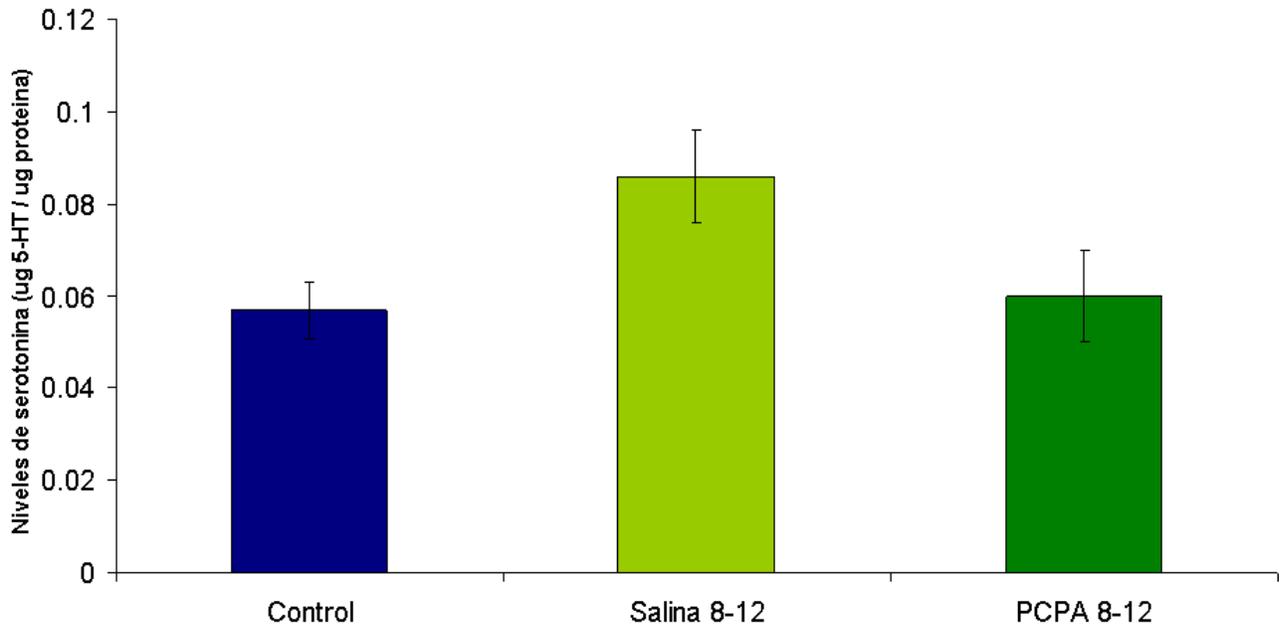


Nivel de serotonina cerebral. Se muestra que la inhibición de la síntesis de serotonina durante los días de gestación 8-12 no tiene efecto en la cantidad de serotonina en tallo en el día P0 en ninguna de las condiciones. Los resultados se muestran en media +/- el error estándar (ANOVA de una vía, post hoc Tukey).

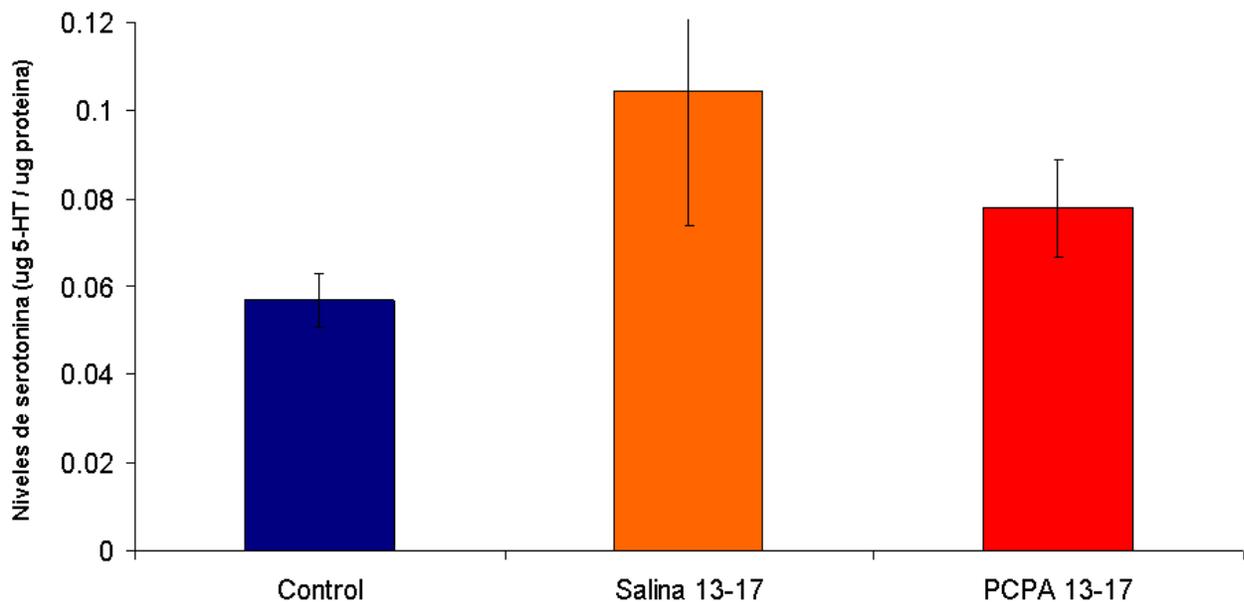


Nivel de serotonina cerebral. Se muestra que la inhibición de la síntesis de serotonina durante los días de gestación 13-17 no tiene efecto en la cantidad de serotonina en tallo en el día P0 en ninguna de las condiciones. Los resultados se muestran en media +/- el error estándar (ANOVA de una vía, post hoc Tukey).

Anexo III



Nivel de serotonina en tallo cerebral. Se muestra que la inhibición de la síntesis de serotonina durante los días de gestación 8-12 no tiene efecto en la cantidad de serotonina en tallo en el día P40 en ninguna de las condiciones. Los resultados se muestran en media +/- el error estándar (ANOVA de una vía, post hoc Tukey).



Nivel de serotonina en tallo cerebral. Se muestra que la inhibición de la síntesis de serotonina durante los días de gestación 13-17 no tiene efecto en la cantidad de serotonina en tallo en el día P40 en ninguna de las condiciones. Los resultados se muestran en media +/- el error estándar (ANOVA de una vía, post hoc Tukey).

Tabla Anexa I.

Prueba conductual campo abierto. Se muestran los resultados de la prueba en cada uno de los parámetros evaluados, no se encontraron cambios estadísticamente significativos. Se muestra la media +/- el error estándar. (ANOVA de una vía, post hoc Tukey).

Grupo	n	Inmovilidad	Congelamiento	Acicalamiento	Distancia recorrida	Tiempo en la periferia	Tiempo en el centro	Rascado	Levantarse en 2 patas	Defecar
Control	4	86.17 +/- 17.06	2.36 +/- 0.84	31.9 +/- 5.67	186.25 +/- 5.12	293.21 +/- 1.72	0.64 +/- 0.30	0.5 +/- 0.22	26.75 +/- 6.47	1.5 +/- 0.67
Salina 8-12	4	78.96 +/- 2.62	12.95 +/- 6.49	13.79 +/- 9.018	183.75 +/- 36.02	293.95 +/- 4.29	1.63 +/- 1.14	0.16 +/- 0.16	34.25 +/- 7.04	1.16 +/- 0.80
PCPA 8-12	4	57.06 +/- 16.98	0.97 +/- 0.61	43.34 +/- 5.23	179.75 +/- 32.90	297.30 +/- 1.67	2.40 +/- 1.62	0.16 +/- 0.16	28.75 +/- 4.40	2.83 +/- 0.60
Salina 13-17	4	92.07 +/- 5.98	0.56 +/- 0.56	21.58 +/- 3.19	174 +/- 24.05	294.65 +/- 1.33	4.82 +/- 1.17	0 +/- 0	27.66 +/- 3.45	2.33 +/- 0.91
PCPA 13-17	3	104.23 +/- 31.34	0.69 +/- 0.69	34.54 +/- 11.46	154.66 +/- 35.04	290.41 +/- 3.57	9.41 +/- 3.52	0 +/- 0	18.33 +/- 4.91	4.33 +/- 1.20

REFERENCIAS

- Azmitia E.C., Dolan K., Whitaker-Azmitia P.M. (1990). S-100a but not NGF, EGF, insulin or calmodulin is a CNS serotonergic growth factor. *Brain Research*, 516 (2), 354-356.
- Azmitia E. C. (2001). Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin* 56 (5) 413–424
- Azmitia E.C., Dolan, K., Whitaker-Azmitia, P. M.(1990). S-100b but not NGF, EGF, insulin or calmodulin functions as a CNS serotonergic growth factor. *Brain Research*, 516:354–356.
- Azmitia E. C., Whitaker-Azmitia, P. M.; Kheck, N.; Gannon, P.(1996). The cellular localization of the 5-HT1A receptor in primate cortex, hippocampus and brainstem neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology* 14:35–46.
- Altman J. & Bayer. (1995) Atlas of prenatal rat brain development. *CRC press*
- Aitken A. & Tork I. (1988). Early Development of Serotonin- containing neurons and pathways as seen in whole mount preparations of the fetal rat brain. *The journal of comparative neurology* 274:32-47.
- Barr G.A., Gibbons, J.L. and Bridger, W.H. (1976). Neuropharmacological regulation of mouse killing by rats. *Behavioral Biology*, 17: 143-159.
- Bahumann M., Ayestas M.A., Rothman R.B. (1998). Functional consequences of central serotonin depletion produced by repeated fenfluramine administration in rats. *The Journal in Neuroscience*, 18: 9069-9077.
- Banerjee U., (1974). Modification of isolation-induced abnormal behavior in male Wistar rats by destructive manipulation of the central monoaminergic Systems. *Behavioral Biology*, 11: 573–579.
- Barnes N., Sharp, T.(1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083–1152.
- Bethea T.C. & Sikich L. (2008). Early pharmacological treatment of autism: a rationale for developmental treatment. *Biological Psychiatry*. 521-37.
- Biggio G., Fadda F., Fanni P., Tagliamonte A., Gessa G.L. (1974). Rapid depletion of serum tryptophan, brain tryptophan, serotonin and 5-hydroxyindolaceti acid a tryptophan-free diet. *Life Sciences*, 14: 1321-29.
- Bonnin A., Torii M., Wang L., Rakic P., Levitt P. (2007) Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. *Nature Neurociencia*, 588-597.
- Breese G.R., Cooper, B.R., Grant, L.D. and Smith, R.D. (1974). Biochemical and behavioural alterations following 5,6-dihydroxytryptamine administration into brain". *Neuropharmacology*, 13: 177-187.

- Broccoli V, Simeone A., Brodski C., Wurst W., Acampora D., Sillaber I., Signore M., Weisenhorn DM., Oesterheld M. (2003). Location and size of dopaminergic and serotonergic cell populations are controlled by the position of the midbrain-hindbrain organizer. *The Journal of Neuroscience*, 23: 4199-4207.
- Copenhaver J., Schalock R., Carver M.,(1977). Para-Chloro-D,L-phenylalanine induced filicidal in the female rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 263-270.
- Daubert E., Condrón B.C., (2010). Serotonin: A regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends in Neurosciences*, 424-34.
- Dahlstrom A., Fuxe, K., 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20, 398–399.
- Eichelman B. and Thoa, N.B., (1973). The aggressive monoamines. *Biology Psychiatry* 6:143-164.
- Erickson J.T., Shafer G., Rossetti M.D., Wilson C.G., Deneris E. (2007). Arrest of 5HT neuron differentiation delays respiratory maturation and impairs neonatal homeostatic responses to environmental challenges. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 159:85–101.
- Erspamer V, M. Vialli. (1937). Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Boll d Soc Med-chir Pavia*, 51: 357–363.
- Eisenstein N., Iorio L., Clody D. (1982) "Role of serotonin in the blockade of muricidal behavior by tricyclic antidepressants. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 17 (4), 847–849.
- Filip, M., Bader, M. (2009). Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacological Reports* 81: 761-777.
- Flores –Cruz MG., Escobar A. (2012). Reduction of serotonergic neurons in the dorsal raphe due to chronic prenatal administration of a tryptophan free diet. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 30 (2): 63-67.
- Frazer A & Hensler J. (1999). Serotonin in basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects" (6th ed.) *Lippincott-Raven Publishers*.
- Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Reviews Neuroscience*. Dec; 4(12):1002-12.
- Gibbons J.L., Barr G.A., Bridger W.H., Leibowitz S.F. (1978). Effects of parachlorophenylalanine and 5-hydroxytryptophan on mouse killing behaviour in killer rats. *Pharmaceutical. Biochemistry and Behavior*, 9:91-98.
- Gibbons J.L., Barr G.A., Bridger W.H., Leibowitz S.F. (1979) "Manipulations of dietary tryptophan: effects on mouse killing and brain serotonin in the rat, *Brain Reserch*. 169: 139-153.
- Hannon J., Hoyer D.(2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioral Brain Research* 195: 198–213.

- Harding A., Paxinos G., Hillidat G. (2004). The serotonin and tachykinin Systems. *The rat nervous system, Third Edition*. San Diego CA. USA, 1205-1214.
- Hayes D., Greenshaw A. (2011). 5-HT receptors and reward-related behavior: A review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35: 1419–1449.
- Hornung J-P. (2003). The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26: 331-43.
- Hynes M., Ye W., Wang K., Stone D., Murone M., Sauvage F., Rosenthal, A. (2000). The seven-transmembrane receptor smoothed cell-autonomously induces multiple ventral cell types. *Nature Neuroscience*. 3, 41–46.
- Jason J., Ernest J. (2011). Peripheral Targets of 5-HT_{1D} Receptor Immunoreactive Trigeminal Ganglion Neurons, *Headache*; 51:744-751.
- Jha S., Rajendran R., Davda J., Vaidya A. (2006). Selective serotonin depletion does not regulate hippocampal neurogenesis in the adult rat brain: Differential effects of p-chlorophenylalanine and 5,7- di hidroxitriptamine. *Brain Research*, 1075: 48-59.
- Kandel E., Schwartz J., Jessell. (2000). Neurotransmitters. *Principles of Neural Science*. Mc. Graw Hill.
- Kerlinger L. & Lee. (2002). Investigación del comportamiento. Metodos de investigación en ciencias sociales. Cuarta edicion. *Mc. Graw Hill*.
- Kiyasova, V & Gaspar, P. (2011). Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance *European Journal of Neuroscience*. 34, 1553–1562.
- Kohler C., Lorens S. A., (1977). Open field activity and avoidance behavior following serotonin depletion: a comparison of the effects of parachlorophenylalanine and electrolytic midbrain lesions. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 8: 223-233.
- Kofman O. (2012). The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 26: 457-470.
- Kot M., Pilca A., Władysława A. (2012). Simultaneous alterations of brain and plasma serotonin concentrations and liver cytochrome P450 in rats fed on a tryptophan-free diet” *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 8: 223-233.
- Lauder J.M, Wallace KA, Krebs H.,(1981). Roles of serotonin in neuroembryogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 133:477–506.
- Lauder J., Wallace A., Krebs H., Petrusz P., McCarthy K.,(1982). In vivo and in Vitro development of serotonergic neurons. *Brain Research Bulletin*, 9: 605-25.
- Lauder J., Towle A.C., Patrick K., Henderson P., Krebs H., (1985). Decreased serotonin content of embriónic raphe neurons following maternal administration of p-chloropenylalanine:A quantitative immuncytochemical study. *Developmental Brain Research*. 20: 107-14.

- Lauder J.,(1990). Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. The neuropharmacology of serotonin. *Annals of the N.Y Academy of sciences*.
- Lidov H. & Molliver. (1982). Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Bain Research Bulletin*, 1959-604.
- Leopoldo M. Lacivita E, Berardi F, Perrone R, Hedlund PB. (2011). Serotonin 5-HT7 receptor agents: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. *Pharmacology & Therapeutics*; 129: 120–148.
- Lowry C., Evans A., Gasser P.,Hale M., Staub D.,Shekhar A. (2008). Topographic organization and chemoarchitecture of the dorsal raphe nucleus and the median raphe nucleus. *Serotonin and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects* . 25-67
- Lucca A., Lucini V., Piatini E., Ronchi P., Smeraldi E. (1992). Plasma tryptophan levels and plasma tryptophan/ neutral amino acids ratio in patients with mood disorder, Patients with Obsessive-Compulsive Disorder, and Normal Subjects. *Psychiatry Research*, 44:85-91.
- Mazer C., Muneyyirci J., Taheny K., Raio N., Borella A., Whitaker-Azmitia P. (1997). Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopment disorders whit cognitive deficits". *Brain Research* 760: 68-73.
- Miyazaki K., Narita N., Narita M.(2005). Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism" *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23, 287–297
- Nakajima K. Matsuyama K, Mori S. (1998). Prenatal administration of Para-chlorophenilalanine results in suppression of serotonergic system and disturbance of swimming movements in newborn rats. *Neuroscience Research* 31: 155-160.
- Pattyn A., Vallstedt A., Dias J.M., Samad O.A., Krumlauf R., Rijli F.M., Brunet,J.F. & Ericson J., (2003). Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors. *Genes Development.*, 6, 729–737.
- Paxinos G. & Atrens. (1977). D.M., 5,7-Dihydroxytryptamine lesions: effects on body weight, irritability, and muricide, *Aggressive. Behavior* 3, 107-118.
- Paxinos G.,& Watson C. (1978). The rat brain in stereotaxic coordinates. Sn. Diego Academic Press, 4ta edition.
- Peters D., (1982). Prenatal stress: Effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. *Pharmacology, Biochemistry and behavior* 17:721-725.
- Peters D., (1990). Maternal stress increase fetal brain and neonatal cerebral cortex 5-hydroxitriptamine synthesis in rats: a possible mechanism by which stress influences brain development. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 35: 943-947.
- Pucilowski O., Wojciech. 1983).Aggressive behaviour and the central serotonergic systems. *Behavioural Brain Research*, 9 (1) 33-48.

- Rice & Barone S Jr. I. (2000). Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models". *Environmental Health Perspectives*, 511-33.
- Rubenstein J. (1998) Development of serotonergic neurons and their projections" *Biological Psychiatry*, 44 (3): 145–150.
- Savitz J., Lucki I., Drevets WC. (2009). 5-HT1A receptors function in major depressive disorder. *Progress in Neurobiology* 88: 17–31.
- Siegel G., Albers R., Brady S., rice D. (2006). Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects 6th Edition. *Academic Press*.
- Tang J-P & Melethil S. (1995). Effect of aging on the kinetics of blood-brain barrier uptake of tryptophan in rats. *Pharmaceutical Research*, 12 (7).
- Vataeva L. Kudrin S., Vershinina E., Mosin M., Tiul'kova I., Otellin, A., (2008). Maternal para-chlorophenylalanine exposure modifies central monoamines and behaviors in the adult offspring. *Brain Research*, 1234: 1-7.
- Vataeva L., Khozhaï, L., Makukhina G., Otellin A. (2007). Behavioral alteration in the adult rats prenatally exposed to para-chloro phenylalanine. *Brain Research*, 1169: 9-16.
- Vergnes M., Mack, G. and Kempf, E.,(1973). Lesions du raphe et reaction d'agression interspecifique rat-souris. Effets comportemantanx et biochimiques. *Brain Reserch*, 57, 7-74.
- Vitalis T., Cases, O., Callebert, J., Launay, J. M., Price, D. J., Seif, I., and Gaspar, P.,(1998). Effects of monoamine oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex: Determination of a sensitive developmental period. *Journal of Comparative Neurology*. 393, 169–184.
- Vitalis T., Cases O., Passemard S., Callebert J., Parnavelas J. (2007). Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *European Journal of Neuroscience* 26 (2) 331-344.
- Wallace J. & Lauder. J. (1983). Development of serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Research Bulletin* 10: 459-79.
- Whitaker-Azmitia PM. (2001). Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Res Bull* 56:479–485.
- Whitaker-Azmitia PM, Druse M, Walker P, Lauder JM., (1996). Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res* 73:19–29.
- Yan W., Wilson C., Haring H. (1997). Effects of neonatal serotonin depletion on the development of rat dentate granule cells. *Developmental Brain Research*, 98 (2) 177-184.