

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**EFFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL Y POSTNATAL EN
EL DESARROLLO DEL SISTEMA SEROTONÉRGICO
EN RATAS Y SUS REPERCUSIONES EN MIGRACIÓN
NEURONAL**

TESIS, QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA, PRESENTA:

MARÍA GUADALUPE FLORES CRUZ

Director de tesis: DR. ALFONSO ESCOBAR IZQUIERDO

Sinodal revisor: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES

Sinodales: DR. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO

DR. FELIPE CRUZ PÉREZ

DRA. IRMA YOLANDA DEL RÍO PORTILLA

MARZO DE 2006.



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.

A la Dirección General del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo al presente proyecto, mismo que forma parte del proyecto "Migración neuronal anormal, disgénesis cerebral y estrés en un modelo experimental en rata", IN220102-3, a cargo del Dr. Alfonso Escobar Izquierdo.

Al Dr. Alfonso Escobar Izquierdo, por su orientación y ejemplo.

A los sinodales Dr. Fructuoso Ayala Guerrero, Dr. Felipe Cruz Pérez, Dra. Carolina Escobar Briones, Dra. Irma Yolanda del Río Portilla, por sus comentarios e interés en el presente trabajo.

A la Lic. Beatriz Gómez González, por compartir su entusiasmo por la investigación.

A mis padres, María Guadalupe Cruz y Benito Flores

A mis hermanos, Mariana y José Miguel

A mis amigos

TABLA DE CONTENIDO.

RESUMEN	1
5-Hidroxitriptamina en el Sistema Nervioso Central (SNC)	2
Neuroanatomía del sistema 5-HT	5
Ontogenia del sistema 5-HT	8
Serotonina y plasticidad	11
Efecto trófico de la 5-HT durante la vida adulta	11
Funciones tróficas de la 5-HT durante la ontogenia del SNC	13
Desarrollo del Sistema Nervioso Central	16
Neurobiología del estrés	18
Efectos del estrés en el sistema nervioso	21
Consecuencias del estrés prenatal	21
Consecuencias del estrés postnatal	22
Sistema serotoninérgico y eje HPA	24
Estrés y aprendizaje espacial	26
Estrés y trastorno depresivo	26
Propósito del estudio	28
Hipótesis	29
MÉTODO	30
Sujetos	30
Aparatos	30
Procedimiento	31
Estrés crónico prenatal. Nado forzado	31
Estrés crónico postnatal. Privación materna	32
Estrés prenatal y postnatal	32
Dieta deficiente en triptófano	32
Grupo control	33
Registro de peso corporal y día de apertura de párpados	33
Técnicas histológicas	33
Inmunocitoquímica para hidroxilasa de triptófano	34
Tinción de Nissl	34

Tinción de Golgi	35
Microfotografías	35
Cuantificación celular	35
Reconstrucción de estructuras	36
Evaluaciones conductuales	36
Preferencia entre dos botellas	36
Laberinto de Barnes	37
RESULTADOS	38
Peso corporal	38
Día de apertura de párpados	39
Preferencia entre botellas	39
Laberinto de Barnes	40
Cuantificación de neuronas ectópicas	42
Morfología del sistema serotoninérgico	45
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	55
Apéndice	56
REFERENCIAS	57

RESUMEN.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar los efectos del estrés crónico durante las primeras semanas de vida sobre la morfología de los núcleos serotoninérgicos y sus consecuencias en la migración neuronal, la solución de una tarea de aprendizaje espacial en el laberinto de Barnes y el consumo de solución azucarada. Se emplearon 9 ratas Wistar gestantes y sus camadas, las primeras se asignaron a alguna de las condiciones: *i.* estrés prenatal, 20 minutos diarios de nado forzado del día 10 al 20 de vida embrionaria, *ii.* dieta deficiente en triptófano, durante gestación y lactancia y *iii.* control; la mitad de las crías en las condiciones de estrés prenatal y control se sometieron a 180 minutos diarios de separación materna del día postnatal 1 al 21 para obtener los grupos estrés postnatal y estrés prenatal-postnatal. La deficiencia en triptófano provocó bajo peso corporal después de P10 y retardó la apertura de los párpados. Se observaron alteraciones en la morfología de los núcleos serotoninérgicos debida al estrés prenatal y desarreglos citoarquitectónicos en la neocorteza e hipocampo de los grupos estrés prenatal, deficiente en triptófano y estrés prenatal-postnatal.

No hubo diferencia en el porcentaje de preferencia para la solución de sacarosa al 5% entre condiciones. La adquisición del criterio de aprendizaje en el laberinto se retrasó con respecto al control en todas las condiciones experimentales.

Se concluyó que durante la ontogenia, el sistema serotoninérgico es vulnerable al estrés crónico, y su alteración repercute negativamente en la morfología y funcionalidad del sistema serotoninérgico.

5-Hidroxitriptamina en el Sistema Nervioso Central (SNC).

La 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) es una molécula formada por un anillo indol y una cadena carboxilo-amino terminal; por esta razón se le clasifica como indolamina (Harding *et al.*, 2004). En el SNC, se le considera un neurotransmisor al cubrir los siguientes criterios: *i.* se sintetiza en la neurona, *ii.* está presente en la terminal presináptica, *iii.* al liberarse en un mecanismo dependiente de Ca^{++} ejerce una acción definida en la postsinápsis, *iv.* la administración del homólogo sintético reproduce los efectos del transmisor liberado de forma endógena y *v.* posee un mecanismo para eliminarlo de la hendidura sináptica y para degradarlo (Schwartz, 2000).

A mediados del siglo XIX, el suero resultante de la coagulación sanguínea se llamó *vasotonina* gracias a su efecto vasoconstrictor. En 1948, Rapport y cols. aislaron a la *vasotonina* en un complejo cristalino que llamaron *serotonina* (Douglas, 1982; Frazer & Hensler, 1999). En 1951 Hamlin y Fischer al preparar 5-HT sintética observaron en el compuesto obtenido las mismas propiedades vasoconstrictoras que la serotonina derivada de la coagulación sanguínea (Douglas, 1982).

En el sistema gastrointestinal el factor estimulante de la motilidad intestinal o *enteramina*, aislada por Ersparmer y cols. a principios del siglo pasado, fue identificada en 1952 como 5-HT (Douglas, 1982; Brownstein, Año). Mas tarde se establecería que la serotonina encontrada en las plaquetas de la sangre, es tomada del intestino, en donde las células cromafines la sintetizan (Gaspar *et al.*, 2003).

En el sistema nervioso central, la serotonina se identificó en 1953 por Twarog y Page (Harding *et al.*, 2004) pero fue la técnica de fluorescencia

inducida por formaldehído desarrollada por Falck e Hilarp la que permitió a Dahlström y Fuxe en 1964 mostrar estructuras conteniendo la indoleamina (Dahlström & Fuxe, 1964; Harding *et al.*, 2004).

La serotonina se sintetiza a partir del aminoácido esencial triptófano, el cuál en mamíferos no se produce endógenamente, por lo que se obtiene de la dieta (Frazer & Hensler, 1999). En el organismo, el triptófano circula en la sangre en dos formas, unido a albúmina o libre (el cuál corresponde del 10 al 20% del total en condiciones normales). Los niveles de triptófano libre o unido a albúmina dependen de tres factores: *i.* la tasa de lipólisis, los ácidos grasos no esterificados desplazan al triptófano de su unión con la albúmina incrementando el nivel de triptófano libre; *ii.* la tasa de actividad de la enzima hepática pirrolasa de triptófano, considerada el paso limitante en la degradación del triptófano a través de la vía de la quinurenina, la activación de la enzima decrementa los niveles de triptófano circulante mientras que la inhibición de la misma enzima los incrementa, *iii.* la tasa de captura del triptófano en tejido central o periférico (Chaouloff, 1993).

El triptófano requiere de un transportador para ingresar al SNC, ya que la barrera hematoencefálica impide su entrada. Este transportador denominado transportador L es saturable y estereoespecífico, y junto con el triptófano ingresa a otros aminoácidos neutros como fenilalanina, tirosina, valina y leucina (Chaouloff, 1993). En condiciones normales, la concentración de triptófano en el cerebro humano adulto es de 30 μM (Salín-Pascual, 2003).

La síntesis de serotonina comienza con la hidroxilación del triptófano por la enzima L-triptófano-5-monooxigenasa, o triptófano hidroxilasa. Como resultado de la hidroxilación el triptófano se convierte en 5-hidroxitriptófano

(5-HTP); la enzima decarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos transforma al 5-HTP en 5-hidroxitriptamina (Frazer & Hensler, 1999).

La enzima triptófano hidroxilasa está presente únicamente en las células que sintetizan 5-HT; su actividad es considerada el paso limitante en la síntesis del neurotransmisor (Chaouloff, 1993; Frazer & Hensler, 1999). Normalmente esta enzima no está saturada, por lo que el incremento en la disponibilidad del triptófano tiene como consecuencia incremento en la síntesis de 5-HT. Otra condición notoria es que la actividad de la enzima es dependiente de la estimulación eléctrica en el soma de la neurona serotoninérgica, es decir la síntesis de serotonina es dependiente de la frecuencia de estimulación en la neurona (Chaouloff, 1993; Frezer & Hensler, 1999).

Una vez sintetizada, la serotonina se incluye en las vesículas sinápticas mediante un mecanismo de transporte activo dependiente de un gradiente de H^+ . Una ATPasa de protones en la vesícula sináptica es responsable de generar dicho gradiente mientras que un transportador vesicular de membrana introduce a la serotonina a la vesícula al mismo tiempo que da paso a una corriente de salida de H^+ (Frezer & Hensler, 1999).

La liberación del neurotransmisor en la sinapsis es por exocitosis dependiente de Ca^{++} (Frezer & Hensler, 1999; Salín-Pascual, 2003) y la recaptura de la serotonina es ejecutada por un transportador específico de 5-HT. El mecanismo de recaptura es saturable y de alta afinidad para la serotonina, además de tratarse de un proceso dependiente de temperatura y de la concentración de Na^+ y Cl^- (Frezer & Hensler, 1999).

La serotonina en el SNC es degradada por monoaminoxidasas (MAO) una vez que el neurotransmisor se recapta por la neurona serotoninérgica; la

MAO convierte a la 5-HT en 5-hidroxiindolacetaldehído, y este a su vez es oxidado por la enzima aldehído deshidrogenasa dependiente de nicotinamida adenin dinucleótido (NAD) para obtener ácido 5-hidroxiindoleacético, que es el principal metabolito de la serotonina. El 5-hidroxiindolacetaldehído intermedio puede ser reducido por una reductasa de aldehídos dependiente de nicotinamida adenin dinucleótido reducido (NADH) y obtener alcohol 5-hidroxitriptanol (Frazer & Hensler, 1999). Otra ruta de degradación es mediada por la sulfotransferasa de serotonina, que transforma a la 5-HT en serotonina-O-sulfato, que se excreta por la vía renal (Brownstein, 1981).

La serotonina ejerce su acción a través de receptores de membrana, la mayoría de ellos metabotrópicos, acoplados a una proteína G. Estos receptores pueden agruparse en 7 familias: 5-HT₁ (1A, 1B, 1D, 1E y 1F), 5-HT₂ (2A, 2B, y 2C), 5-HT₄ (4A y 4B), 5-HT₅ (5A y 5B), 5-HT₆ y 5-HT₇, mientras que los receptores 5-HT₃ (3A y 3B) son del tipo canal iónico (Frazer & Hensler, 1999; Luo *et al.*, 2003).

Neuroanatomía del sistema 5-HT.

Los somas de las neuronas que sintetizan 5-HT en el SNC están en nueve núcleos en el tallo cerebral, llamados complejo B1-B9 según la clasificación establecida por Dahlstrom y Fuxe tanto para roedores como para el hombre (Dahlström & Fuxe, 1964). Una pequeña población de neuronas serotoninérgicas se encuentra en el núcleo hipotalámico dorsomedial, y en la capa glomerular en el bulbo olfatorio (Jacobs & Azmitia, 1992; Frazer & Hensler, 1999).

Por su ubicación en el tallo cerebral, los núcleos se dividen en dos grupos: caudal, que contiene de B1 a B4 y rostral, de B5 a B9 (Jacobs & Azmitia, 1992). El grupo B1 anatómicamente corresponde al núcleo del rafe pálido y a la porción caudal ventrolateral del bulbo raquídeo, B2 al núcleo del rafe obscurus, B3 al núcleo del rafe magno, a la porción rostral ventrolateral del bulbo raquídeo y al núcleo reticular paragigantocelular; B4 a la porción dorsolateral del núcleo del rafe obscurus, B5 a la porción caudal del rafe mediano, B6 a la porción caudal del rafe dorsal, B7 a la porción rostral del núcleo dorsal del rafe, B8 a la porción rostral del núcleo del rafe mediano, al núcleo caudal lineal y al núcleo pontis oralis; B9 corresponde a la región supralemniscal del núcleo pontis oralis (Jacobs & Azmitia, 1992; Frazer & Hensler, 1999).

De los grupos caudales, las vías eferentes principales que proyectan a la médula espinal son tres: de B4 a la lámina I y II del asta dorsal, de B2 y B4 a la lámina IX del asta ventral y de B3 a la columna intermediolateral (Jacobs & Azmitia, 1992; Frazer & Hensler, 1999). Los grupos rostrales poseen vías ascendentes hacia el prosencéfalo, la vía periventricular dorsal y la radiación ventral tegmental; ambas vías convergen en el hipotálamo caudal donde se unen al haz prosencefálico medial. Los grupos B6 y B7 innervan al estriado y neocorteza; el núcleo del rafe medio, de los grupos B5 y B8, envía proyecciones al hipocampo, septum e hipotálamo, y al igual que en los grupos B6 y B7 a la neocorteza (Frezer & Hensler, 1999).

Las aferencias a los núcleos serotoninérgicos son las siguientes: innervación proveniente de la médula espinal a los núcleos del rafe magno (B3) y pálido (B1) a través del fascículo ventrolateral; desde el área sensoriomotora

en la neocorteza a B3 y en menor medida a B1, B8 y B5 (Brodal *et al.*, 1960). Las aferencias del tallo cerebral provienen de la sustancia nigra y el área tegmental ventral, el núcleo vestibular superior, el locus coeruleus, el núcleo prepósito del hipoglosa y el núcleo del tracto solitario (Frazer & Hensler, 1999).

Existen también interconexiones entre los distintos núcleos serotoninérgicos, como aquellas entre el núcleo del rafé dorsal (B6 y B7), con B5, B8, B9, B1 y B3 (Frazer & Hensler, 1999).

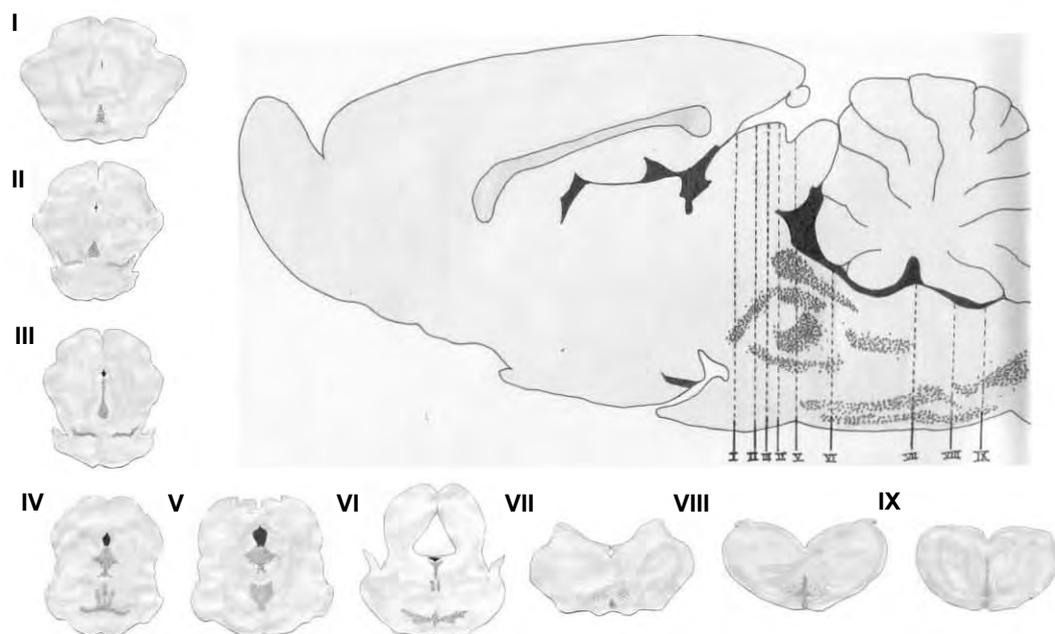


Figura 1. Caricatura dónde se ilustra la distribución de los núcleos serotoninérgicos en el tallo cerebral. Señalados con numeración romana se muestran cortes coronales de cerebro de rata adulta efectuados a distintas alturas en el tallo cerebral; la altura del corte se observa en el corte sagital. El corte sagital en el cerebro de rata permite una vista global de la distribución y morfología de los núcleos serotoninérgicos.

Ontogenia del sistema 5-HT.

La ontogenia del sistema serotoninérgico comienza en la sexta semana del desarrollo embrionario en los seres humanos (Azmitia, 2004), mientras que en la rata las primeras neuronas inmunoreactivas a serotonina se detectan en el día

embrionario 12 (E12) a lo largo del borde entre el metencéfalo y el mielencéfalo rostral, en la región externa de la zona ventricular, y situadas bilateralmente en la porción basal del tubo neural (Wallace & Lauder, 1983). Las neuronas serotoninérgicas están entre los primeros neuroblastos mesencefálicos en diferenciarse y los primeros en alcanzar la zona del manto (Jacobs & Azmitia, 1992).

Las neuronas inmunoreactivas a serotonina detectadas en E12 son las primeras del complejo B4 - B9 (Lidov & Molliver, 1982; Wallace & Lauder, 1983), lo que significa que los grupos rostrales tienen un origen anterior a los grupos caudales. El número de neuronas serotoninérgicas de este complejo se incrementa rápidamente a lo largo de los días E13 a E15, exhibiendo un pico de proliferación en E15 (Wallace & Lauder, 1983).

En E14 la mayoría de las células serotoninérgicas permanecen adyacentes a la zona ventricular, donde comienzan a agregarse en grupos; sin embargo una pequeña porción de estas neuronas migra en dirección ventro-lateral alejándose de la zona ventricular (Wallace & Lauder, 1983). Al mismo tiempo que estas neuronas rostrales migran, envían sus prolongaciones en dirección del prosencéfalo, y alcanzan también alcanzando en esta fecha la porción caudal del diencefalo (Lidov & Molliver, 1982; Wallace & Lauder, 1983).

En E14, son observables también las primeras células inmunoreactivas a 5-HT en posición más caudal a la flexura pontina; estas neuronas darán origen al complejo B1-B4 en el bulbo raquídeo (Wallace & Lauder, 1983).

A diferencia de los grupos rostrales, en donde las neuronas inmunoreactivas a serotonina son observadas en la línea media de la zona ventricular, las neuronas de los grupos caudales son observadas por primera vez

lejos de la zona ventricular, en la zona intermedia adyacente a la zona marginal; además de situarse ventro-lateralmente en la porción basal del tubo neural, es decir, no en la línea media (Wallace & Lauder, 1983); esto significa que las neuronas de los grupos caudales expresan el fenotipo de neurona serotoninérgica una vez que han migrado desde el sitio de origen en la zona ventricular, hasta ubicarse más cercanas a su posición final.

En E15, no se nota incremento en el número de neuronas inmunoreactivas a serotonina en los grupos caudales a diferencia de lo que sucede con los grupos rostrales; es hasta E17, en dónde además del grupo B3, que permanece desplazado hacia los lados de la línea media, pueden observarse nuevos grupos de neuronas inmunoreactivas a 5-HT en la porción caudal del bulbo raquídeo, a cada lado de la línea media, y que constituyen a los grupos B1 y B2 (Wallace & Lauder, 1983).

A finales de E15 y principios de E16, el haz de fibras 5-HT que se proyecta desde los grupos rostrales se divide en dos, un haz dorsal y otro ventral al nivel de la porción cóncava de la flexura mesencefálica; el haz dorsal se anexa al fascículo retroflejo mientras que el haz ventral forma parte del haz prosencefálico medial (Lidov & Molliver, 1982).

Las prolongaciones de los grupos rostrales son observadas en E16 en el borde entre el diencefalo y el telencefalo, y en E17 penetran en el polo frontal de la neocorteza (Lidov & Molliver, 1982; Wallace & Lauder, 1983). La tasa de crecimiento de las prolongaciones de las neuronas 5-HT de los grupos rostrales, es de 1-2 mm por día en ese periodo (Wallace & Lauder, 1983).

El grueso de la vía serotoninérgica que proviene de los grupos rostrales hacia el prosencefalo está formada en E19. También en ese momento, fibras

serotonérgicas del haz prosencefálico rostral abandonan esta vía y se ramifican; estas ramas se anexan a otros haces de fibras, como el fascículo retroflexo, el tracto mamilotegmental, la estría medullaris, la estría supracallosa y la cápsula externa (Lidov & Molliver, 1982). En el diencéfalo ventral, una rama que se origina del haz prosencefálico medial asciende hacia el hipotálamo lateral en donde inerva al núcleo paraventricular; mientras que en el telencéfalo, se observan axones 5-HT en la zona intermedia y en la zona marginal de la neocorteza frontal y temporal; la densidad de la inervación serotonérgica es mayor en la zona marginal (Lidov & Molliver, 1982; Janussonis *et al.* 2004). En E19 se observa también inervación 5-HT en la zona marginal del hipocampo (Lidov & Molliver, 1982).

En el día E21, se observa inervación serotonérgica en el núcleo geniculado lateral, el núcleo parafascicular y los núcleos de la línea media del tálamo bilateralmente; y además, axones 5-HT en la capa intermedia del cerebelo (Lidov & Molliver, 1982).

Postnatalmente, la formación de los campos terminales es el proceso central en la ontogenia del sistema serotonérgico. El telencéfalo, el tectum y el cerebelo son las principales estructuras a ser inervadas durante las siguientes tres semanas de vida. En el día 6 postnatal (P6), los axones 5-HT entran a la capa de células de Purkinje en el cerebelo; y en el telencéfalo, alcanzan la corteza parietal (Lidov & Molliver, 1982).

La neocorteza muestra inervación serotonérgica en todas sus capas en P10, mientras que en el hipocampo los axones serotonérgicos alcanzan todas las estratos y forman los campos terminales en P21 (Lidov & Molliver, 1982; Jacobs & Azmitia, 1992).

La elongación de los conos de crecimiento serotoninérgicos durante la ontogenia del sistema es dependiente de autoregulación negativa (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996; Whitaker-Azmitia, 2001). Los conos de crecimiento exhiben desde E15 serotonina vesiculada, además de transportadores para la misma (Igy-May *et al.*, 1994). Esto significa que aunque la sinaptogénesis del sistema comience días después ya están formados los componentes presinápticos.

Serotonina y plasticidad.

Efecto trófico de la 5-HT durante la vida adulta.

Hallazgos recientes permiten afirmar que la serotonina actúa como factor neurotrófico durante la vida adulta, tanto en el mantenimiento de las conexiones sinápticas como en la neurogénesis adulta (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1998).

El tratamiento con *para*-cloroanfetamina (PCA), antagonista del receptor 5-HT_{1A} en cultivos de formación hipocámpica de ratas adultas provocó decremento en la densidad sináptica en la capa molecular del giro dentado en comparación con cultivos control (Wilson *et al.*, 1998).

Las condiciones fisiopatológicas que disminuyen los niveles de serotonina y la expresión de receptores 5-HT_{1A} reducen la tasa de proliferación celular (Gould, 1999), esta evidencia permite afirmar que existe relación entre 5-HT y neurogénesis. Otro hallazgo que contribuyó a establecer la relación de la serotonina con la proliferación celular fue el incremento significativo en el número de células marcadas con bromodeoxiuridina (BrdU), un marcador de fragmentación del ADN, en el giro dentado y el hilio en la formación

hipocámpica de ratas que estuvieron sometidas a tratamiento crónico con antidepresivos, en este caso fluoxetina, un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (Malberg *et al.*, 2000).

Con el fin de determinar los efectos de la 5-HT sobre el número de nuevas neuronas granulares en el giro dentado, se administró a ratas jóvenes la neurotoxina 5,7-dihidroxitriptamina, que provoca degeneración de las neuronas 5-HT, y posteriormente se les aplicó una inyección intraperitoneal de BrdU. Al cabo de ocho días, se sacrificó a las ratas y el número de células marcadas con BrdU se comparó con el de las ratas control, se observó reducción del 35% en el número de células marcadas con BrdU en las ratas lesionadas (Brezun & Daszuta, 1999).

Para determinar la vía por la cuál la serotonina regula la neurogénesis se recurrió a la administración de antagonistas selectivos del receptor 5-HT_{1A}: p-MPPI (4-yodo-N-[2-(4-(metoxifenil)-1-piperazinil)etil]-N-2-piridinilbenzamida), NAN-190 (1-(2-metoxifenil)-4-[4-(2-talidomido)butil]piperazina hidrobromida) y WAY-100635 (N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]-1]etil)-N-(2-piridinil) ciclohexacarboxamida. Posterior a la administración del antagonista, se les inyectó BrdU y se sacrificó a los sujetos 2 horas después. El tratamiento con antagonistas al receptor 5-HT_{1A} redujo 30% la tasa de proliferación celular en el giro dentado comparado con ratas control. Los tres antagonistas al receptor 5-HT_{1A} produjeron una tasa semejante de proliferación, de lo que se concluye que el resultado no depende de un efecto particular de alguno de los antagonistas, sino su acción sobre el receptor 5-HT_{1A} (Radley & Jacobs, 2002).

Los receptores 5-HT_{1A} inhiben a la adenilato ciclasa, esta acción disminuye los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPc), que a su vez reducen la actividad de la proteína cinasa A (PKA), y con ello reducen la transcripción del elemento de respuesta asociado a AMPc (CREB, por sus siglas en inglés); por otra parte, estos receptores activan una corriente entrante de potasio, que hiperpolariza a la célula (Frazer & Hensler, 1999). Agonistas al receptor 5-HT_{1A} promueven el ensamblaje de tubulina en los microtúbulos lo que favorece tanto al ensamblaje del citoesqueleto durante la maduración de la célula, como el ensamblaje del huso mitótico en el soma, que a su vez promueve la división celular (Azmitia, 2001). Sin embargo, no está claro hasta el momento el mecanismo por medio del cuál la serotonina regula la proliferación celular.

Funciones tróficas de la 5-HT durante la ontogenia del SNC.

La diferenciación temprana de las neuronas serotoninérgicas en la ontogenia del sistema nervioso y la presencia de vesículas con neurotransmisor en los conos de crecimiento de las neuronas 5-HT evidenciadas un par de días después de su formación, llevaron a preguntarse cuál es la función que el sistema serotoninérgico desempeña durante el desarrollo del SNC (Whitaker-Azmitia, 1991; Igvy-May *et al.* 1994). La función neurotrófica de la serotonina durante la vida adulta, además de las ya mencionadas, permitieron hipotetizar que durante la ontogenia, ejerce acciones igualmente tróficas (Whitaker-Azmitia, 2001).

La primer acción considerada fue la modulación del desarrollo del sistema serotoninérgico a través del gradiente de concentración 5-HT (Konno *et al.*, 2004; Narita *et al.*, 2002).

En ratas gestantes, la administración de talidomida o ácido valpróico en E9 provocó hiperserotonemia sistémica e incremento en la concentración de 5-HT en el hipocampo de las crías en comparación con las ratas control, además de alteración en la distribución del núcleo del rafe dorsal, o B6-B7 e innervación escasa en todo el SNC (Konno *et al.*, 2004; Narita *et al.*, 2002).

La innervación 5-HT está regulada por gradientes de concentración del neurotransmisor; en el cono de crecimiento, las neuronas 5-HT poseen autoreceptores, que detectan los niveles de serotonina en la matriz extracelular. El nivel de serotonina actúa como una señal de quimio-atracción cuando la concentración es baja al indicar que es una zona sin innervación 5-HT previa mientras que una zona con alta concentración del neurotransmisor implica la presencia de innervación 5-HT en el área y el efecto es de quimio-repulsión (Whitaker-Azmitia, 2001).

Otro mecanismo de modulación es a través de la proteína astrocitaria S-100 β ; la serotonina incide en los receptores 5-HT_{1A} de astrocitos (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1993) para estimular la liberación de S-100 β (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1998). S-100 β es una proteína ácida que proviene de una familia de proteínas solubles en sulfato de amonio al 100%, y por ello nombradas S-100; solo el tipo beta tiene efectos benéficos durante el desarrollo del SNC (Ueda *et al.*, 1994; Whitaker-Azmitia, 2001; Nishiyama *et al.*, 2002; Van Eldik & Wainwright, 2003). Durante el desarrollo S-100 β promueve el crecimiento neurítico en neuronas 5-HT al inhibir la fosforilación de proteínas asociadas a microtúbulos, como Tau y la proteína asociada al microtúbulo 2 (Whitaker-Azmitia, 2001). S-100 β también inhibe la fosforilación de la

proteína asociada al crecimiento, GAP-43, lo que permite la elongación de los conos de crecimiento (Whitaker-Azmitia, 2001).

En co-cultivos celulares de hipocampo y neocorteza con neuronas 5-HT del núcleo del rafe dorsal de ratones recién nacidos mutantes con *Polidactilia Nagoya*, que, además presentan déficit de astrocitos positivos a S-100 β , se encontró que la innervación serotoninérgica a las estructuras blanco de ese núcleo, es decir hipocampo y neocorteza, presentaban reducción en la densidad de inervación en comparación con cultivos de cortezas y núcleo del rafe de ratones silvestres (Ueda *et al.*, 1994). Esto significa que durante el desarrollo del sistema 5-HT, además de la señal de autorregulación negativa que este sistema emplea en la elongación de los conos de crecimiento, la estimulación de los receptores 5-HT_{1A} de astrocitos promueve la liberación de S-100 β que asegura la extensión neurítica de las neuronas 5-HT y el mantenimiento de la inervación a las estructuras blanco.

Modular el desarrollo y maduración de las estructuras blanco del sistema serotoninérgico representa otra dimensión en la que la 5-HT regula la ontogenia del SNC (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996; Whitaker-Azmitia, 2001; Luo *et al.*, 2003; Janusonis *et al.*, 2004). Evidencia de ello es que durante la formación de los barriles que representan a cada vibrisa en la corteza somatosensorial de roedores, debe asegurarse el mantenimiento de un nivel adecuado de serotonina; si la inervación es deficiente, los barriles no se presentan (Luo *et al.*, 2003). Este fenómeno se considera regulado en parte por los receptores 5-HT_{1B} (Gaspar *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2003).

La administración crónica de 5-metoxitriptamina, un agonista inespecífico 5-HT, durante la gestación tuvo como consecuencia desarreglo

columnar en la capa subgranular de la corteza presubicular de roedores, evaluados postnatalmente. Estas alteraciones en la migración neuronal se adjudicaron al incremento en la actividad de los receptores serotoninérgicos en las células de Cajal-Retzius, que reciben inervación 5-HT desde el día E17 (Janušonis *et al.*, 2004). Estos hallazgos indican que durante la migración neuronal, el mantenimiento constante de los niveles de 5-HT en las estructuras laminadas contribuye con el adecuado arreglo citoarquitectónico.

Desarrollo del sistema nervioso central.

La formación de las estructuras cerebrales en la ontogenia del SNC cursa por tres eventos: *i.* formación de la placa neural, *ii.* neurulación o cierre del tubo neural y *iii.* generación de diversas regiones neuronales por medio de los procesos de proliferación y migración neuronal (Jessel & Sanes, 2001).

Durante la migración neuronal son cuatro, al menos, los requerimientos generales para que una célula en el sistema nervioso arribe a la posición correcta desde su sitio de nacimiento; estos son: *i.* una señal para comenzar a migrar, proporcionada por el medio *ii.* elementos adhesivos y contráctiles que permiten el movimiento de la célula coordinando adhesión fuerte en la vanguardia de la célula y una menor adhesión en la retaguardia, así como contracción en el citoesqueleto, *iii.* señales que determinen la dirección o el vector del movimiento y *iv.* señales de alto que "informan" cuando la célula alcanza su posición final (Ross & Walsh, 2001).

Uno de estos requerimientos, la señal de alto a las neuronas durante la migración, se satisface por medio de la proteína de matriz difusible *reelin*, que se secreta en las células de Cajal-Retzius (CR) (Marín-Padilla, 1998; Ceranik *et*

al. 1999; Janusonis *et al.*, 2004). Estas células pueden observarse en la zona marginal de la neocorteza e hipocampo, en el giro dentado, el stratum lacunosum moleculare y la capa molecular externa dentada durante la vida embrionaria y en los primeros meses de vida tanto en roedores como en el hombre (Ceranik *et al.*, 1999). Las células CR son neuronas multipolares con varias dendritas horizontales que se irradian desde el soma y poseen un axon con numerosas colaterales horizontales (Marín-Padilla, 1998).

La corteza cerebral se construye a partir de precursores neuronales que se originan en la zona subventricular del tubo neural; las primeras células migran de forma radial hacia la superficie externa del tubo neural formando así la primera capa cortical, conocida como preplaca, la cual al seguir albergando neuronas se divide horizontalmente lo que corresponde en su porción externa, a la zona marginal o capa I, y la otra porción basal, llamada subplaca (Super *et al.*, 1998). En el preplato las primeras neuronas diferenciadas que se observan son las células CR, y una vez que esta capa se divide, las células CR permanecen en su mayoría en la zona marginal (Ringstedt *et al.*, 1998). La formación del resto de las capas de la corteza se realiza siguiendo un patrón llamado de *dentro hacia afuera*, en el que las primeras neuronas generadas ocupan las capas más profundas y las de generación posterior migran por entre las primeras para ocupar las capas más superficiales (Kriegstein *et al.*, 2004).

Ese patrón de migración puede alterarse en varias formas, una de ellas es a través de la supresión de la señal de alto que proporciona la proteína *reelin* secretada por las células CR, esto tiene como consecuencia una corteza invertida, ya que las primeras neuronas generadas ocupan las posiciones más superficiales de la corteza, y las que se generan posteriormente localizadas en

las capas internas en secuencia de formación, como puede observarse en ratones mutantes que carecen de *reelin* conocidos como ratones *reeler* (Rakic & Verne, 1995; Polleux & Anton, 2005).

Neurobiología del estrés.

El término estrés se empleó originalmente en el campo de la ingeniería para describir cualquier fuerza que ejerce una presión física a una estructura; este mismo término se adoptó para describir en sistemas biológicos a la condición que perturba seriamente la homeostasis psicológica y fisiológica del organismo (Kim & Diamond, 2002), el estado de desequilibrio en el organismo y los mecanismos compensatorios que se generan (Gómez González, 2003).

Los mecanismos compensatorios comprenden acciones que van desde el nivel conductual, como reacciones de ataque o huida (*fight or flight*), al nivel de modificación en procesos fisiológicos, como la movilización de las reservas energéticas para su consumo inmediato (glucosa, aminoácidos y ácidos grasos libres) y la suspensión de procesos vegetativos y reproductivos (Mc Ewen, 2000); esto es, incrementan el catabolismo y suprimen el anabolismo (Kofman, 2002).

Los sistemas fisiológicos encargados de proporcionar la respuesta al estrés incluyen al eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (eje HPA) y al sistema nervioso autónomo (De Kloet *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2001; Mc Ewen, 2000).

En la regulación que ejerce el eje HPA, la presencia de un estresor, percibido interna o externamente, se comunica al hipotálamo vía estímulos viscerales o somatosensoriales desde núcleos noradrenérgicos en el tallo

cerebral, el área tegmental ventral, el núcleo del tracto solitario y del locus coeruleus; y vía estímulos límbicos, desde el lecho nuclear de la estría terminal, el hipocampo rostral, el núcleo central de la amígdala y la corteza prefrontal (Ladd *et al.*, 2000; Herman & Cullinan, 1997). Al llegar al hipotálamo, la estimulación incide en la región parvocelular del núcleo paraventricular (PVN). Este núcleo secreta hormona liberadora de corticotropina (HLC) y vasopresina en el sistema porta hipofisiario para activar la síntesis de pro-opiomelanocortina en la hipófisis anterior, desde donde se procesa a corticotropina u hormona adenocorticotrófica (ACTH) (De Kloet *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2001; Ladd *et al.*, 2000). La ACTH secretada por la hipófisis viaja en el torrente sanguíneo e incide en la corteza de las glándulas suprarrenales, en donde estimula la secreción de cortisol (en humanos) y corticosterona, CORT (en humanos y roedores) (De Kloet *et al.*, 2005).

Los CORT ejecutan una amplia gama de acciones, como la supresión de la síntesis de prostaglandinas, la estimulación de la gluconeogénesis y la modulación de la respuesta inmune, además de proveer retroalimentación negativa en la producción de hormonas en el hipotálamo e hipófisis (Bakker *et al.*, 2001). Los efectos de CORT ocurren a través de dos tipos de receptores: tipo I o receptores a mineralocorticoides y tipo II o receptores a glucocorticoides (De Kloet *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2001; Mc Ewen, 2000).

Otro componente de la respuesta al estrés corresponde a la división autónoma del sistema nervioso, en particular la activación del sistema nervioso simpático, e implica la descarga rápida de noradrenalina a lo largo de las sinapsis noradrenérgicas del sistema simpático, y la secreción de adrenalina al torrente sanguíneo desde la médula de las glándulas suprarrenales (de Kloet *et*

al., 2005). Este conjunto de acciones tiene como objetivo movilizar reservas energéticas, activando la glicólisis por un mecanismo de regulación covalente (Mc Ewen, 2000).

Una vez que el evento estresor concluye, es necesario detener la respuesta y para esto se emplean los receptores tipo II. Una vez que la corteza de las glándulas suprarrenales liberó glucocorticoides a la circulación, estos atraviesan la barrera hematoencefálica, incidiendo en receptores en el hipocampo y otras regiones (Kim & Diamond, 2002).

Si la respuesta al estrés es inadecuada o excesiva y prolongada, el costo energético para regresar a la homeostasis es tan elevado que genera un déficit, conocido como carga alostática (de Kloet *et al.*, 2005), que en condiciones extremas puede significar la muerte del organismo por agotamiento, tal como lo describe Hans Selye en el Síndrome General de Adaptación (1923).

Efectos del estrés en el sistema nervioso.

Consecuencias del estrés prenatal.

En la ontogenia del sistema nervioso, los efectos de la exposición a estrés o la administración de las hormonas del estrés varían en función de: *i.* el tipo de estrés, *ii.* la duración de la exposición al estresor y *iii.* la controlabilidad del mismo (Amat *et al.*, 2005), así como *iv.* la periodicidad de la administración y *v.* la dosis empleada en el caso de emplearse hormonas u agonistas de las hormonas del estrés (Avishai-Eliner *et al.*, 2002; Kofman, 2002; Takahashi *et al.*, 1988; Weinstock *et al.*, 1988).

El rango de efectos del estrés puede evaluarse desde el nivel conductual hasta el molecular, y la mayoría de los efectos son irreversibles y se mantienen durante toda la vida de los organismos (Ladd *et al.*, 2000). En roedores a los 13 días de gestación, los receptores a CORT son observables en el hipocampo, hipotálamo e hipófisis, deduciéndose que el eje HPA es funcional (Kofman, 2002).

La administración de inyecciones de solución salina diarias a una rata gestante durante la semana previa al parto provocó niveles elevados de CORT y ACTH en la camada, evaluados en P14. El nivel de estas hormonas se mantuvo por encima de los controles tanto en condiciones basales como posterior a la exposición de un evento estresor (Kofman, 2002). El incremento en la concentración plasmática de ACTH y CORT también se mantuvo elevado comparado con el control en la manipulación de estrés por choques eléctricos predecibles en las patas; lo notorio en esta investigación es que la concentración de las mismas hormonas en el plasma sanguíneo de ratas con madres sometidas a choques eléctricos sin escape fue mayor en $\approx 44\%$ para ACTH y $\approx 162\%$ para CORT (Takahashi, *et al.*, 1988).

Por otra parte la administración de CORT durante la gestación, reduce la expresión de receptores tipo II en el hipocampo y la corteza del cíngulo de roedores. Esta pobre expresión de receptores sugiere una respuesta exagerada del eje HPA ante la administración de CORT (Bakker *et al.*, 2001).

Se observó reducción en la tasa de proliferación celular en el giro dentado a lo largo de toda la vida de crías de ratas inmovilizadas tres veces al día en la última semana de gestación (Kofman, 2002). Este efecto se observa

también con la manipulación de estrés durante las primeras tres semanas de vida de roedores (Mirescu *et al.*, 2005)

En seres humanos, la presencia de estrés durante la gestación está correlacionada con bajo peso al nacer y partos prematuros; además de estar asociado con alteraciones en la tasa cardiaca fetal y desórdenes en el neurodesarrollo (Wadhwa *et al.*, 2001).

Consecuencias del estrés postnatal.

En animales altricios como los roedores y el hombre el sistema nervioso no está completamente desarrollado al momento del nacimiento. En roedores, las tres semanas siguientes al parto, corresponden al periodo de mielinización, sinaptogénesis y dendrogénesis, mientras que la tasa de proliferación celular no es tan elevada como la que se observa durante el periodo embrionario (Clancy *et al.*, 2001) excepto para interneuronas, cuyo pico de proliferación es postnatal (Hatten, 1999). La exposición a eventos adversos constituye un riesgo notable para la correcta maduración del sistema, estos riesgos se traducen en alteración en la fisiología o la conducta del organismo (Moles *et al.*, 2004).

La manipulación aguda de estrés mediante 24 horas de privación materna en P3 resultó en decremento de 42% en la capacidad de unión de los receptores a glucocorticoides, observado en P48. Esto significa que los receptores a CORT son sensibles a la manipulación que ocurre en los primeros días de vida postnatal, y que los cambios en la capacidad de unión o afinidad permanecen a lo largo de la vida del individuo, hecho que eventualmente interfiere con los procesos mediados por estos receptores (Sutanto *et al.*, 1996).

La separación materna prolongada, esto es periodos de separación de 180 minutos diariamente, no altera las concentraciones basales de HLC, ACTH

ni CORT en la vida adulta, pero si el sujeto se enfrenta nuevamente a un evento estresor, las concentraciones son mayores que las de controles expuestos al mismo estresor. Por el contrario, la separación materna por periodos de 15 minutos diariamente resulta en una menor secreción de ACTH y CORT así como reducción en la expresión de ARNm de FLC posterior a la exposición a un estresor (Mirescu *et al.*, 2004).

La tasa de neurogénesis en el giro dentado de ratas adultas expuestas a 180 minutos de privación materna durante las dos primeras semanas de vida fue menor comparada con ratas que permanecieron con sus madres o en dónde el periodo de separación era de 15 minutos (Mirescu *et al.*, 2004). Estudios previos correlacionan decremento en la tasa de neurogénesis de neuronas granulares en el hipocampo con la manipulación crónica de estrés durante la vida adulta (Kim & Diamond, 2002); el trabajo de Mirescu y cols. (2004) confirma que la tasa de nacimiento de nuevas neuronas granulares en el giro dentado de ratas adultas a las que se expuso a un evento estresor durante las primeras semanas de vida.

En pruebas como laberintos elevados y arena libre, ratas expuestas a 180 minutos de separación materna evaden los brazos abiertos del laberinto elevado y exploran durante menos tiempo el lugar de la prueba en comparación con las ratas control; por otra parte las ratas separadas durante las primeras dos semanas de vida ingieren 35% menos agua azucarada que los controles en una prueba de elección entre dos botellas, una con agua simple y otra con sacarina al 0.02% (Ladd *et al.*, 2000).

Sistema serotoninérgico y eje HPA.

Durante la vida adulta, el sistema serotoninérgico regula la actividad del eje hipotálamo, hipófisis, glándula suprarrenal (eje HPA). Las neuronas secretoras del FLC en el PVN son componente central de este eje de regulación de la respuesta al estrés; este grupo de neuronas recibe inervación que proviene del núcleo del rafe magno (Larsen *et al.*, 1996) y de la parte compacta del núcleo dorsomedial del hipotálamo, que también sintetiza serotonina (Azmitia & Jacobs, 1992; Larsen *et al.*, 1996).

La administración aguda de inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) estimulan la liberación de FLC en el PVN, con la consecutiva activación de todo el eje HPA, mientras que un tratamiento continuo con ISRS lo desensibiliza (Mikkelsen *et al.*, 2004). Por otra parte, el empleo de adrenalectomía bilateral (ADX) en ratas adultas incrementa la expresión de ARN mensajero al receptor 5-HT_{1A} en la formación hipocámpica, y la administración de corticosterona posterior a la ADX mantiene los niveles de ARN 5-HT_{1A} semejante a los controles (Chalmers *et al.*, 1993); estos hallazgos confirman la existencia de modulación al sistema serotoninérgico mediada por el eje HPA.

Una vía indirecta de modulación al sistema 5-HT la constituye la lipólisis estimulada por la elevación de niveles circulantes de corticosteroides. El incremento en la tasa de lipólisis aumenta la disponibilidad de ácidos grasos libres, mismos que desplazan al triptófano de la unión con albúmina en el torrente sanguíneo, el triptófano libre se acopla al transportador L que lo introduce al SNC. El incremento en disponibilidad de triptófano eleva la tasa de síntesis de serotonina (Chaouloff, 1993).

Durante el desarrollo prenatal la administración de dexametasona, un glucocorticoide sintético, a ratas gestantes durante los días E17 a E19 incrementa los niveles de serotonina en el hipotálamo y el tallo cerebral de las crías a las 14 semanas de vida (Muneoka *et al.*, 1997).

La manipulación de estrés crónico por inyecciones de solución salina diarias durante toda la gestación de ratas, resultó en incremento en los niveles de 5-HT y 5-HIAA comparadas con el control al día P16 en la corteza e hipotálamo, el resto de los días no se encontró diferencia con el control en ninguna de las mediciones (Peters, 1982). En otra manipulación de estrés por hacinamiento e inyecciones de solución salina en los siguientes periodos E16-E18, E16-E19, E16-E20 y E16-E21 se reportaron incrementos en los niveles cerebrales de triptófano, 5-HT y 5-HIAA en el feto de 20 días, triptófano en el feto de 19 días, y ácido 5-indoleacético en el feto de 21 días (Peters, 1990). Ambas manipulaciones tienen resultados que contradicen lo que sucede en adultos, ya que la manipulación de estrés crónico disminuye los niveles de serotonina en el SNC mientras que la manipulación aguda tiende a incrementarlos (De Souza & Van Loon, 1986).

Estrés y aprendizaje espacial.

Consideramos aprendizaje a un cambio en el potencial conductual de un organismo producto de la experiencia (Anderson, 2001). La variación en el nivel de CORT, misma que representa variación en la actividad del eje HPA, se correlaciona con un patrón de ejecución de tareas de aprendizaje espacial. Este patrón se aprecia como una U invertida, en donde a los niveles más bajos y los más elevados de CORT en plasma le corresponden dificultad en el aprendizaje

de una tarea de aprendizaje espacial, mientras que el nivel intermedio de CORT facilita el aprendizaje (Kofman, 2002).

El hipocampo es necesario en el proceso de aprendizaje espacial, sin esta estructura la formación de memorias declarativas y espaciales no es posible, por otra parte regula el asa de retroalimentación negativa del eje HPA por medio de los receptores CORT tipo II; estos mismos receptores son responsables de los efectos adversos de los CORT en el aprendizaje espacial (Kim & Diamond, 2002).

Estrés y trastorno depresivo.

La constelación de respuestas fisiológicas y conductuales ante un estresor tienen el fin de proveer al organismo de energía suficiente para lidiar con el evento, asegurar el alertamiento y ejecutar las conductas especie-específicas necesarias para la supervivencia (Anisman & Matheson, 2005) sin embargo, como ya se mencionó, la respuesta prolongada e intensa al estresor, repercute negativamente en el organismo (de Kloet *et al.*, 2005).

A la condición en la que los niveles de CORT están elevados crónicamente, se le conoce como hipercortisolemia y se encuentra presente en el trastorno depresivo junto con la disfunción en la neurotransmisión de aminas biogénicas, especialmente 5-HT (Fairchild *et al.*, 2003).

La hipercortisolemia provoca deterioro cognoscitivo, evaluado en tareas de aprendizaje y memoria; reducción en el volumen de estructuras límbicas, como el hipocampo y la corteza del cíngulo, además de perturbaciones en el manejo de la ansiedad y la agresividad. Todas las alteraciones mencionadas, pueden encontrarse también en el trastorno depresivo, por lo que el estrés

crónico o la hiperactivación del eje HPA y eventualmente hipercortisolemia, se consideran factores de riesgo para el trastorno depresivo (de Kloet *et al.*, 2005).

Actualmente algunos de los modelos de depresión empleados están basados en la manipulación crónica de estrés (Willner *et al.*, 1992; Willner *et al.*, 1987). La evaluación de los modelos de depresión varía en función de la característica que se desea modelar, como la inmovilidad o la anhedonia (Willner *et al.*, 1992). Ejemplo de ello es la prueba de nado forzado de Porsolt en donde el criterio para considerar a una rata "deprimida" es que presente inmovilidad durante la sesión de nado (Porsolt *et al.*, 1977), sin embargo esta argumentación es endeble ya que cómo demostraron Binik y cols. (1977, 1979), la inmovilidad durante la sesión de nado es un indicador de la probabilidad que una rata tiene para sobrevivir en la prueba de nado, si la rata se agita o tiene una tasa elevada de actividad la probabilidad de perecer ahogada o por fallo cardíaco es mucho mayor que el de una rata con una tasa de actividad reducida o bien que flota inmóvil (Binik *et al.*, 1979; Binik *et al.*, 1977).

Otras formas de evaluar a los modelos de depresión consisten en registrar la tasa de actividad en un campo abierto (Anisman & Matheson, 2005) o bien, la preferencia en la ingesta entre agua simple o una solución de sacarosa al 1% o 5% (D'Aquila *et al.*, 1995; Dess, 1992; Willner *et al.*, 1987; Willner *et al.*, 1992). El consumo de la solución de sacarosa fue menor en ratas sometidas a manipulación de estrés crónico en comparación con el control (Willner *et al.*, 1987; D'Aquila *et al.*, 1994; Willner *et al.*, 1992; Dess, 1992).

La observación entre la preferencia entre una u otra botella posee dos interpretaciones cada una enfocadas a algún aspecto del trastorno depresivo, la primera de ellas relacionada con el cambio en el patrón de ingesta que se

reporta durante el trastorno depresivo (Dess, 1992) y la segunda interpretación enfocada en la ausencia de placer o anhedonia; si posterior o concurrente a la manipulación de estrés crónico la rata prefiere agua simple o bien la ingesta de agua azucarada es menor que el control entonces se le considera "anhedónica" (Dess, 1992; Willner *et al.*, 1992).

Propósito del estudio.

En síntesis, el sistema serotoninérgico durante la ontogenia del sistema nervioso central modifica la morfología de sus estructuras blanco a través de interacción directa, como sucede con la elongación en los procesos 5-HT (Konno *et al.*, 2004; Narita *et al.*, 2002); o indirectas, a través de la estimulación de la secreción del factor neurotrófico derivado de astrocitos que promueve el crecimiento de procesos neuronales 5-HT entre otros (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996; Whitaker-Azmitia, 2001), y la secreción de la proteína *reelin* en las células de Cajal-Retzius (Janusonis *et al.*, 2004), indispensable en la formación de la estructura laminar de las cortezas cerebrales (Rakic & Verne, 1995; Polleux & Anton, 2005).

Por otra parte, el estrés crónico está relacionado con decremento en el nivel de serotonina (De Souza & Van Loon, 1986), la dificultad en el aprendizaje de tareas de aprendizaje espacial (Kim & Diamond, 2002), así como en la etiología del trastorno depresivo mayor (Fairchild *et al.*, 2003; de Kloet *et al.*, 2005).

Por las anteriores razones, el presente trabajo tuvo como propósito estudiar los efectos del estrés crónico durante el periodo prenatal y postnatal sobre la morfología de los núcleos serotoninérgico en ratas, los efectos de la alteración en este sistema de neurotransmisión sobre la migración neuronal, el éxito en la solución de una tarea de aprendizaje espacial y el efecto sobre la preferencia en la ingesta entre una solución de agua con sacarosa al 5% y agua simple.

Hipótesis.

I. El estrés crónico prenatal y/o postnatal en la rata modifica el desarrollo del sistema serotoninérgico, esta alteración será evidente en las posiciones finales de los cuerpos neuronales que constituyen los núcleos 5-HT.

II. La modificación del sistema 5-HT durante la vida embrionaria en la rata provocará alteraciones citoarquitectónicas permanentes en la neocorteza y arquicorteza del cerebro.

III. La manipulación de estrés crónico en etapas tempranas de la vida tendrá consecuencias negativas en la vida adulta de los sujetos en tareas como el aprendizaje espacial, así como la modificación en la preferencia por soluciones azucaradas.

METODO.

Sujetos.

Se usaron las camadas de ratas Wistar hembra de 10 semanas de edad, colocadas en cajas individuales, con agua y comida *ad libitum* (Harlan Teckland Global Diet, 2018; 18% proteína en todas las condiciones salvo grupo con dieta deficiente en triptófano). Los sujetos permanecieron en ciclo luz/oscuridad 12:12, en condiciones de temperatura y humedad constantes. La asignación de las ratas Wistar hembra a cada condición experimental se realizó al azar.

Aparatos.

Tina de nado. Tina de material plástico transparente (Rubbermaid) de 40x60x40 cm. Para la manipulación de nado forzado, se llenó hasta 23 cm de altura con agua a $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

Caja de separación para crías. Caja de cartón de 8x8x8 cm, sin tapa; al interior de cada compartimento se colocó una cama de aserrín limpio. La caja de separación se mantuvo a 34°C colocándola al interior de una incubadora durante los primeros 15 días de vida de las crías (Heraeus, RB360). Al terminar este periodo, la caja de separación permaneció a temperatura ambiente (23°C).

Botellas de agua para preferencia entre botellas. Botellas de cristal con capacidad para 300 mL, con tapa de plástico de presión, y boquillas de acero inoxidable.

Laberinto de Barnes. Plataforma circular de madera (diámetro: 182 cm) con 16 agujeros (diámetro: 17 cm) en la periferia separados 25 cm entre cada

uno. Un cajón meta de madera (30x19x18 cm) se ubicó por debajo de uno de los agujeros. A 60 cm por encima del centro de la plataforma se colocó un foco de 150 watts (Gómez-González, 2003).

Procedimiento.

Para todas las condiciones experimentales se colocó en la caja habitación de la rata hembra a un macho sexualmente maduro y diariamente se realizó frotis vaginal para detectar la presencia de espermatozoides. Una vez que estos fueron detectados en el frotis, se retiró a la rata hembra y se registró ese día como embrionario 0 (E0).

Estrés crónico prenatal. Nado forzado.

A partir de E10, se sometió a cada rata del grupo experimental a 20 minutos diarios de nado forzado en agua a $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Bruner & Vargas, 1994). Al concluir el tiempo de nado, se colocó a la rata en una caja limpia con una toalla de tela seca para eliminarle el exceso de agua y esta pudiera secarse por sí sola.

Estrés crónico postnatal. Privación materna.

Al nacimiento, se dividió a las camadas del grupo control en dos grupos, uno que permaneció durante toda la lactancia con su madre y otro al que se sometió a privación materna. Este último grupo fue marcado en la cola para su identificación usando plumones no tóxicos. Durante tres horas diarias desde P1

a P21 se les sometió a privación materna colocando a las ratas en cajas individuales al interior de una incubadora a 30 °C (Gartside *et al.*, 2003). Al terminar este periodo se les regresó a la caja habitación con la rata madre y el resto de la camada.

Estrés crónico prenatal y postnatal.

Este grupo se constituyó dividiendo las camadas de la condición de estrés prenatal de la misma forma descrita anteriormente para la privación materna, y sometiéndolas al mismo tratamiento.

Dieta deficiente en triptófano.

Debido a que se buscó determinar el efecto del estrés sobre el sistema serotoninérgico y la repercusión en migración neuronal, se empleó una dieta deficiente en triptófano basada en maíz, para comparar los efectos del estrés crónico con las consecuencias de la alteración en el sistema serotoninérgico y la migración neuronal producto de la carencia de serotonina.

Tres semanas previas al inicio de la gestación se cambió la dieta de un grupo de ratas (n=3) por una elaborada con masa de maíz. La dieta Harlan Teckland Global Diet, 2018 se conservó para el resto de los grupos. Durante la gestación y lactancia las ratas recibieron dieta de maíz; al destete las crías continuaron consumiéndola.

Grupo control.

El grupo de ratas control no recibió manipulación alguna después de verificar la presencia de espermatozoides en el *frotis* vaginal. Estas ratas

permanecieron en el bioterio durante toda la gestación, con agua y comida *ad libitum*.

Registro de peso corporal y día de apertura de párpados.

Se registró el peso corporal de las crías en P0, P10 y P20. El día de apertura de párpados se consideró como el día de vida postnatal en el que se separaba la membrana del párpado de la cría.

Técnicas histológicas.

En los días P0, P10, P20 y P90, se sacrificó a tres ratas por camada por condición experimental. Se anestesió a los sujetos con pentobarbital sódico (0.1mL x gramo de peso), seguido de 5 minutos de perfusión trancardiaca de solución salina al 0.9% y 5 minutos de perfusión de amortiguador de fosfatos-salina con paraformaldehído al 4% como fijador. El cerebro se disecó y se le dejó en la solución fijadora por 5 días.

Inmunocitoquímica para hidroxilasa de triptófano.

Al terminar el periodo de fijación, se embebieron 2 cerebros por condición por cada una de las edades a un recipiente con solución de sacarosa al 30%, en dónde permanecieron por 5 días más. Se realizaron cortes sagitales de 40 μm de grosor con un microtomo de congelación. Se usó inmunocitoquímica para visualizar neuronas serotoninérgicas (anticuerpo primario de oveja contra hidroxilasa de triptófano (1:1000), Cat. AB1541,

Chemicon International; anticuerpo secundario biotinilado de cabra contra oveja (1:200), Cat. BA-6000, Vector Laboratories; avidina y biotina del Kit ABC Mouse and Rabbit UniTect, Cat XHC01-1EA, Calbiochem; Kit de sustrato DAB para peroxidasas, Cat. SK-4100, Vector Laboratories). Los cortes se pegaron en portaobjetos cubiertos con Poly-L Lysine (Sigma) y después de secarse, se montaron con Entellán (Merck).

Tinción de Nissl.

Dos cerebros de cada condición experimental de 20 y 90 días se les deshidrató por inmersión en concentraciones crecientes de alcohol, después de aclarado con xilol se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 10 μm con un microtomo; los cortes se extendieron con ayuda de agua tibia (40 °C) en baño maría a la que se le agregaron 5 gramos de gelatina bacteriológica (Difco) por cada 200 mL de agua. Se pegó el tejido en portaobjetos cubiertos con Poly-L-lysine y se les dejó secar en un horno a 40 °C por 20 minutos. La tinción de Nissl para este tejido se realizó de acuerdo al Manual de Métodos Histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (1992).

Tinción de Golgi.

Después de la fijación, dos cerebros por condición experimental de 90 días de vida fueron procesados con la técnica modificada de Golgi rápido (Cajal) de acuerdo a especificaciones del manual del laboratorio. Al terminar la tinción, se realizaron cortes de 80 μm ; los cortes se deshidrataron en pasos

sucesivos de alcohol de 96°, absoluto, absoluto-xilol y xilol y se montaron con entellán.

Microfotografías.

Se empleó un fotomicroscopio Zeiss de tres entradas Zeiss acoplado a una cámara fotográfica para microscopio (AxioCam). Se empleó magnificación X100 para las microfotografías de inmunocitoquímica para hidroxilasa de triptófano, X100 y X200 para tomar microfotografías de la formación hipocámpica en las tinciones de Nissl de las distintas condiciones y X100 para las microfotografías de corteza cerebral en las tinciones de Golgi. Las microfotografías se grabaron en formato JPG para su posterior análisis. Se asignó un número a cada microfotografía y este código se rompió después de elaborados los conteos celulares y la reconstrucción de las estructuras.

Cuantificación celular.

Dado el interés por conocer el efecto del estrés sobre la migración neuronal, se realizó conteo de las neuronas ectópicas en el hipocampo, para ello se emplearon las microfotografías de formación hipocámpica teñidas con la técnica de Nissl. En cada microfotografía se contó el número de neuronas piramidales ectópicas en la región CA2 del Cuerno de Amón con el contador celular (Cell Counter) del programa gratuito ImageJ, National Health Institute de Bethesda, Maryland, U.S.A.

Reconstrucción de estructuras.

Las microfotografías de inmunocitoquímica para hidroxilasa de triptófano fueron agrupadas en una diapositiva en blanco de Office Power Point (Microsoft Office 2003) hasta obtener una imagen de todo el tallo cerebral.

Evaluaciones conductuales.

Preferencia entre dos botellas. En este trabajo, dados los antecedentes de la reducción de la preferencia por el agua azucarada en las ratas sujetas a manipulación crónica de estrés, se evaluó el efecto del estrés crónico y la deficiencia en triptófano durante el desarrollo sobre la preferencia en la ingesta de agua azucarada *versus* agua simple. A partir de P60 se colocó a tres ratas de cada condición experimental en cajas individuales y se les privó de agua por 19 horas (1400-0900hrs), al final de este periodo se registró el peso corporal y se le dio acceso a dos botellas con agua bidestilada durante cinco horas (0900 - 1400hrs). Al concluir el tiempo de acceso al agua, se registró la ingesta en mililitros, por botella y total. Una vez que la ingesta fue estable, se cambió el contenido de una de las botellas por solución de sacarosa al 5% (Dess, 1992). La solución de sacarosa se le proporcionó por cinco días consecutivos (D'Aquila *et al*, 1995; Wilner *et al.*, 1992) al término de los cuáles el contenido se cambió nuevamente por agua bidestilada y se registró el consumo durante cinco días más. La ingesta de líquidos en la prueba de elección entre dos botellas se evaluó en cada uno de los cinco días sumando el volumen total de lo ingerido diariamente en las dos botellas y calculando el porcentaje de la ingesta por botella de acuerdo a la siguiente fórmula: $[(\text{Ingesta botella } x / \text{Ingesta total}) \times 100]$.

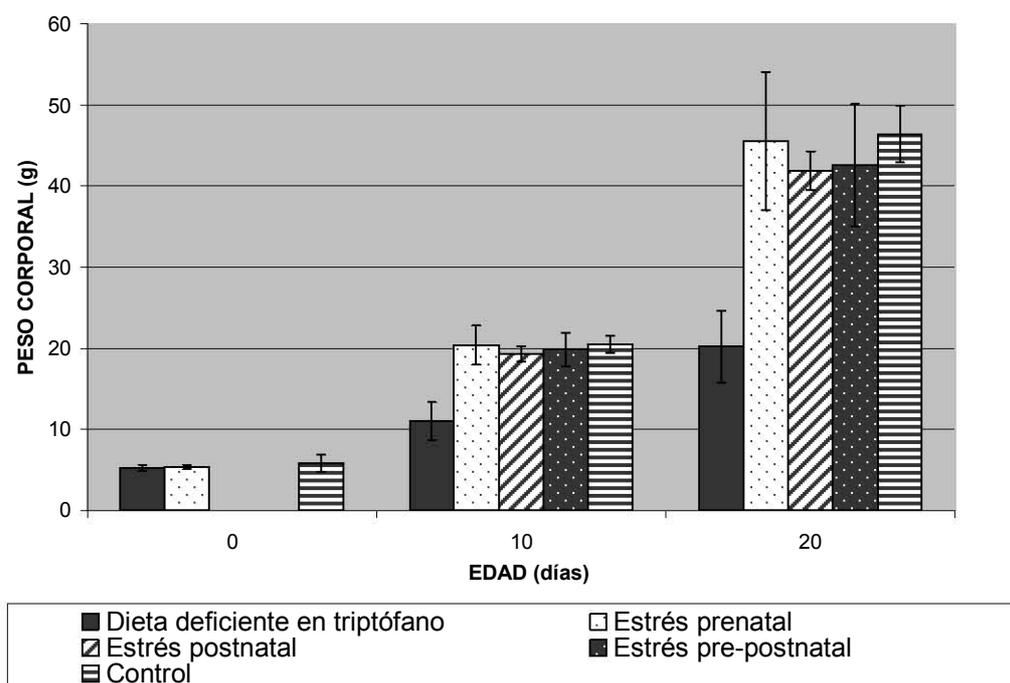
Laberinto de Barnes. En P90, se probó la ejecución de una tarea de aprendizaje espacial, para lo cuál se empleó el laberinto de Barnes. La evaluación de la ejecución se realizó comparando la latencia para encontrar el agujero meta, el número de errores, definidos como visitas a cualquier agujero que no fuera el que conducía al cajón meta y el número de zonas cruzadas, definidas como cruces por el centro del laberinto y por la orilla sin visitar dos agujeros consecutivos (Gómez González, 2003). Tres ratas por condición experimental fueron entrenadas en el laberinto. El entrenamiento consistió en una fase de habituación al cajón meta, con una duración de 4 minutos, en la que se permitió a la rata explorar el cajón, así como la entrada al mismo. Al término de la habituación, se regresó a la rata a su caja habitación, en donde permaneció por un minuto mientras se limpiaba la superficie del laberinto y el interior del cajón meta con una solución de limpiador con aroma intenso para eliminar claves odoríferas. El ensayo consistió en colocar a la rata en el centro del laberinto, bajo iluminación intensa, y permitirle encontrar el cajón meta por exploración en todo el laberinto. El tiempo permitido fue de 4 minutos por ensayo, se realizaron tres ensayos por día hasta completar once ensayos. Una vez que la rata encontraba el cajón meta, se le permitía permanecer un minuto en el interior del cajón, y al término de este, se le llevaba a la caja-habitación mientras se limpiaba de nuevo el laberinto para el siguiente ensayo hasta completar los tres ensayos diarios.

RESULTADOS.

Peso corporal.

En P0 el peso corporal de las crías no tuvo diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones ($F_{2,17} = 1.236$ $p = 0.315$). En P10, el

peso corporal promedio de los sujetos de la condición dieta deficiente en triptófano, correspondía al 55.08% del peso promedio de las condiciones restantes incluido el control ($X_{\text{dieta}} = 11.01$ g, $X_{\text{resto condiciones}} = 19.99$ g). En P20, el peso promedio de los sujetos de la condición dieta deficiente en triptófano, correspondía al 45.82% del peso corporal de las condiciones restantes incluido el control. ($X_{\text{dieta}} = 20.22$ g, $X_{\text{resto condiciones}} = 44.12$ g).



Gráfica 1. Peso corporal promedio y desviación estándar de los sujetos de las distintas condiciones experimentales en los días P0, P10 y P20 de vida.

Día de apertura de párpados.

Una forma de asegurar el desarrollo adecuado de las crías en este trabajo fue el registro del día de apertura de los párpados (Tabla 1). El análisis de varianza de los días de apertura mostraron diferencias estadísticamente significativas entre condiciones ($F_{4-15} = 3.15$, $p < 0.05$). El análisis *post hoc* con

la prueba de Tukey HSD reveló que comparado contra el control, el grupo de dieta deficiente en triptófano tenía retardo en el día de apertura de los párpados (Dieta, $p < 0.05$). Comparado con el control, ninguna manipulación de estrés modificó notablemente el día de apertura de los párpados (Estrés Prenatal $p > 0.05$, Estrés Postnatal $p > 0.05$, Estrés Prenatal y postnatal $p > 0.05$).

Condición experimental.	Día promedio.	Desviación estándar.
Dieta deficiente en triptófano	14.62	0.48
Estrés postnatal	13.80	0.57
Estrés prenatal.	13.66	0.58
Estrés prenatal y postnatal	14.33	0.58
Control	13.5	0.65

Tabla 1. Edad en días de la apertura de párpados para las distintas condiciones experimentales (media y desviación estándar).

Preferencia entre botellas.

En la prueba de preferencia entre dos botellas, una con agua simple y la otra con una solución de agua con sacarosa al 5%, no se encontraron diferencias en el porcentaje de preferencia para el agua simple (Día 1: $F_{4,7} = 1.228$, $p > 0.05$; Día 2: $F_{4,7} = 1.523$, $p > 0.05$; Día 3: $F_{4,7} = 1.183$, $p > 0.05$; Día 4: $F_{4,7} = 1.183$, $p > 0.05$; Día 5: $F_{4,7} = 1.179$, $p > 0.05$), ni para el porcentaje de preferencia de la solución de agua con 5% de sacarosa (Día 1: $F_{4,7} = 0.676$, $p > 0.05$; Día 2: $F_{4,7} = 2.436$, $p > 0.05$; Día 3: $F_{4,7} = 1.469$, $p > 0.05$; Día 4: $F_{4,7} = 1.53$, $p > 0.05$; Día 5: $F_{4,7} = 0.733$, $p > 0.05$) entre las distintas condiciones

experimentales a lo largo de los cinco días de la prueba (ver en Tabla 2 la media y desviación estándar del porcentaje de preferencia).

Condición experimental	Porcentaje de preferencia agua simple.	Porcentaje de preferencia solución de sacarosa al 5%.
Dieta deficiente en triptófano.	20.11 ± 5.3	79.88 ± 4.75
Estrés postnatal	13.34 ± 6.22	86.66 ± 5.56
Estrés prenatal	10.27 ± 4.55	89.73 ± 4.06
Estrés prenatal-postnatal.	8.25 ± 4.22	91.75 ± 3.77
Control.	9.5 ± 7.46	90.38 ± 6.58

Tabla 2. Promedio y desviación estándar del porcentaje de preferencia por agua simple y solución de sacarosa al 5% entre condiciones.

Laberinto de Barnes.

Para la ejecución de la tarea de aprendizaje espacial en el Laberinto de Barnes se consideró la reducción en 80% de la latencia, número de errores y zonas cruzadas como criterio de aprendizaje para la posición del cajón meta. En la ejecución de la tarea de aprendizaje no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la evaluación de la latencia para encontrar el agujero meta y en el número de zonas cruzadas (Latencia $X^2= 6.841$, g.l.= 4, $p>0.05$; Zonas cruzadas $X^2= 4.386$, g.l.= 4, $p>0.05$). Sin embargo, el número de ensayo en el que se alcanza el criterio de aprendizaje para el número de errores, es distinto entre las distintas condiciones experimentales *versus* el control

excepto para el grupo deficiente en triptófano, evaluado con la prueba W de Wilcoxon (control vs estrés pre y postnatal: $W= 6.00$, $p<0.05$; control vs estrés prenatal: $W= 6.00$, $p<0.05$; control vs estrés postnatal: $W= 6.00$, $p<0.05$; control vs dieta: $W= 6.00$, $p>0.05$). El grupo deficiente en triptófano alcanzó el criterio de aprendizaje aproximadamente en el mismo ensayo que los sujetos de las condiciones de estrés postnatal (10.3 ± 2.12) y estrés prenatal y postnatal (10 ± 3.46) pero debido a lo reducido de la muestra, no resultó significativamente distinto del control (Tabla 3).

Condición experimental.	Número de ensayo.
Dieta deficiente en triptófano.	10.5 ± 2.12
Estrés postnatal.	10.3 ± 2.08
Estrés prenatal.	7.3 ± 2.08
Estrés prenatal y postnatal.	10 ± 3.46
Control.	3 ± 1

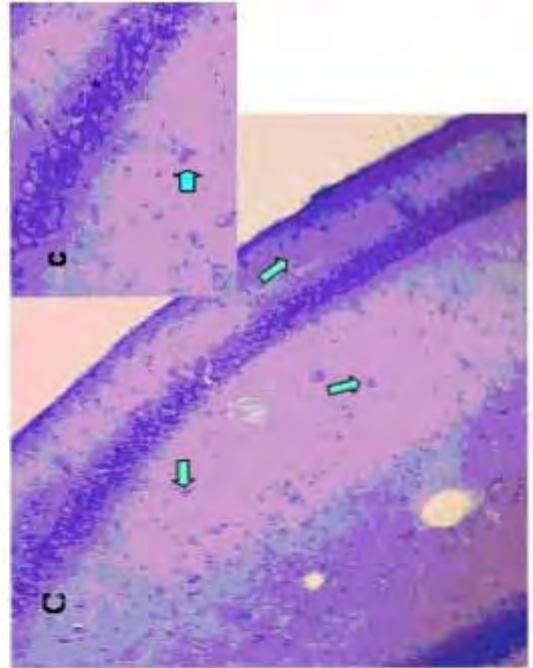
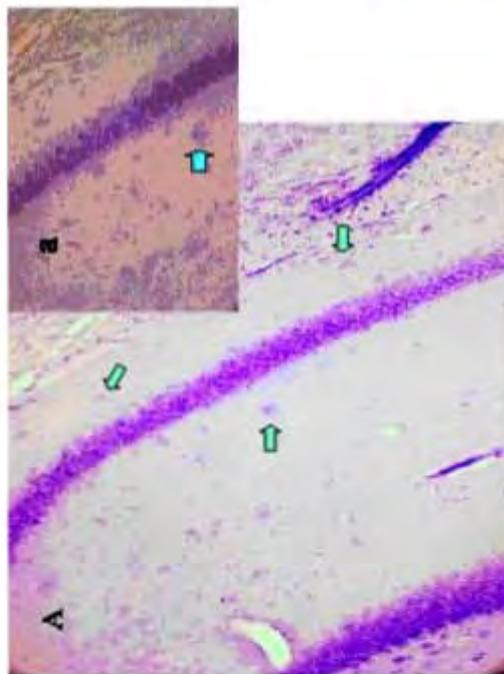
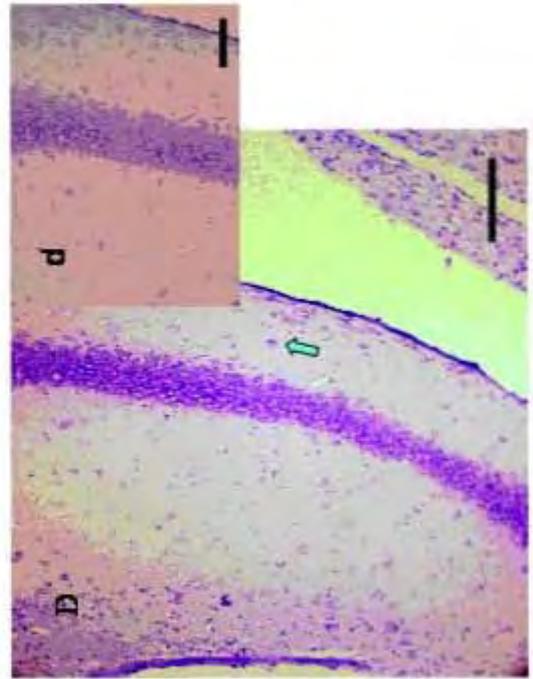
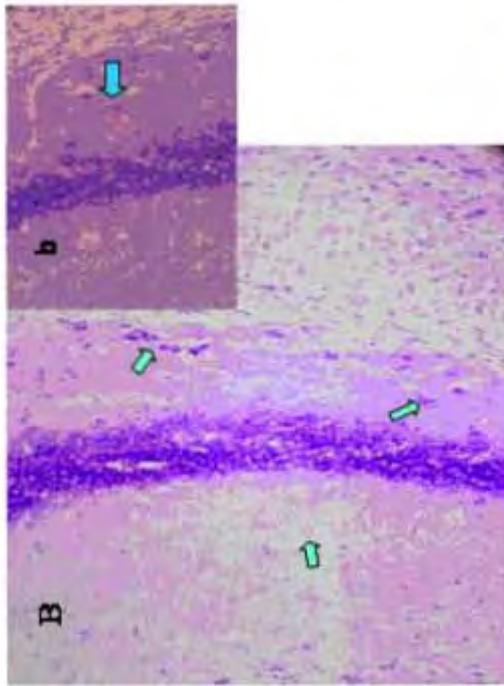
Tabla 3. En esta tabla se observa la media y desviación estándar del número de ensayo en el que se alcanza el criterio de reducción de 80% de errores por ensayo en el laberinto de Barnes.

Cuantificación neuronas ectópicas.

El número de neuronas piramidales ectópicas en el estrato *lacunosum moleculare* y polimórfico de CA2 fue evaluado a partir de las microfotografías de formación hipocámpica tomadas en P20. Con la aplicación Cell Counter del Analizador de imágenes ImageJ, se realizó el conteo de neuronas piramidales ectópicas (ver Figura 2).

El número de neuronas ectópicas y de neuronas correctamente situadas entre las distintas condiciones experimentales se comparó con la prueba de Kruskal-Wallis se encontró que la diferencia entre condiciones para el número de neuronas ectópicas fue estadísticamente significativa ($X^2= 7.686$, g.l.=3, $p<0.05$). Posteriormente, en las comparaciones entre el grupo control contra el resto de las condiciones, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de neuronas piramidales ectópicas con la prueba *W* de Wilcoxon (control vs. estrés pre y postnatal: $W= 10.00$, $p<0.05$; control vs. estrés prenatal: $W= 13.50$, $p<0.05$; control vs. dieta: $W= 10.50$, $p<0.05$). Ver Tabla 4. El grupo de estrés postnatal no fue evaluado dentro de las alteraciones en la migración neuronal, dado que el linaje celular observado no sufre alteración en la migración neuronal si se somete a estrés postnatal al organismo (Gómez González 2003).

Figura 2. Desarreglos citoarquitectónicos en el hipocampo. Las microfotografías muestran con flechas ejemplos de neuronas piramidales ectópicas en el sector CA2 en las condiciones A. Dieta deficiente de triptófano, B. Estrés prenatal-postnatal y C. Estrés prenatal comparadas con D. Control. Escala: A, B,C,D = 200 micrómetros; a,b,c,d = 100 micrómetros. Tinción de Nissl. (página siguiente).



Condición experimental.	Media neuronas piramidales ectópicas.	Desviación estándar neuronas piramidales ectópicas.
Dieta deficiente en triptófano.	40.5 *	14.48
Estrés Prenatal.	33.28 *	18.40
Estrés prenatal - postnatal.	32 *	6.78
Control.	14.5	6.45

Tabla 4. Media y desviación estándar en el número de neuronas ectópicas en el hipocampo en cada condición experimental. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

En la neocorteza de los animales sometidos a estrés prenatal se ha reportado alteración en la citoarquitectura, esto es neuronas piramidales fuera de la capa que en que deben estar ubicadas, además neuronas piramidales en posiciones aberrantes, como puede ser invertidas u horizontales al plano que les corresponde (Gómez González, 2003). En este trabajo con la tinción de Golgi en P90 se observó que la dieta deficiente en triptófano provocó el mismo tipo de desarreglos citoarquitectónicos en la neocorteza de las ratas, como lo muestra la Figura 3.

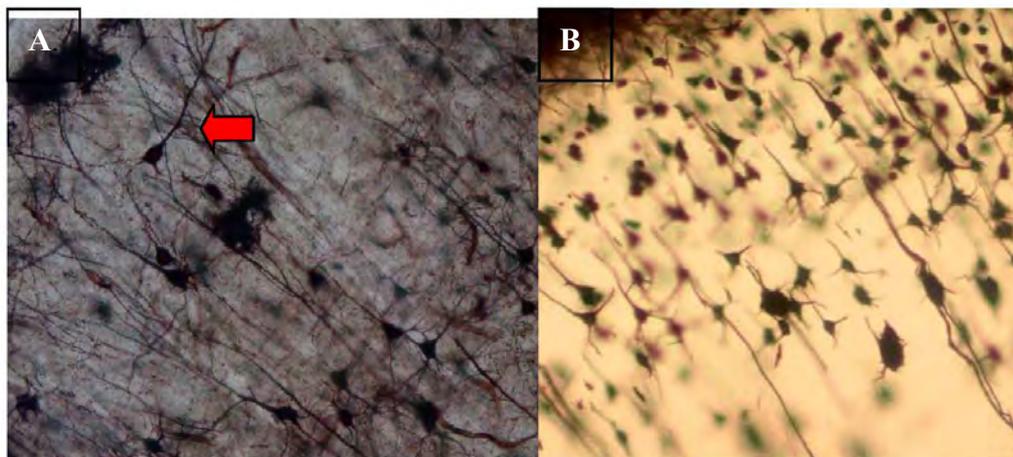


Figura 3. Fotomicrografías de la neocorteza de la rata. En A puede observarse la neocorteza de un sujeto de la condición deficiente en triptófano; nótese la neurona piramidal en posición aberrante (flecha) en comparación con B. control. Tinción de Golgi.

Morfología del sistema serotoninérgico.

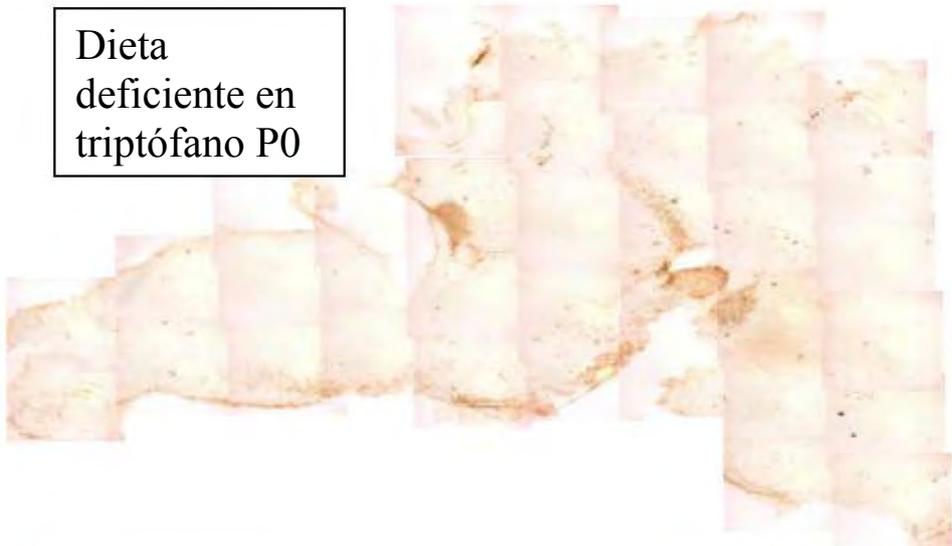
La reconstrucción del tallo cerebral a partir de las microfotografías de inmunocitoquímica para hidroxilasa de triptófano permitió evaluar la distribución y densidad de los núcleos serotoninérgicos en el tallo cerebral de las ratas al momento del nacimiento. Reconstrucciones del tallo cerebral a partir de microfotografías de los grupos control, estrés prenatal y dieta deficiente en triptófano fueron comparadas; se observó que los núcleos serotoninérgicos en la manipulación de estrés prenatal, presentaron un arreglo difuso que no permitió delinear los límites entre los núcleos rostrales; en la condición de dieta deficiente en triptófano los núcleos serotoninérgicos rostrales presentaban un arreglo más compacto que en el control y los límites para delinear a los núcleos serotoninérgicos eran claros. Véase Figura 4.

Figura 4. Reconstrucción de los núcleos serotoninérgicos en el tallo cerebral en las condiciones dieta deficiente en triptófano, estrés prenatal y control. Obsérvese la distribución difusa de los núcleos 5-HT en la condición estrés prenatal, indicada con una flecha (página siguiente).

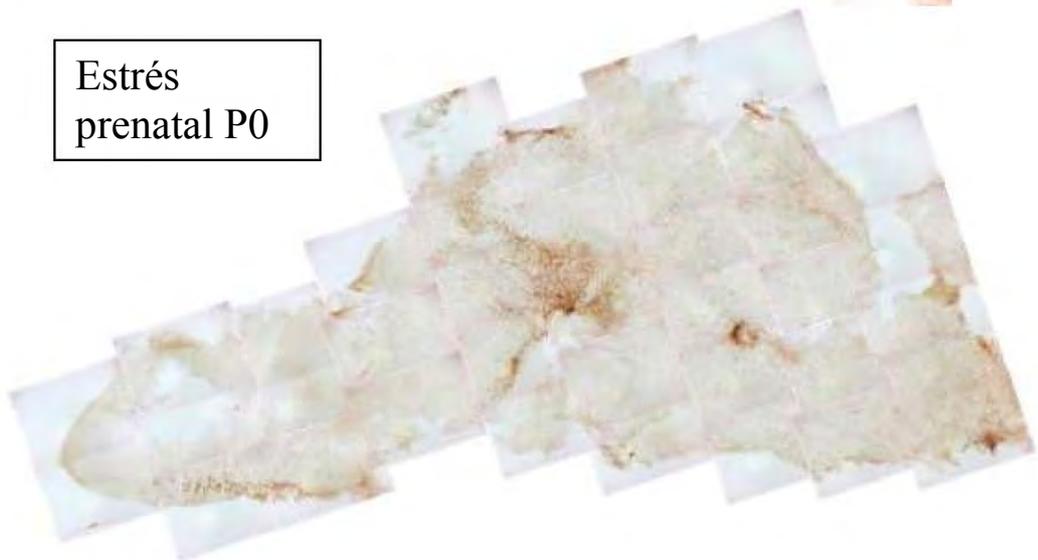
Control P0



Dieta deficiente en triptófano P0



Estrés prenatal P0



DISCUSIÓN.

Al nacimiento, el peso corporal de las crías en todas las condiciones experimentales y el control fueron similares, no así en el resto de los registros (P5, P10 y P20) en los que se observó que el grupo cuyas madres fueron alimentadas durante la gestación y lactancia con la dieta deficiente en triptófano presentaron bajo peso, provocado probablemente por la deficiencia de ácidos grasos y aminoácidos en la dieta (Fernstrom & Hirsch, 1977; Fernstrom & Lytle, 1979), sin embargo, tanto los eventos de migración de neuronas piramidales en la neocorteza como la neurogénesis y migración de neuronas del sistema serotoninérgico observados en el presente trabajo se presentan durante la vida embrionaria, por lo que se encuentran libres de los efectos de la baja de peso posterior al nacimiento.

El día de apertura de párpados en las crías de las condiciones de estrés prenatal, estrés prenatal y postnatal, estrés postnatal y control fue similar, a pesar de que en un estudio previo se señaló que el estrés prenatal adelantó el día de apertura de párpados (Gómez González, 2003). Las crías cuyas madres recibieron la dieta deficiente en triptófano mostraron retraso en el día de apertura de párpados con respecto al grupo control. Sin embargo, según Albers (2005), el día de apertura de párpados en las ratas domesticadas ocurre en P15 por lo que el retraso en el día de apertura de párpados del grupo con dieta deficiente en triptófano no se consideró que excediera los límites del rango normal.

En las pruebas conductuales, la prueba de preferencia entre botellas con agua simple y solución de sacarosa al 5% no reveló diferencias en la preferencia por el agua azucarada entre grupos. Originalmente, esta prueba fue

empleada como indicador de anhedonia en un modelo de depresión en roedores en el que se les sometía a estrés crónico de "moderada" intensidad (p. ej. inclinación de la caja 45°, aserrín mojado, privación de alimentos, iluminación continua, ruido blanco intermitente, hacinamiento, acceso restringido al alimento, objetos extraños al interior de la caja-habitación, exposición al olor de un predador) durante un periodo de 5 semanas. El consumo de solución de sacarosa en el grupo de ratas sometidas al tratamiento estresor disminuyó en comparación con el consumo observado en la línea base de ingesta de solución de sacarosa elaborada previamente al tratamiento y también con el consumo de solución azucarada registrado después de la primera semana de tratamiento.

Además, en el trabajo de Wilner y cols. (1987) se observó que la ingesta promedio de solución de sacarosa fue menor en ratas sometidas al tratamiento estresor que el grupo control; por otra parte, no hubo diferencia entre la preferencia por agua simple o solución de sacarosa en el grupo experimental a diferencia del grupo control. Wilner y cols. (1987) interpretaron como hedonia a la preferencia por la solución de sacarosa versus agua simple, y consideraron anhedonia tanto el consumo decreciente de solución de sacarosa al 1% como la indiferencia en la preferencia por alguno de los líquidos; de esa forma concluyeron que el estrés crónico posibilita la aparición de anhedonia.

En el presente trabajo se empleó una solución de sacarosa al 5%, que de acuerdo a la literatura, es la concentración de sacarosa por la que las ratas tienen mayor preferencia comparada con concentraciones de 0.1, 1 y 8% (Dess, 1992). Contrario a los trabajos antes mencionados, no se encontró diferencia en la preferencia en el consumo de agua simple o de solución de sacarosa entre las distintas condiciones experimentales con el grupo control pese a la relación

establecida entre estrés crónico y anhedonia (Wilner *et al.*, 1987; D'Aquila *et al.*, 1994; Wilner *et al.*, 1992; Dess, 1992; Chrousos, 1998; Ladd *et al.*, 2000).

Ladd y cols. (2000) encontraron 35% de reducción en el consumo de solución de sacarosa al 1% en ratas adultas que fueron sometidas a 180 minutos de separación materna diaria durante P2 a P14 comparadas con ratas separadas durante 15 minutos diarios y ratas control. Los autores concluyen que la presencia de eventos estresores durante ventanas críticas para el desarrollo del sistema nervioso, como las primeras tres semanas de vida postnatal en las ratas, afectan los procesos de plasticidad dependientes de actividad o influencia hormonal en la ontogenia del SNC. Esto ocurre a través de modificaciones morfológicas y funcionales que eventualmente alteran el modo en el que el sujeto percibe y responde a su medio, como en una menor ingesta de agua endulzada comparada con el control (Ladd *et al.*, 2000).

La deficiencia en serotonina se correlaciona con el Trastorno Depresivo Mayor (Fairchild *et al.*, 2003), alteración neuropsiquiátrica que en este estudio se intentó modelar con el tratamiento de estrés crónico (Wilner *et al.*, 1987; Wilner *et al.*, 1992; D'Aquila *et al.*, 1994). Por esta razón se incluyó un grupo de ratas alimentadas crónicamente con una dieta deficiente en triptófano, que provoca decremento en la producción de serotonina (Lytle *et al.* 1975; Fernstrom & Hirsch, 1977; Fernstrom & Lytle, 1979); sin embargo, con la prueba de preferencia entre botellas no se encontraron diferencias con el resto de las condiciones.

Los sujetos expuestos a estrés en fases tempranas de la vida o aquellos crónicamente deficientes en triptófano no mostraron diferencias con los controles a edad adulta en el consumo de agua simple y solución de sacarosa al

5% pese a los correlatos reportados en la literatura entre estrés crónico y anhedonia (Wilner *et al.*, 1987; D'Aquila *et al.*, 1994; Wilner *et al.*, 1992; Dess, 1992; Chrousos, 1998; Ladd *et al.*, 2000) y deficiencia en el nivel de serotonina y anhedonia (Fairchild *et al.*, 2003).

Trabajos recientes señalan que no basta alterar el nivel de serotonina para que espontáneamente aparezca el trastorno depresivo, sino que la emergencia de este trastorno esta influida por la vulnerabilidad genética del individuo y la exposición a eventos estresores (Caspi *et al.*, 2003).

En individuos con alelos cortos en la región del promotor del transportador de serotonina, los eventos estresores resultan en la aparición de más síntomas de depresión, depresión diagnosticada y suicidio posterior a eventos estresantes en comparación con individuos homocigóticos para el mismo alelo (Caspi *et al.*, 2003). En el presente trabajo no se puede descartar que los sujetos sometidos a estrés en etapas tempranas de la vida o deficientes en el aminoácido triptófano exhiban conductas catalogadas como “depresivas” con mayor probabilidad si se les expusiera a manipulación de estrés en la vida adulta, de acuerdo a la evidencia de Caspi y cols. (2003).

La evaluación del aprendizaje espacial en el laberinto de Barnes se realizó en la vida adulta, los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los que se obtuvieron en un estudio previo efectuado en crías de rata de un mes de vida en el que se reportó que la manipulación de estrés prenatal por privación de sueño y nado forzado en las hembras gestantes, o en la combinación de estrés prenatal y postnatal por nado forzado provocaron que las crías alcanzaran el criterio de aprendizaje 2 o 3 ensayos después que el grupo control, al cambiar el cajón meta a una nueva posición en el laberinto de Barnes

(Gómez González, 2003). En el presente trabajo, las ratas sometidas a estrés prenatal y postnatal, estrés postnatal y dieta deficiente en triptófano retrasaron la adquisición del criterio de aprendizaje 7 ensayos con respecto al grupo control mientras que la manipulación de estrés prenatal retrasó solamente 4 ensayos la adquisición del criterio de reducción del 80% en el número de errores en la misma comparación.

En cuanto a la latencia para encontrar el agujero meta y el número de cruces por el centro del laberinto, estas fueron similares estadísticamente para todas las condiciones, lo que indicaría que las ratas exploraron el laberinto de forma similar, por lo que las diferencias en el número de errores entre el control y el resto de los grupos no se debe a que las ratas permanecieran inmóviles y no buscaran el agujero meta.

Mazer y cols. (1997), reportaron que la depleción de serotonina vía administración de *para*-clorofenilalanina durante la sinaptogénesis de la rata redujo la densidad sináptica en el hipocampo e indujo déficits en el aprendizaje espacial. En este trabajo, a pesar de que los análisis estadísticos no mostraron diferencias en el día en el que se alcanza el criterio de aprendizaje, en la Tabla 3 se observa que los sujetos deficientes en triptófano presentaron dificultad para alcanzar el criterio de aprendizaje.

En la manipulación de estrés prenatal, se observó, además de las alteraciones en la citoarquitectura del hipocampo, distribución difusa de los núcleos serotoninérgicos; el retraso en la adquisición del criterio de aprendizaje permite concluir que la integridad morfológica y funcional de ambos elementos es necesaria para este tipo de tarea.

Narita y cols. (2004), reportaron que las crías de rata expuestas a inyecciones de talidomida o ácido valpróico en E9, es decir previo a la neurulación, presentaron hiperserotonemia, incremento en la densidad de 5-HT en el hipocampo y modificación en el patrón de distribución del núcleo dorsal del rafe.

Tal como se comentó en la introducción, la concentración de 5-HT durante la ontogenia del sistema nervioso regula el crecimiento del sistema serotoninérgico, luego entonces si a la modificación en la distribución de las somas de las neuronas serotoninérgicas le corresponde alteración en la concentración normal de serotonina durante la ontogenia.

La posición normal de los núcleos serotoninérgicos en el tallo cerebral de los sujetos expuestos a estrés prenatal por nado forzado puede reflejar una condición de desequilibrio en el nivel normal de 5-HT. En la condición deficiente en triptófano, los sujetos no mostraron distribución anormal de los núcleos 5-HT, sin embargo, es necesario realizar la evaluación del área que ocupan los núcleos serotoninérgicos, así como la densidad de somas y procesos 5-HT para descartar anomalías en el sistema.

En el caso de las condiciones de estrés postnatal y estrés prenatal, la evaluación de la densidad de los procesos 5-HT es una tarea pendiente y de suma importancia ya que como se mencionó con anterioridad, el periodo en el que el sistema serotoninérgico establece sinapsis concluye postnatalmente tanto en los roedores como en el hombre (Lidov & Molliver, 1982; Jacobs & Azmitia, 1992), por lo que la inervación de los blancos del sistema 5-HT no se limita a lo que se observó en la corteza cerebral de los sujetos.

Gómez González (2003), reportó desarreglos citoarquitectónicos en el hipocampo y neocorteza de sujetos sometidos a manipulación de estrés prenatal por privación de sueño y nado forzado. Los desarreglos citoarquitectónicos aquí reportados no se limitaron a la condición de estrés prenatal, la condición deficiente en triptófano también presentó alteración en la citoarquitectura del hipocampo y la neocorteza.

Jannussonis y cols. (2004), describieron alteración en la organización laminar y en barriles de la corteza presubicular en ratones sujetos a administración de un agonista 5-HT en la gestación; en el presente trabajo, la alteración en la migración neuronal que se observa en el grupo deficiente en triptófano obedece a decremento en la concentración de 5-HT. Jannussonis y cols. (2004), reportaron reducción en el nivel de *reelin* posterior a la administración del agonista 5-HT comparado con el nivel de *reelin* del grupo control.

De esta forma, el desarreglo citoarquitectónico que se observó en el hipocampo y neocorteza en el presente trabajo puede estar provocado por modificación en el nivel de la proteína *reelin* secretada en las células de Cajal-Retzius aunque se desconoce si la disminución en el nivel de triptófano, y por ende en el de serotonina provoca hiper o hiposecreción de *reelin* ya que no se conocen hasta la fecha los receptores 5-HT en estas células.

Por otra parte, el estrés crónico está vinculado con decremento en el nivel extracelular de 5-HT mientras que el estrés agudo tiende a elevar el nivel (De Souza & Van Loon, 1986) por lo que la manipulación de estrés prenatal en este trabajo presumiblemente disminuyó el nivel de serotonina, con consecuencias similares para la migración neuronal a las que observaron en el

grupo deficiente en triptófano. Para afirmar lo anterior es indispensable corroborar decremento en el nivel de serotonina tanto en la condición de estrés prenatal como en la deficiencia de triptófano por microdiálisis en una forma directa, o indirectamente a través de la sobre-expresión de receptores a serotonina.

CONCLUSIÓN.

En el presente trabajo se encontró que la manipulación de estrés prenatal alteró la morfología de los núcleos serotoninérgicos en el tallo cerebral, y concurrente a esta observación, se encontraron alteraciones en la migración neuronal en la neocorteza y arquicorteza. En el grupo deficiente en triptófano, se observaron alteraciones citoarquitectónicas similares a las referidas en la condición estrés prenatal, por lo que se consideró que el sistema serotoninérgico contribuye en el proceso de migración neuronal y que la manipulación de estrés, como la deficiencia en el aminoácido precursor de la serotonina, interfiere con la migración neuronal.

Por otra parte, se observó retraso en la adquisición del criterio de aprendizaje en el laberinto de Barnes en las condiciones estrés prenatal, estrés prenatal-postnatal y deficiente en triptófano, mismas condiciones que presentaron aumento significativo en el número de neuronas piramidales ectópicas en el hipocampo, estructura relacionada con el aprendizaje espacial, con lo que se concluye que la integridad de morfológica del hipocampo es indispensable para este tipo de tareas.

Finalmente, no se observó diferencia en la preferencia en el consumo de agua azucarada entre las condiciones experimentales y el control.

Apéndice.

Dieta libre de triptófano. Debido a la carencia de triptófano en el maíz (*Zea mays*), esta semilla se ha empleado en la formulación de dietas para disminuir el nivel de triptófano en el SNC y en consecuencia el de serotonina (Thomas & Wysocki, 1967; Lytle *et al.* 1975; Fernstrom & Hirsch, 1977), sin embargo, el maíz carece también de ácido nicotínico, condición por la que se le ha empleado para modelar pelagra, un padecimiento caracterizado por diarrea, dermatitis y demencia (Thomas & Wysocki, 1967). Dado este antecedente, se decidió incorporar ácido nicotínico a la dieta de maíz para prevenir la aparición de pelagra. La cantidad de ácido nicotínico que se agregó correspondía a la contenida en la dieta Harlan-Teklad 2018 (ácido nicotínico 106.77 mg/kg).

A un kilogramo de masa de maíz nixtamalizado se agregó 1 gramo de sales minerales (piedra de sales minerales pulverizada, Rueda Mineral, Kaytee Products), y el contenido de 5 cápsulas de vitaminas del complejo B (Complejo B con hierro y zinc, Softgels, Galcecaps). Después de incorporar todo, se moldeó la masa en tiras largas y se cortó en trozos de ± 3 cm a los que se dejó secar en un lugar ventilado y fresco.

REFERENCIAS.

- Anderson, J. R. (2001) *Aprendizaje y memoria. Un enfoque integral*. México: McGraw Hill.
- Albers, J. R. (2005). Infancy. En: Wishaw, I. Q. & Kolb, B. (Eds.). *The behavior of the laboratory rat. A handbook with tests* (pp. 266-277). New York: Oxford University Press.
- Amat, J., Baratta, M. V., Paul, E., Bland, S. T., Watkins, L. R. & Maier, S. F. (2005). Medial prefrontal cortex determinates how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nature Neuroscience*, 8: 365-371.
- Anisman, H. & Matheson, K. (2005). Stress, depression and anhedonia: Caveats concerning animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29: 525-546.
- Avishai- Eliner, S., Brunson, K. L., Sandman, C. A. & Baram, TZ. (2002). Stressed-out, or in (utero)? *Trends in Neurosciences*, 25: 518-524.
- Azmitia, E. C. (2004). Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis. *Brain Research Bulletin*, 56: 413-424.
- Bakker, J. M., van Bel, F. & Heijnen, C. J. (2001). Neonatal glucocorticoids and the developing brain: short- term treatment with life-long consequences? *Trends in Neuroscience*, 24: 649-653.

- Barbazanges, A., Piazza, P. V., Le Moal, M. & Maccari, S. (1996). Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *Journal of Neuroscience*, *16*: 3943- 3940.
- Binik, Y. M., Deikel, S. M., Theriault, G., Shustack, B. & Balthazard C. (1979). Sudden swimming deaths: cardiac function, experimental anoxia and learned helplessness. *Psychophysiology*, *16*: 381-391.
- Binik, Y. M., Theriault, G. & Shustack B. (1977) Sudden death in the laboratory rat: cardiac function, sensory and experimental factors in swimming deaths. *Psychosomatic Medicine*, *39*: 82-92.
- Brodal, A., Taber, E. & Walberg, F. (1960). The raphe nuclei of the brain stem in the cat. III. Afferent connections. *Journal of Comparative Neurology*, *114*: 261-279.
- Brownstein, M. J. (1981). Serotonin, histamine, and the purines. En: Siegel G.J., Albers, R. W., Agranoff, B. W. & Katzman R. (Eds.). *Basic Neurochemistry* (pp.219-231). Boston: Little, Brown & Company.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A. & Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, *301*: 386-389.
- Ceranik, K., Deng, J., Heimrich, B., Lübke, J., Zhao, S., Förster, E. & Frotscher M. (1999). Hippocampal Cajal-Retzius cells project to the entorhinal cortex: retrograde tracing and intracellular labeling studies. *European Journal of Neuroscience*, *11*: 4278-4290.

- Chalmers, D. T., Kwak, S. P., Mansour, A., Akil, H. & Watson, S. J. (1993). Corticosteroids regulate brain hippocampal 5-HT_{1A} receptor mRNA expression. *Journal of Neuroscience*, *13*: 914-923.
- Chaouloff, F. (1993). Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Research Reviews*, *18*: 1-32.
- Chaouloff, F., Berton, O. & Mormede P. (1999). Serotonin and stress. *Neuropsychopharmacology*, *21*: 28S-32S.
- Chrousos, G.P. (1998). Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptative response, the 1997 Hans Selye memorial lecture. En: Csermaly, P. Ed. Stress of Life, from Molecules to Man. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *851*: 311-335.
- Clancy, B., Darlington, R. B. & Finlay, B. L. (2001). Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, *105*: 7-17.
- D'Aquila, P. S., Brain, P. & Willner, P. (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology & Behavior*, *56*: 861- 867.
- Dahlström, A. & Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiologica Scandinavica*, *62*: (Sup. 232) 13-55.
- De Kloet, E. R., Joëls, M. & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*: 463- 475.

- De Souza, E. B. & Van Loon, G. R. (1986). Brain serotonin and catecholamine responses to repeated stress in rats. *Brain Research*, 367: 77-86.
- Del Río, J. A., Heimrich, B., Borrell, V., Förster, E., Drakew, A., Alcántara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M. & Soriano E. (1997). A role for Cajal -Retzius cells and *reelin* in the development of hippocampal connections. *Nature*, 385: 70-74.
- Dess, N. K. (1992). Divergent responses to saccharin vs. sucrose availability after stress in rats. *Physiology & Behavior*, 52: 115-125.
- Douglas, W. W. (1982). Histamina y 5 hidoxitriptamina (serotonina) y sus antagonistas. En: Gilman, A. G., Goodman, L. S. & Gilman, A. (Eds.). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (pp. 604-639). México D.F.: Editorial Médica Panamericana.
- Erhard, D. & Munro, H. N. (1982). Vitaminas hidrosolubles. Complejo B y ácido ascórbico. En: Gilman, A. G., Goodman, L. S. & Gilman, A. (Eds.). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (pp 1520 - 1558). México D.F.: Editorial Médica Panamericana.
- Fairchild, G., Leitch, M. M. & Ingram, C. D. (2003). Acute and chronic effects of corticosterone on 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*, 45: 925- 934.
- Fernstrom, J. D. (1977). Effects of the diet on brain neurotransmitters. *Metabolism*, 26: 207- 223.
- Fernstrom, J. D. & Hirsch, M. J. (1977). Brain serotonin synthesis: reduction in corn-malnourished rats. *Journal of Neurochemistry*, 28: 877-879.

- Fernstrom, J. D. & Lytle, L. D. (1979). Long-term consumption of low protein corn-based diets: effect on serotonin synthesis in rat brain, and on sensitivity to painful stimuli. En: Levitsky, D. A. (Ed.). *Malnutrition, environment and behavior. New Perspectives* (pp. 78-93). Ithaca & London: Cornell University Press.
- Frazer, A., & Hensler, J. G. (1999). Serotonin. En: Siegel GJ., et al. (Eds). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (pp 263-292)., 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers.
- Gaspar, P., Cases, O. & Maroteaux L. (2003). The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics. *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 1002-1012.
- Gómez-González, B. (2003). Disgénesis cerebral y deficit conductual en un modelo animal experimental de estrés. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Psicología, UNAM.
- Harding, A., Paxinos, G. & Halliday G. (2004). The serotonin and tachykinin systems. En: Paxinos, G. (Ed.). *The rat nervous system*. (pp. 1205-1212). San Diego: Elsevier Academic Press.
- Hatten, M. E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annual Reviews Neuroscience*, 22: 511-539.
- Herman, J. P. & Cullinan WE. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends in Neuroscience*, 20: 78-84.
- Igvy-May, N., Tamir, H. & Gershon, M. D. (1994). Synaptic properties of serotonergic growth cones in developing rat brain. *Journal of Neuroscience*, 14: 1011-1029.

- Jacobs, B. L. & Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, 72: 165-229.
- Janušonis, S. S., Gluncic, V. & Rakic, P. (2004). Early serotonergic projections to Cajal-Retzius cells: Relevance to cortical development. *Journal of Neuroscience*, 24: 1652-1659.
- Jessel, T. M. & Sanes. (2001). Inducción y configuración del sistema nervioso. En: Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. (Eds.). *Principios de neurociencia* (pp: 1019-1040). Madrid: McGraw- Hill Interamericana.
- Kim, J. J. & Diamond, D. M. (2004). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 3: 453-462.
- Kofman, O. (2002). The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26: 457-470.
- Konno, J., Narita, M. & Narita, N. (2004). Migration and differentiation disorder of serotonergic neuron in the embryonic thalidomide/valproic acid exposed autism model rats. Presentado en: 34th Annual Meeting Society for Neuroscience. San Diego. Noviembre 2004.
- Kosten, T., Yang Zang, X. & Kehoe, P. (2004). Infant rats with chronic neonatal isolation experience show decrease extracellular 5-HT levels in striatum at baseline and in response to cocaine. *Developmental Brain Research*, 152: 19-24.
- Kriegstein, A. R. & Noctor, S. C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends in Neuroscience*, 27: 392-397.
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thrivikraman, K. V., Nemeroff, C. B., Meaney, M. J. & Plotsky P. M. (2000). Long-term behavioral and neuroendocrine

adaptations to adverse early experience. *Progress in Brain Research*, 122: 81-103.

Larsen, P.,J., Hay-Schmidt, A., Vrang, N. & Mikkelsen, J. D. (1996). Origin of the projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study. *Neuroscience*, 70: 963-988.

Lehmann, K., Lesting, J., Polascheck, D. & Teuchert-Noodt, G. (2003). Serotonin fibre densities in subcortical areas: differential effects of isolated rearing and methamphetamine. *Developmental Brain Research*, 147: 143-152.

Levine, S. (1994). The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Science*, 746: 275-293.

Lewis, D. A., Hashimoto, T. & Volk, D. W. (2005). Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, 6: 312-324.

Lidov, H. G. & Molliver, M. E. (1982). An histochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Research Bulletin*, 8: 389-430.

Luo, X., Persico, A. M. & Lauder, J. M. (2003). Serotonergic regulation of somatosensory cortical development: Lessons from genetic mouse models. *Developmental Neuroscience*, 25: 173-183.

Lytle, L. D., Messing, R. B., Fisher, L. & Phebus, L. (1975). Effects of long-term corn consumption on brain serotonin and response to electric shock. *Science*, 190: 692-694.

- Marín-Padilla, M. Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. (1998). *Trends in Neuroscience*, 21: 64-71.
- Mazer, C., Muneyyirci, J., Taheny, K., Raio, N., Borella, A. & Whitaker-Azmitia, P. (1997). Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Research*, 760: 68-73.
- McEwen, B. S. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*, 886: 172-189.
- Mikkelsen, J. D., Hay-Schmidt, A. & Kiss, A. (2004). Serotonergic stimulation of the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis: interaction between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. *Annals of the New York Academy of Science*, 1018: 65-70.
- Mirescu, C., Peters, J. D. & Gould, E. (2004). Early life experience alters response to adult neurogenesis to stress. *Nature Neuroscience*, 7: 841-846.
- Moles, A., Rizzi, R. & D'Amato, F. R. (2004). Postnatal stress in mice: Does "stressing" the mother have the same effects as "stressing" the pups? *Developmental Psychobiology*, 44: 230- 237.
- Muneoka, K., Mikuni, M., Ogawa, T., Kitera, K., Kamei, K., Takigawa, M. & Takahashi, K. (1997). Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring. *American Journal of Physiology*, 273: R1669-R1675.
- Narita, N., Kato, M., Tazoe, M., Miyazaki, K., Narita, M. & Okado, N. (2002). Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal

- thalidomide- and valproic acid-exposed rat: Putative animal models for autism. *Pediatric Research*, 52: 576- 579.
- Nishiyama, H., Knöpfel, T., Endo, S. & Itohara, S. (2002). Glial protein S-100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Progress on the National Academy of Sciences*, 99: 4037-4042.
- Paxinos, G. & Watson, C. H. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, 4ta edición.
- Peters, D. A. V. (1990). Maternal stress increases fetal brain and neonatal cerebral cortex 5-hydroxytryptamine synthesis in rats: a possible mechanism by which stress influences brain development. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 35: 943- 947.
- Peters, D. A. V. (1982). Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 17: 721-725.
- Polleux, F. & Antón, E. S. (2005). Neuronal migration in the developing brain. En: Rao, M. S. & Jacobson, M. (Eds.). *Developmental Neurobiology* (pp. 223-239). Nueva York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M. & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266: 730-732.
- Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B., & Sobin, L. H. (1995). *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Registro de Patología de los Estados Unidos de América, Washington D.C.
- Rakic, P. & Verne, S. C. (1995). Cortical development: View from neurological mutants two decades later. *Neuron*, 14: 1101-1104.

- Ringstedt, T., Linnarsson, S., Wagner, J., Lendahl, U., Kokaia, Z., Arenas, E., Ernfors, P. & Ibáñez, C. F. (1998). BDNF regulates reelin expression and Cajal-Retzius cell development in the cerebral cortex. *Neuron*, 21: 305-315.
- Ross, M. E. & Walsh, C. A. (2001). Human brain malformations and their lessons for neuronal migration. *Annual Reviews Neuroscience*, 24: 1041-1070.
- Salín-Pascual, R. J. (2003). *Manual de prescripción de antidepresivos*. México: McGraw-Hill Interamericana .
- Sanes, J. R. & Jessel, T. M. (2001). Desarrollo del sistema nervioso. En: Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. (Eds.). *Principios de neurociencia* (pp: 1019-1039). Madrid: McGraw- Hill Interamericana.
- Schwartz, J. H. (2001). Neurotransmisores. En: Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. (Eds.). *Principios de neurociencia* (pp: 280-297). Madrid: McGraw- Hill Interamericana.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, 138: 32.
- Smythe, J. W., Rowe, W. B. & Meaney, M. J. (1994). Neonatal handling alters serotonin turnover and 5-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Developmental Brain Research*, 80: 183-189.
- Supèr, H., Soriano, E. & Uylings, H. B. M. (1998). The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Research Reviews*, 27: 40-64.

- Sutanto, W., Rosenfeld, P., de Kloet, E. R. & Levine, S. (1996). Long-term effects of neonatal maternal deprivation and ACTH on hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Developmental Brain Research*, 92: 156-163.
- Takahashi, L. K., Kalin, N. D., Barksdale, C. M. & Vanden Burgt, J. A. (1988). Stressor controllability during pregnancy influences Pituitary-adrenal hormone concentrations and analgesic responsiveness in offspring. *Physiology and Behavior*, 42: 323-329.
- Tecott, L., Shtrom, S. & Julius, D. (1995). Expression of a serotonin-gated ion channel in embryonic neural and nonneural tissues. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 6: 43-55.
- Thomas, R. G. & Wyszor, W. G. (1967). Alteration of serotonin metabolism in rats deficient in niacin and tryptophan. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 126: 374-377.
- Ueda, S., Hou, X. P., Whitaker-Azmitia, P. M. & Azmitia E. C. (1994). Neuroglial interaction in the S-100 β retarded mutant mouse (Polydactyly Nagoya). II. Co-cultures study. *Brain Research*, 633: 284-288.
- Van Eldik, L. J. & Wainwright, M. S. (2003). The Janus face of glial-derived S100B: Beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 21: 97-108.
- Vitalis, T. & Parnavelas, J. G. (2003). The role of serotonin in early cortical development. *Developmental Neuroscience*, 25: 245-256.
- Wallace, J. A. & Lauder, J. M. (1983). Development of serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Research Bulletin*, 10: 459-479.

- Weinstock, M., Fride, E. & Hertzberg, R. (1988). Prenatal stress effects on functional development of the offspring. *Progress in Brain Research*, 73: 319-331.
- Wadhwa, P. D., Sandman, C. A. & Garite, T. J. (2001). The neurobiology of stress in human pregnancy: implications for prematurity and development of the fetal central nervous system. *Progress in Brain Research*, 133: 131- 142.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (1991). Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: Basis for developmental pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43: 553-561.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (2001). Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin*, 56: 479-485.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Clarke, C. & Azmitia, E. C. (1993). Localization of 5-HT_{1A} receptors to astroglial cells in adult rats: Implications for neuronal-glia interactions and psychoactive drug mechanism of action. *Synapse*, 14: 201-205.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Druse, M., Walker, P. & Lauder, J. M. (1996). Serotonin as a developmental signal. *Behavioural Brain Research*, 73: 19-29.
- Wilson, C. C., Faber, K. M. & Haring, J. H. (1998). Serotonin regulates synaptic connections in the dentate molecular layer of adult rats via 5-HT_{1A} receptors: evidence for a glial mechanism. *Brain Research*, 782: 235-239.
- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S. & Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress,

and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93: 358- 364.

Willner, P., Muscat, R. & Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16: 525- 534.