



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

“La derrota social crónica como un modelo animal útil en el estudio de la depresión inducida por la exposición crónica al estrés durante la adolescencia temprana: Caracterización de sus efectos en el corto y en el largo plazo”

T E S I S

Que presenta:

M. en C. Héctor Miguel Mancha Gutiérrez

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de Tesis: Dra. Carolina López Rubalcava

Ciudad de México

Junio, 2022

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca que me fue otorgada con el número 485970 y con el proyecto SEP-CINVESTAV No. 141 otorgado a la Dra. Carolina López Rubalcava.

DEDICATORIA

Al amor de mi vida **María Elena López Pacheco.**

Por tu amor, tu ternura, tu dedicación, tu paciencia y tu apoyo para alcanzar este objetivo. Por la paz que transmites a mi mente y mi corazón. Porque sacas lo mejor de mí y me ayudas a ser un mejor ser humano. Por el inmenso y maravilloso amor que me haces sentir. Porque la historia de mi vida es una antes y otra completamente diferente después de ti. Te amo de sobremanera amor de mi vida.

A mi pedacito de cielo **Ethan Emanuel Mancha López.**

Por ser mi inspiración y la razón de mi existencia. Por llenarme de amor e inmensa felicidad. Porque que complementas mi vida, mi ser y mi alma. Porque simplemente eres lo mejor de mi vida. Te amo inmensamente mi bebé hermoso.

A mis padres **María de Lourdes Gutiérrez Cisneros y Martin Mancha Rivera.**

Por su amor y su apoyo incondicional. Por ser los mejores padres y darme las herramientas para poder crecer y desarrollarme en todos los aspectos de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a la **Dra. Carolina López Rubalcava** por aceptarme para ser parte de su grupo de trabajo, darme la libertad de explorar y plantear el proyecto desde cero, por aconsejarme y por apoyarme en todo momento durante el desarrollo de éste.

A mi sínodo, la Dra. Erika Estrada Camarena, la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo, la Dra. Lucia Alba Martínez Mota, y al Dr. Alonso Fernández Guasti por todas y cada una de las aportaciones que enriquecieron este trabajo.

Especialmente, agradezco a la técnico **María Isabel Beltrán Villalobos** por el apoyo brindado dentro y fuera del laboratorio, por su gran calidad como persona, calidez, cariño y sobre todo por su amistad.

Al químico José Juan Cruz Martín por ser de gran apoyo en todo momento para el desarrollo de mi trabajo de investigación.

A todos los profesores que han sido parte de este largo y que han contribuido de manera significativa en mi formación académica, en mi desarrollo profesional y en mi crecimiento personal. Por enseñarme que la dedicación rinde frutos, siendo mejores si se tiene pasión por lo que se hace.

Muchas gracias.

Índice general

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN	IV
SUMMARY.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LA DEPRESIÓN.....	1
1.2 LA ADOLESCENCIA.....	2
1.2.1 <i>El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.....</i>	<i>3</i>
1.2.2 <i>El estrés y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.....</i>	<i>5</i>
1.3 INTERACCIÓN ENTRE LOS EJES ADRENAL Y GONADAL.....	9
1.4 ADOLESCENCIA, ESTRÉS Y DEPRESIÓN.....	12
1.5 LA DERROTA SOCIAL CRÓNICA	14
1.6 EL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA.....	16
2. JUSTIFICACIÓN.....	18
3. HIPÓTESIS.....	19
4. OBJETIVO GENERAL.....	19
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 ANIMALES.....	20
6.2 DERROTA SOCIAL CRÓNICA.....	21
6.3 PRUEBAS CONDUCTUALES.....	22
6.3.1 <i>Prueba de interacción social.....</i>	<i>22</i>
6.3.2 <i>Prueba de nado forzado.....</i>	<i>23</i>
6.3.3 <i>Laberinto de Barnes.....</i>	<i>24</i>
6.4 AUTORADIOGRAFÍAS DE SERT.....	26
6.5 INMUNOENSAYO DE HORMONAS SÉRICAS.....	27
6.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
6.6.1. <i>Experimento 1. Los objetivos de este experimento fueron estandarizar el modelo de DSC en ratones adolescentes.....</i>	<i>28</i>
6.6.2. <i>Experimento 2. El objetivo de este experimento fue determinar si la DSC durante la adolescencia temprana era capaz de inducir las conductas tipo depresión.....</i>	<i>28</i>
6.6.3. <i>Experimento 3. El objetivo de este experimento fue determinar si el aislamiento social y la desesperanza inducidas por la DSC durante la adolescencia se correlacionan con alteraciones en la densidad del SERT en la PFC y el hipocampo tanto en el corto como en el largo plazo.....</i>	<i>29</i>
6.6.4. <i>Experimento 4. El objetivo de este experimento fue determinar si la DSC durante la adolescencia temprana era capaz de inducir alteraciones en el aprendizaje y la memoria visuoespacial tanto en el corto como en el largo plazo.....</i>	<i>29</i>
6.6.5. <i>Experimento 5. El objetivo de este experimento fue evaluar la concentración sérica de corticosterona y testosterona antes, durante y después de la DSC.....</i>	<i>30</i>
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
8. RESULTADOS.....	31
8.1. EXPERIMENTO 1.....	31

8.2.	EXPERIMENTO 2.....	32
8.3.	EXPERIMENTO 3.....	34
8.4.	EXPERIMENTO 4.....	38
8.5.	EXPERIMENTO 5.....	47
9.	<i>DISCUSIÓN</i>	51
10.	<i>CONCLUSIONES</i>	68
11.	<i>PERSPECTIVAS</i>	70
12.	<i>REFERENCIAS</i>	72
	ANEXO I: SELECCIÓN DE RATONES AGRESORES DEL PROTOCOLO DE DERROTA SOCIAL CRÓNICA.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Clasificación de Tanner	3
Fig. 2. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-gónada	5
Fig. 3. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	7
Fig. 4. Esquema que demuestra la interacción recíproca entre los ejes HHA e HHG ...	11
Fig. 5. Fases de la derrota social crónica	14
Fig. 6. Material utilizado en el modelo de DSC	21
Fig. 7. Arena de interacción social y sus partes	22
Fig. 8. Prueba de nado forzado en ratones macho adolescentes SW	23
Fig. 9. Laberinto de Barnes	25
Fig.10. Esquema de las fases de adquisición y retención del laberinto de Barnes.	25
Fig.11. Efectos de la DSC durante la adolescencia sobre la prueba de interacción social, utilizando como ratón desconocido a un ratón agresor y de mayor edad o a un ratón no agresor y de la misma edad.....	31
Fig.12. Trazo representativo del recorrido realizado dentro de la arena de interacción social por un ratón control y un ratón derrotado cuando el ratón desconocido estuvo presente dentro de la jaula de alambre	32
Fig.13. Efectos de la DSC durante la adolescencia sobre la prueba de interacción social, tanto en ratones adolescentes como en ratones adultos.....	33
Fig.14. Efectos de la DSC durante la adolescencia sobre las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento en la prueba de nado forzado, tanto en ratones adolescentes como en ratones adultos.....	34
Fig. 15. Efectos de la DSC durante la adolescencia sobre la densidad del SERT en la PFC, el hipocampo dorsal y el hipocampo ventral, tanto en ratones adolescentes como adultos..	35
Fig. 16. Autorradiografías representativas de la PFC, el hipocampo dorsal y el hipocampo ventral de ratones adolescentes y adultos.	35
Fig. 17. Correlación entre la densidad del SERT en el hipocampo dorsal y la tasa de interacción social o la conducta de inmovilidad en ratones adolescentes. Correlación entre la densidad del SERT en el hipocampo ventral y la tasa de interacción social o la conducta de inmovilidad en ratones adolescentes	37
Fig. 18. Correlación entre la densidad del SERT en el hipocampo dorsal y la tasa de interacción social o la conducta de inmovilidad en ratones adultos. Correlación entre la densidad del SERT en el hipocampo ventral y la tasa de interacción social o la conducta de inmovilidad en ratones adultos.	38
Fig. 19. Efectos de la DSC durante la adolescencia temprana sobre la latencia primaria y el número de errores durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes en ratones adolescentes.....	39
Fig. 20. Efectos de la DSC durante la adolescencia temprana sobre la latencia primaria y el número de errores durante la fase de retención del laberinto de Barnes en ratones adolescentes.....	40
Fig. 21. Efectos de la DSC durante la adolescencia temprana sobre la latencia primaria y el número de errores durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes en ratones adultos	41

Fig. 22. Efectos de la DSC durante la adolescencia temprana sobre la latencia primaria y el número de errores durante la fase de retención del laberinto de Barnes en ratones adultos	41
Fig. 23. Gráfico para el análisis del desempeño de los ratones durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes	42
Fig. 24. Trazo representativo del recorrido realizado por un ratón con un desempeño eficiente, deficiente, deficiente con tendencia a la hiperactividad o deficiente con tendencia a la inmovilidad, durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes.	43
Fig. 25. Categorización del desempeño presentado por lo ratones adolescentes, control y derrotados, durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes.....	44
Fig. 26. Categorización del desempeño presentado por lo ratones adultos, control y derrotados, durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes	45
Fig. 27. Categorización del desempeño presentado por lo ratones control, adolescentes y adultos, durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes	46
Fig. 28. Categorización del desempeño presentado por lo ratones derrotados, adolescentes y adultos, durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes	46
Fig. 29. Concentración sérica de corticosterona antes, durante y después de la exposición a la DSC y el área bajo la curva de este grafico	47
Fig. 30. Regresión lineal entre la concentración sérica de corticosterona y la edad de los ratones control y derrotados.....	48
Fig. 31. Concentración sérica de testosterona antes, durante y después de la exposición a la DSC y el área bajo la curva de este grafico.	49
Fig. 32. Regresión lineal entre la concentración sérica de testosterona y la edad de los ratones control y derrotados.	50
Fig. 33. Correlación entre las concentraciones séricas de testosterona y corticosterona en ratones control y en ratones derrotados.	51
Fig. 34. Propuesta de la ontogenia del SERT durante la transición de adolescencia a edad adulta después de la exposición a la DSC durante la adolescencia temprana.....	55
Fig. 35. Esquema que muestra la inhibición central y periférica inducida por la corticosterona sobre la actividad del eje HHG	64
Fig. 36. Esquema que muestra la inhibición central y periférica inducida por la testosterona sobre la actividad del eje HHA	67

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ANOVA	Análisis de varianza
AR	Receptores a andrógenos
ARC	Núcleo arcuato del hipotálamo
AVP	Arginina vasopresina
BST	Núcleo de la estría terminal
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DHT	Dihidrotestosterona
DMH	Hipotálamo dorsomedial
DMN	Núcleo dorsomedial del hipotálamo
DO	Densidad óptica
DRN	Núcleo dorsal del rafe
DSC	Derrota social crónica
FSH	Hormona folículo estimulante
FST	Prueba de nado forzado
GABA	Ácido-Gamma-Aminobutírico
GnIH	Hormona inhibidora de gonadotropinas
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GR	Receptor glucocorticoide
HHA	Eje hipotálamo-Hipófisis-Adrenal
HHG	Eje hipotálamo-Hipófisis-Gónada
HL	Hipotálamo lateral
ISRS	Inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LH	Hormona luteinizante
mGR	Receptores a glucocorticoides metabotrópicos
MR	Receptor mineralocorticoide
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
PFC	Corteza prefrontal
PND	Día postnatal
POA	Área preóptica
PVN	Núcleo paraventricular
SERT	Transportador de serotonina
SIT	Prueba de interacción social
SNC	Sistema Nervioso Central
SW	Swiss Webster

RESUMEN

La exposición crónica al estrés durante la adolescencia es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la depresión. La derrota social crónica (DSC) es un modelo animal de depresión con validez etiológica, predictiva, discriminativa y aparente. Sin embargo, la DSC no se ha examinado a fondo como un modelo de depresión inducida por el estrés dentro de la adolescencia. Por lo tanto, decidimos evaluar los efectos (de corto y de largo plazo) inducidos por la DSC durante la adolescencia temprana sobre el desarrollo de conductas tipo depresión, la densidad del transportador de serotonina (SERT) y sobre las concentraciones séricas de corticosterona y testosterona durante la transición de adolescencia a edad adulta.

Para hacer esto, ratones macho adolescentes (día posnatal-DPN28) de la cepa Swiss Webster (SW) fueron expuestos a diez días consecutivos de DSC (DPN28-37). Veinticuatro horas (adolescencia media) o cuatro semanas (edad adulta) después de la DSC se formaron grupos independientes que fueron evaluados de la siguiente forma: 1) prueba de interacción social (DPN39 o 67) y la prueba de nado forzado (DPN40 o 68), 2) prueba de interacción social (DPN39 o 67), prueba de nado forzado (DPN 40 o 68) y obtención de cerebros para determinación de la densidad del SERT por autoradiografía (DPN41 o 69) y, 3) laberinto de Barnes (del DPN39 al 50 o del DPN67 al 78). Además, grupos independientes de ratones fueron sacrificados a intervalos de cinco días antes, durante y después de la DSC (del DPN25 al 65) para obtener sangre troncal y realizar inmunoensayos de hormonas séricas (corticosterona y testosterona).

La DSC durante la adolescencia temprana provocó: 1) tanto en la adolescencia media como en la edad adulta, una reducción significativa en la tasa de interacción social (evitación social) en la prueba de interacción social y un aumento significativo en la conducta de inmovilidad (desesperanza conductual) en la prueba de nado, 2) en la adolescencia media los ratones con las conductas tipo depresión más evidentes presentaron las densidades más elevadas del SERT en el hipocampo, por el contrario, en la edad adulta los ratones con las conductas tipo depresión más evidentes presentaron las densidades más bajas del SERT en el hipocampo, 3) tanto en la adolescencia como en la edad adulta, aumentos significativos en la latencia primaria y el número de errores, así como un pobre desempeño durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes y, 4) un incremento significativo en la concentración sérica de corticosterona durante la adolescencia media y la edad adulta y una reducción significativa en la concentración sérica testosterona de la adolescencia media a la adolescencia tardía.

En general, nuestros resultados evidencian que la DSC durante la adolescencia temprana provocó conductas tipo depresión y déficits cognitivos de larga duración. Además, las conductas tipo depresión se correlacionaron de forma dependiente de la edad con la densidad del SERT en el hipocampo. Finalmente, en los ratones derrotados encontramos un incremento en la concentración sérica de corticosterona a la par de una reducción en la concentración sérica de testosterona durante la transición de adolescencia a edad adulta, resaltando la vulnerabilidad de los ejes hipotálamo-hipófisis-adrenal e hipotálamo-hipófisis-gónada al estrés crónico durante esta etapa de la vida y enfatizando la importancia de una adecuada interacción entre ambos ejes durante la adolescencia para el desarrollo normal del cerebro y la conducta.

SUMMARY

Chronic stress exposure during adolescence is a significant risk factor for the development of depression. Chronic social defeat (CSD) is an animal model of depression with excellent ethological, predictive, discriminative, and face validity. However, CSD has not been thoroughly examined as a model of stress-induced depression within the adolescent stage. Therefore, we decided to assess the effects (both short-term and long-term) induced by CSD during early adolescence on the development of depression-like behaviors, serotonin transporter (SERT) density, and serum concentrations of corticosterone and testosterone during the transition from adolescence to adulthood.

Therefore, adolescent male Swiss Webster mice (SW) on postnatal day-DPN28 were exposed to ten consecutive days of CSD (DPN28-37). Twenty-four hours (middle adolescence) or four weeks (adulthood) after CSD, independent groups of mice were tested in: 1) social interaction test (DPN39 or 67) and forced swimming test (DPN40 or 68); 2) social interaction test (PND39 or 67), forced swimming test (PND 40 or 68) and brain extraction for SERT density determination by autoradiography (PND41 or 69) and 3) Barnes maze (from DPN39 to 50 or from DPN67 to 78). In addition, independent groups of mice were euthanized at 5-day intervals before, during, and after CSD (from DPN25 to 65) to obtain trunk blood and perform serum hormone (corticosterone and testosterone) immunoassays.

The CSD during early adolescence induced 1) a significant reduction in the rate of social interaction (social avoidance) in the social interaction test and a significant increase in the immobile behavior (behavioral despair) in the forced swim test in both mid-adolescence and adulthood; 2) in the mid-adolescence defeated mice with the most evident depression-like behaviors showed the highest SERT densities in the hippocampus, in contrast, in the adulthood defeated mice with the most evident depression-like behaviors showed the lowest SERT densities in the hippocampus; 3) defeated mice showed a significant increases in both primary latency and number of errors, as well as a poor performance during the acquisition phase of the Barnes maze in both adolescence and adulthood and, 4) the CSD during early adolescence induced a significant increase in serum corticosterone levels during mid-adolescence and adulthood and a significant decrease in serum testosterone levels from mid- to late adolescence.

Overall, our results show that CSD during early adolescence caused long-lasting depression-like behaviors and enduring cognitive deficits. Moreover, depression-like behaviors were age-dependent correlated with alterations in SERT density in the hippocampus. Finally, in defeated mice we found an increase in serum corticosterone levels in lockstep to a decrease in serum testosterone levels during the transition from adolescence to adulthood, highlighting the vulnerability of the hypothalamus-pituitary-adrenal and hypothalamus-pituitary-gonad axes to chronic stress at this life stage and accenting the importance of an adequate interaction between both axes during adolescence for normal development of brain and behavior.

1. Introducción.

1.1 La depresión.

La depresión es un trastorno psiquiátrico crónico, complejo, heterogéneo y multifactorial que afecta alrededor de 120 millones de personas en todo el mundo (Kessler and Bromet, 2013). Este trastorno psiquiátrico se caracteriza por síntomas afectivos como un estado de ánimo deprimido, anhedonia y sentimientos de culpa o baja autoestima; alteraciones conductuales como el aislamiento social y la desesperanza; y síntomas somáticos como insomnio y fatiga crónicos (American Psychiatric Association, 2013). Además de esto, las personas con depresión también experimentan déficits cognitivos como alteraciones en el aprendizaje, la memoria y la función ejecutiva, los cuales pueden estar presentes desde el inicio de la depresión (Miskowiak et al., 2016; Papp et al., 2017).

A menudo, la depresión inicia en etapas tempranas de la vida como la adolescencia y en estos casos tiende a convertirse en un trastorno crónico, recurrente y con grandes repercusiones dentro del entorno familiar, social, laboral y económico de las personas que la padecen (Paus et al., 2008; Thapar et al., 2012). Además, la depresión que se inicia en la adolescencia se asocia con una mayor severidad de los síntomas, un bajo rendimiento escolar, un pobre funcionamiento social (con un mayor índice de problemas legales, embarazos a temprana edad y desempleo) y se asocia con el desarrollo de otros trastornos psiquiátricos como ansiedad, adicciones, trastorno bipolar y comportamiento suicida (Lewinsohn et al., 2000; Cullen et al., 2009). Entre la población adolescente, la depresión tiene una prevalencia del 4 al 20% (Richardson and Katzenellenbogen, 2005; Costello et al., 2006; Birmaher and Brent, 2007; Cullen et al., 2009; Thapar et al., 2012). Clínicamente, la irritabilidad puede presentarse como un síntoma principal de la depresión entre los adolescentes, además, el aislamiento social, la labilidad emocional y la baja tolerancia a la frustración también son características clínicas de depresión en esta población (Thapar et al., 2012; McCormick and Green, 2013).

1.2 La adolescencia.

La adolescencia es la etapa de transición entre la infancia y la vida adulta, se caracteriza por grandes cambios a nivel hormonal, somático y conductual, así como un continuo proceso de neurodesarrollo, que en conjunto conducen a la eficiencia reproductiva y a la madurez tanto social como cognitiva del individuo (De Kloet et al., 2005; Lupien et al., 2009; Holder and Blaustein, 2014). En los humanos, la adolescencia va de los 10 a los 18 años aproximadamente. A menudo los términos pubertad y adolescencia se utilizan de forma indiscriminada, sin embargo, es importante resaltar que la pubertad se refiere a la etapa en la que ocurre la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) y culmina con la maduración gonadal; mientras que la adolescencia, es un periodo amplio que va desde el inicio de la pubertad y termina al alcanzar la madurez sexual y los rasgos neuroconductuales característicos del adulto (Sisk and Foster, 2004; Eiland and Romeo, 2013; Holder and Blaustein, 2014). En general, las mujeres inician la pubertad entre los 10-11 años, y la terminan entre los 15-16 años; los hombres tienen un inicio más tardío de la pubertad entre los 11-12 años, y la terminan entre los 16-17 años. En los humanos, las características biológicas que determinan el inicio de la adolescencia y, en consecuencia, de la pubertad han sido estudiadas y categorizadas dentro de la clasificación de Tanner (Fig. 1A y B). Sin embargo, las características biológicas que determinan el final de la adolescencia son bastante imprecisas, estas características incluyen el desarrollo de ciertas áreas límbicas y corticales del cerebro (Holder and Blaustein, 2014).

En ratones, la adolescencia abarca de los 21 a los 60 días posnatales (DPN) (Lupien et al., 2009; Eiland and Romeo, 2013; Holder and Blaustein, 2014). De manera similar a lo observado en humanos, las hembras inician la pubertad de forma temprana a los 26 DPN, mientras que en los machos el inicio de la pubertad se presenta de forma tardía a los 30 DPN (Bell, 2018). En los ratones macho las características biológicas que determinan el inicio de la pubertad incluyen la presencia de espermatozoides maduros en el epidídimo, la separación prepucial y el incremento de la testosterona sérica (Holder and Blaustein, 2014; Bell, 2018). Sin embargo, la presencia de espermatozoides maduros y la separación prepucial pueden variar entre las distintas

cepas de ratones estudiadas o incluso pueden presentarse de forma prematura. Por el contrario, el incremento de la testosterona sérica es más constante entre las distintas cepas de ratones estudiadas e inicia alrededor de los 30 DPN, alcanzando su punto máximo cerca de los 40 DPN y estabilizándose a los 60 DPN (Bell, 2018). Por lo tanto, la testosterona sérica es un indicador más preciso del inicio de la pubertad y adolescencia en ratones macho. Tanto en humanos como en roedores, el incremento de la testosterona sérica es uno de los principales cambios hormonales presentados durante la adolescencia y está directamente relacionado con la actividad del eje HHG.

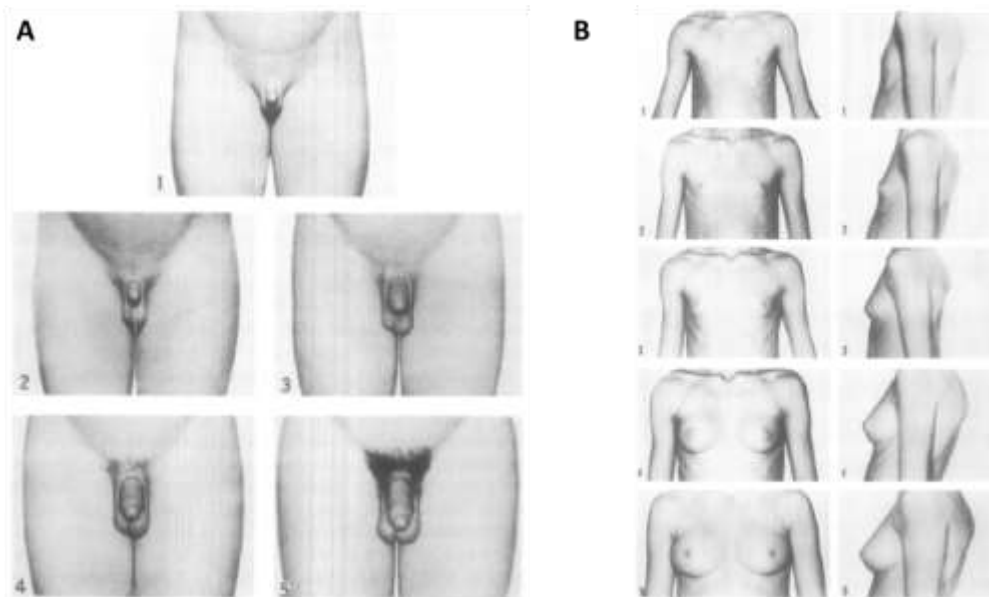


Fig. 1. Clasificación de Tanner. Categorías de maduración y/o desarrollo genital en hombres (A) y de las mamas en mujeres (B). Modificado de Tanner (Tanner, 1986).

1.2.1 El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.

El eje HHG es el responsable de la competencia reproductiva, ya que su activación promueve el crecimiento y la maduración de los gametos, así como la síntesis y liberación de hormonas gonadales, estradiol en hembras y testosterona en machos (Romeo, 2010; Oyola and Handa, 2017). El eje HHG conduce y dirige la competencia reproductiva a través de interacciones entre el hipotálamo y la adenohipófisis (Fig. 2). Primero, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es sintetizada por neuronas GnRH hipotalámicas (localizadas en el área preóptica-POA) y liberada hacia el sistema circulatorio porta hipofisiario de manera pulsátil y regular (cada 20-120 minutos) (Oyola

and Handa, 2017; McCosh et al., 2019). El mecanismo neuronal que genera los pulsos sobre las neuronas GnRH y, en consecuencia, guía y controla la actividad del eje HHG está conformado por una población de neuronas localizadas en el núcleo arcuato del hipotálamo (ARC), fuera del POA, que expresan los neuropéptidos kisspeptina, neuroquinina B y dinorfina (McCosh et al., 2019; Zavala et al., 2020). La kisspeptina liberada por estas neuronas actúa sobre su receptor acoplado a una proteína G_q localizado en los somas y en los axones terminales de las neuronas GnRH, para estimular la síntesis y liberación de GnRH hacia el sistema circulatorio porta hipotálamo-hipófisis (Acevedo-Rodríguez et al., 2018; Iwasa et al., 2018; McCosh et al., 2019; Tsutsui and Ubuka, 2020). Segundo, la GnRH actúa sobre los gonadotropos presentes en la adenohipófisis y a través de su receptor acoplado a una proteína G_q favorece la liberación pulsátil por exocitosis de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) hacia la circulación sistémica (Oyola and Handa, 2017). Tercero, en el testículo la LH se une a su receptor acoplado a proteína G_s que se localiza en las células de Leydig para estimular la síntesis de testosterona y la FSH se une a su receptor acoplado a proteína G_s que se expresa predominantemente en las células de Sertoli para estimular la maduración de los espermatozoides (Oyola and Handa, 2017). Por último, la testosterona es liberada hacia la circulación sistémica y se encarga de regular la actividad del eje HHG mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, actuando sobre receptores localizados en las neuronas GnRH hipotalámicas, así como en los gonadotropos hipofisarios.

Otro mecanismo que regula de forma negativa al eje HHA es llevado a cabo por neuropéptidos hipotalámicos como la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH), la cual suprime la síntesis y liberación de GnRH y LH al unirse a su receptor acoplado a proteína G_i , localizado en las neuronas GnRH del hipotálamo y en los corticotropos de la adenohipófisis, respectivamente (Iwasa et al., 2018; Tsutsui and Ubuka, 2020). Las neuronas GnIH se localizan exclusivamente en el núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMN), de forma interesante, estas neuronas envían proyecciones hacia el POA y el ARC, en donde se localizan las neuronas GnRH y kisspeptina, respectivamente (Acevedo-Rodríguez et al., 2018; Tsutsui and Ubuka, 2020). A través de estas

proyecciones, la GnIH es capaz inhibir la actividad de estas dos poblaciones de neuronas y, por ende, regular a la baja la actividad del eje HHG.

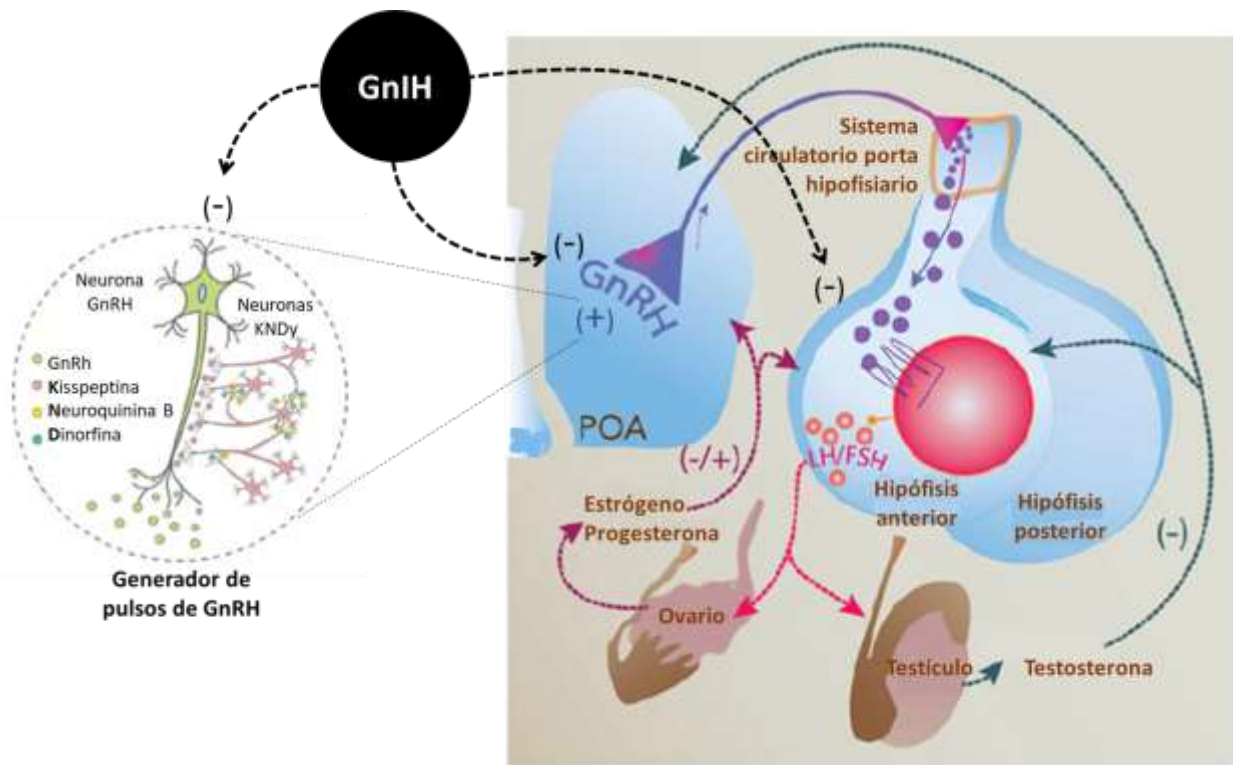


Fig. 2. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Modificado de Oyola y Zavala (Oyola and Handa, 2017; Zavala et al., 2020). GnRH: hormona liberadora de gonadotropina; GnIH: hormona inhibidora de gonadotropina; POA: área preóptica; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona foliculo estimulante.

1.2.2 El estrés y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

Otra modificación hormonal que sucede en los hombres y roedores macho durante la adolescencia es el cambio en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). El eje HHA es el responsable de orquestar la respuesta al estrés. El estrés puede ser definido como cualquier desafío a la homeostasis de un organismo, que representa una amenaza real y/o potencial que requiere cambios inmediatos en el comportamiento del organismo, así como la modificación de los comportamientos futuros (Steckler, 2005; Joëls and Baram, 2009). Los estresores son eventos en el medio interno y/o externo del organismo, que son censados e interpretados por el organismo como una amenaza real y/o potencial y, son capaces de provocar una respuesta (Steckler, 2005; Godoy et al., 2018). Los estresores se clasifican como físicos y psicológicos. Los estresores físicos (también conocidos como sistémicos) son

eventos que producen alteraciones reales del estado fisiológico de un organismo que superan los mecanismos homeostáticos e inician una respuesta que es en gran medida refleja, esta respuesta puede desencadenarse incluso sin la percepción consciente del evento (Dayas et al., 2001; Myers et al., 2012). Los estresores psicológicos son eventos que predicen adversidad y pueden iniciar una respuesta incluso en ausencia de una alteración fisiológica, esta capacidad para anticipar la adversidad depende en gran medida de la experiencia previa del organismo ya que la información percibida debe ser interpretada y contrastada con un marco de referencia previo (Dayas et al., 2001; Myers et al., 2012). La respuesta al estrés se caracteriza por la liberación de glucocorticoides y se integra por componentes fisiológicos, conductuales, cognitivos, autónomos, endocrinos e inmunitarios, que tienen por objetivo recuperar la homeostasis y promover la adaptación del organismo (Steckler, 2005; Myers et al., 2012; Godoy et al., 2018). Por último, todo el esfuerzo que un organismo emplea para restaurar la homeostasis, después de la exposición a un estresor, se denomina alostasis (Hurtubise and Howland, 2017).

Ante un estresor, ya sea físico o psicológico, diferentes áreas cerebrales son activadas de forma coordinada para reclutar al hipotálamo (Fig. 3), una estructura compleja compuesta de varios sub núcleos, dentro de los cuales se encuentra el núcleo paraventricular (PVN) que es el responsable de iniciar la respuesta al estrés (Myers et al., 2012; Godoy et al., 2018). Las neuronas localizadas en el PVN sintetizan tres diferentes compuestos neuroquímicos que pueden funcionar como neurotransmisores u hormonas, la oxitocina, la arginina-vasopresina (AVP) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Vale et al., 1981; Sawchenko et al., 1996; Joëls and Baram, 2009). Las neuronas CRH del PVN proyectan hacia los vasos sanguíneos de la eminencia media en donde liberan CRH y AVP, que son los principales secretagogos de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) (Myers et al., 2012). Ante un estresor, las concentraciones de ambos secretagogos incrementan considerablemente dentro del sistema circulatorio porta hipotálamo-hipófisis (Tsigos and Chrousos, 2002). Este sistema circulatorio irriga a la adenohipófisis, en donde CRH y AVP interactúan para estimular la síntesis y la liberación de ACTH por parte de los corticotropos (Vale et al., 1981; Joëls and Baram, 2009). Finalmente, la ACTH es liberada a la circulación

sistémica para alcanzar la zona fasciculada de la corteza adrenal, en donde induce la síntesis y la liberación de glucocorticoides (Herman et al., 2003; Ulrich-Lai and Herman, 2009).

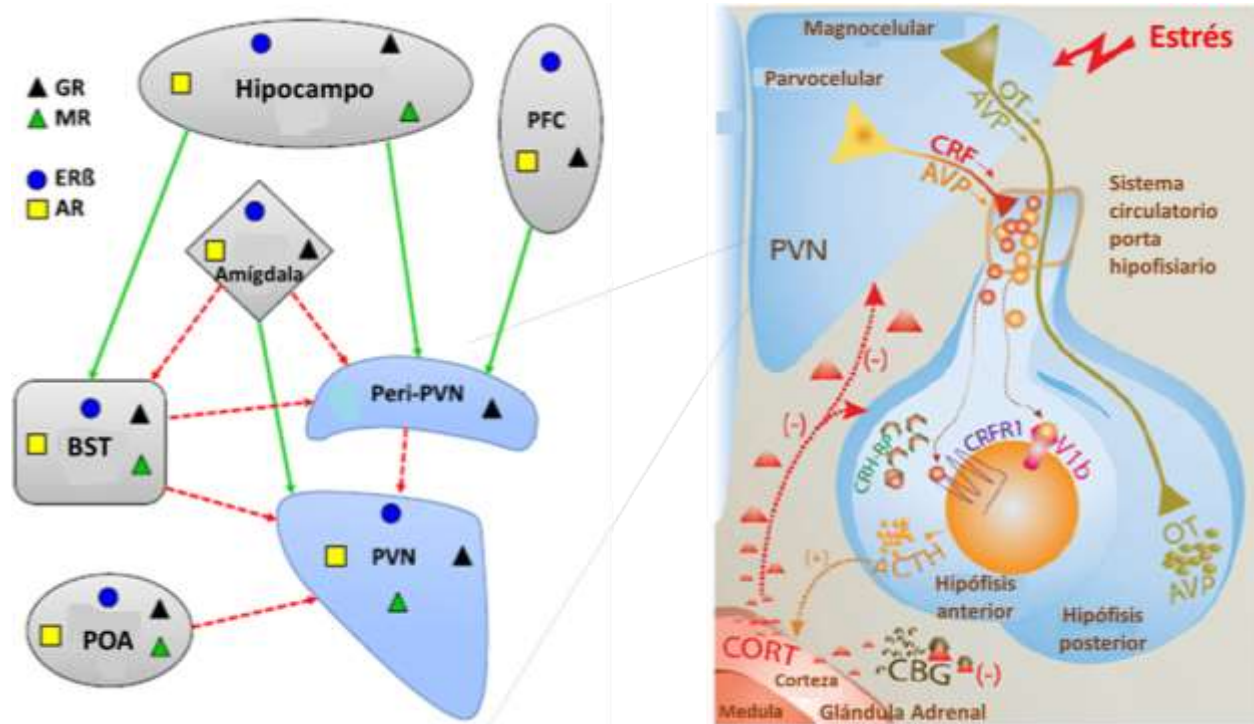


Fig. 3. Esquema del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal. Tomado de Oyola (Oyola and Handa, 2017). BST: núcleo de la estría terminal; POA: área preóptica; AMY: amígdala; PFC: corteza prefrontal; PVN: núcleo paraventricular; proyecciones glutamatérgicas (flechas verdes) y GABAérgicas (flechas rojas).

El principal glucocorticoide en humanos es el cortisol y su equivalente en roedores es la corticosterona. Cortisol y/o corticosterona ejercen sus efectos dentro del SNC mediante la unión a dos tipos de receptores, el receptor a glucocorticoides (GR) y el receptor a mineralocorticoides (MR) (Reul and De Kloet, 1985; De Kloet et al., 2005). Estos receptores actúan como factores de transcripción dependientes de ligando, por lo que regulan la expresión de cientos de genes, aunque también se ha descrito que actúan a través de mecanismos rápidos no genómicos (Groeneweg et al., 2012; Joels et al., 2012; Merkulov et al., 2017; Goncharova et al., 2019). La afinidad de estos receptores por los glucocorticoides y su distribución dentro del SNC, son características que determinan la regulación de la homeostasis del eje HHA en condiciones basales y durante la respuesta al estrés (Godoy et al., 2018). El MR tiene una afinidad 10 veces mayor por corticosterona que el GR y su localización se restringe a ciertas áreas del

sistema límbico como la PFC y el hipocampo, dos áreas clave implicadas en el mecanismo de retroalimentación negativa del eje HHA; mientras que los GR se localizan prácticamente en todo el SNC, aunque se expresan mayormente en las neuronas PVN hipotalámicas y en los corticotropos de la adenohipófisis (Reul and De Kloet, 1986; Kitchener et al., 2004; De Kloet et al., 2005; Goncharova et al., 2019). A través de estos receptores los glucocorticoides son capaces de modular la respuesta al estrés. En condiciones fisiológicas los niveles séricos de glucocorticoides siguen un ritmo de liberación circadiano, en los humanos la secreción máxima de cortisol ocurre durante la madrugada y las primeras horas del día, mientras que en los roedores la secreción máxima de corticosterona sucede al principio de la tarde debido a que son animales nocturno (De Kloet and Sarabdjitsingh, 2008; Godoy et al., 2018).

El circuito neuronal que regula la actividad del PVN es altamente complejo, se compone de aferencias mono y polisinápticas provenientes de diferentes regiones límbicas y del cerebro anterior. La actividad de las neuronas CRH del PVN está regulada por el ácido gama-aminobutírico (GABA), que es el neurotransmisor inhibitorio dominante en el hipotálamo (Gunn et al., 2015). La gran mayoría de las aferencias GABAérgicas hacia el PVN se originan a partir de núcleos hipotalámicos locales como los núcleos peri-PVN, el hipotálamo dorsomedial (DMH), el hipotálamo anterior, el hipotálamo lateral (HL), el núcleo arcuato (ARC) y el área preóptica (POA), así como de regiones de la amígdala extendida, como el núcleo de la base de la estría terminal (BST) (Myers et al., 2012; Gunn et al., 2015). Estructuras límbicas y del cerebro anterior, como el hipocampo (subículo ventral), el septum, la mPFC y la amígdala, también ejercen una influencia significativa sobre la actividad de las neuronas CRH del PVN, sin embargo, estas estructuras tienen muy pocas o nulas proyecciones directas hacia en PVN. En su lugar, estas estructuras límbicas y del cerebro anterior envían proyecciones excitatorias (glutamatérgicas) hacia los diferentes núcleos GABAérgicos, como los núcleos peri-PVN y el BST, que funcionan como centros de relevo e incrementan el tono inhibitorio hacia las neuronas CRH del PVN (Myers et al., 2012; Gunn et al., 2015).

Las evidencias sugieren que los MR, debido a su gran afinidad por los GC, participan en el mantenimiento de la actividad basal del eje HHA, mientras que los GR, debido a su baja afinidad por los GC, tienen un rol predominante en el mecanismo de retroalimentación negativa del eje HHA durante la respuesta al estrés (Myers et al., 2012; Goncharova et al., 2019), cuando los niveles séricos de GC son altos. En ambos casos, esto se logra a través de mecanismos genómicos que reducen la expresión de los genes de CRH y ACTH en las neuronas del PVN y en los corticotropos de la adenohipófisis, respectivamente (Merkulov et al., 2017; Goncharova et al., 2019), y a través de mecanismos no genómicos, mediados por GR localizados en las membranas de las neuronas CRH del PVN (mGR), que reducen la actividad de las neuronas CRH (Myers et al., 2012). En conjunto, estos cambios son los responsables de limitar la actividad del eje HHA durante la respuesta al estrés.

1.3 Interacción entre los ejes adrenal y gonadal.

Las hormonas gonadales pueden regular la actividad del eje HHA ya que el cerebro de las hembras y los machos reacciona de forma diferente ante un estresor, a su vez, el estrés y las hormonas del estrés pueden afectar de forma distinta la estructura y la función sináptica entre ambos sexos (Brivio et al., 2020). Entre hembras y machos existen diferencias significativas en todos los niveles de regulación a lo largo del eje HHA, tales como el número de neuronas que llegan al PVN y la regulación de las neuronas CRH del hipotálamo, así como el tamaño y la actividad esteroidogénica de las glándulas adrenales (Bale and Epperson, 2015). Parte de estas diferencias son debidas al incremento en los niveles de hormonas gonadales que tiene lugar durante la adolescencia, ya que se ha demostrado que las hormonas gonadales contribuyen a los patrones de respuesta y de vulnerabilidad al estrés, así como a los mecanismos de afrontamiento al estrés específicos de cada sexo (Bale and Epperson, 2015; Oyola and Handa, 2017). Por ejemplo, los roedores hembra y las mujeres presentan una mayor activación del eje HHA en respuesta a un estresor, así como una disminución en el mecanismo de retroalimentación negativa del eje HHA, en comparación con roedores macho y hombres (Bale and Epperson, 2015; Brivio et al., 2020). Por otro lado, debido a que la exposición al estresor no puede ser sostenida por mucho tiempo como tal, el organismo necesita desarrollar estrategias de afrontamiento efectivas. Estas

estrategias buscan eliminar, evitar, dominar, minimizar o tolerar las demandas exigidas a un organismo por el estresor (Puglisi-Allegra and Andolina, 2015). En los humanos existe un gran número de estrategias de afrontamiento al estrés que se pueden agrupar en dos grandes categorías. La primera categoría (enfocada hacia el problema) incluye respuestas conductuales y fisiológicas que favorecen la eliminación y/o evitación del estresor. La segunda categoría (orientada emocionalmente) incluye estrategias destinadas a reducir y/o mantener al mínimo el impacto emocional del estresor. Estas estrategias también se conocen como afrontamiento activo o pasivo con base en la presencia (activo) o ausencia (pasivo) de intentos de actuar sobre el estresor (Puglisi-Allegra and Andolina, 2015). Estrategias de afrontamiento al estrés muy similares han sido descritas en animales observados en entornos naturales y en el laboratorio. Por ejemplo, al compararse con roedores macho, los roedores hembra utilizan más estrategias de afrontamiento pasivo en respuesta a un estresor, una de ellas es el aumento en el tiempo de inmovilidad (conducta de inmovilidad) en las pruebas de nado forzado y suspensión de la cola; en los humanos las estrategias de afrontamiento pasivo ante un estresor podrían estar relacionadas con el desarrollo de síntomas depresivos, los cuales son más prevalentes en las mujeres (Bale and Epperson, 2015).

Se ha propuesto que la diferencia en la respuesta al estrés entre ambos sexos es debida a una supresión de la actividad del eje HHA que ocurre en los machos durante la pubertad (Bale and Epperson, 2015). En esta etapa de la vida la testosterona tiene un rol primordial en el establecimiento de la futura respuesta del eje HHA al estrés (Oyola and Handa, 2017). La testosterona modula la actividad del eje HHA y los niveles de corticosterona (Fig. 4A). Primero, la orquiectomía en ratas provoca niveles más altos de corticosterona y ACTH en respuesta a un estresor en comparación con ratas intactas, mientras que el tratamiento con testosterona revierte este efecto (Viau, 2002; Toufexis et al., 2014). Segundo, las ratas macho prepuberales (que presentan niveles más bajos de testosterona comparadas con ratas adultas) tardan más tiempo en retornar a sus niveles basales de corticosterona y ACTH después de la exposición a un estresor, comparadas con ratas macho adultas (Oyola and Handa, 2017). Tercero, en roedores macho la zona fasciculada de la corteza adrenal que es la encargada de la síntesis de corticosterona, presenta una disminución significativa en su tasa de

crecimiento durante la pubertad como resultado directo del incremento en la producción de testosterona (Bale and Epperson, 2015). Por último, la disminución de testosterona propia de la edad tanto en hombres como en roedores macho viejos se asocia con una mayor liberación de glucocorticoides en respuesta a un estresor (Bale and Epperson, 2015). En conjunto, estos resultados sugieren que en los hombres y en los roedores macho los niveles séricos de testosterona tienen efecto antiestrés debido a su acción inhibitoria sobre la respuesta del eje HHA a los estresores.

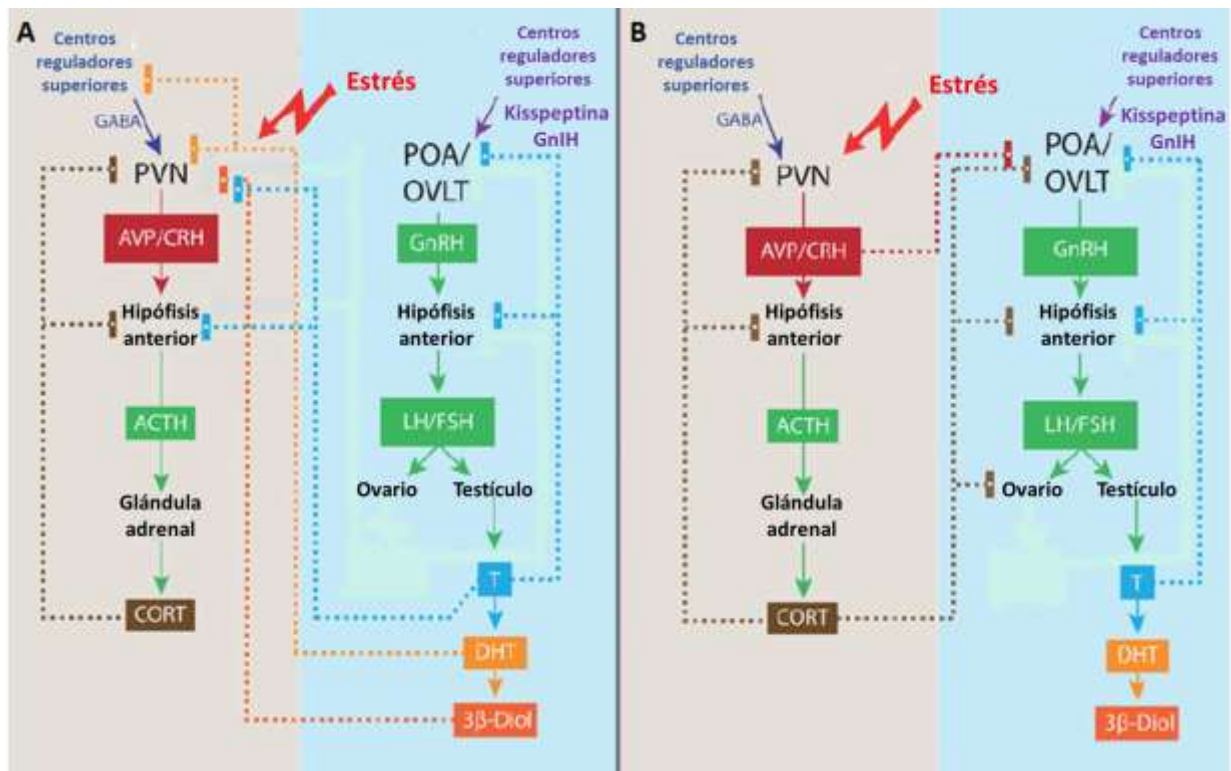


Fig. 4. Esquema que demuestra la interacción recíproca entre los ejes HHA e HHG. A. La testosterona y sus metabolitos están involucradas en la regulación del eje HHA a diferentes niveles. B. La corticosterona está involucrada en la regulación del eje HHG a diferentes niveles. Modificado de Oyola (Oyola and Handa, 2017). PVN: núcleo paraventricular; AVP: arginina vasopresina; CRH: hormona liberadora de corticotropina; ACTH: hormona adrenocorticotropa; POA: área preóptica; OVLT: órgano vascular de la lámina terminal; GnIH: hormona inhibidora de gonadotropina; GnRH: hormona liberadora de gonadotropina; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante; T: testosterona; DHT: dihidrotestosterona.

Por el contrario, los niveles elevados de glucocorticoides pueden regular de forma negativa la actividad del eje HHG y, en consecuencia, afectar los niveles de hormonas gonadales (Toufexis et al., 2014; Oyola and Handa, 2017). El estrés y las hormonas del estrés inhiben la liberación de GnRH y LH desde el hipotálamo y la hipófisis,

respectivamente (Fig. 4B), inhibiendo la síntesis y la liberación de estradiol y testosterona en el ovario y el testículo, respectivamente (Viau, 2002; Toufexis et al., 2014). Por lo tanto, resulta interesante evaluar los niveles séricos de corticosterona y testosterona durante la transición de adolescencia a edad adulta tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones de estrés crónico.

1.4 Adolescencia, estrés y depresión.

La exposición crónica al estrés durante la adolescencia incrementa el riesgo de desarrollar distintos trastornos psiquiátricos como la depresión (Lupien et al., 2009). Después del nacimiento la adolescencia representa el segundo periodo de neurodesarrollo más importante durante la vida de un humano (Schneider, 2013; Holder and Blaustein, 2014). Las distintas modificaciones morfológicas y funcionales en regiones límbicas y corticales del cerebro derivadas de este proceso de neurodesarrollo, contribuyen significativamente a los cambios en las capacidades cognitivas y al control emocional característicos de los adolescentes (Romeo, 2016). Trabajos recientes han prestado mayor atención a los factores que pueden afectar el proceso de neurodesarrollo durante la adolescencia, así como a las consecuencias de corto y de largo plazo resultantes de esta modificación. En estudios preclínicos se ha demostrado que la exposición crónica al estrés y/o a las hormonas del estrés tiene un efecto generalizado y extensivo sobre el neurodesarrollo adolescente (Eiland and Romeo, 2013). Diversos trabajos epidemiológicos sugieren que en los humanos la exposición crónica al estrés durante la adolescencia favorece el desarrollo de depresión (Andersen, 2003; De Kloet et al., 2005; Lupien et al., 2009; McCormick and Green, 2013; Holder and Blaustein, 2014; Romeo, 2016). Estos trabajos resaltan que diferentes estresores sociales durante la adolescencia producen consecuencias fisiológicas, conductuales y neuronales de larga duración, las cuales se asocian con el desarrollo de síntomas depresivos que pueden iniciar en la misma adolescencia y persistir hasta la edad adulta (Buwalda et al., 2011). Uno de estos estresores sociales es el acoso o *bullying*, el cual es un estresor social etológicamente relevante y altamente prevalente entre la población adolescente (Xu et al., 2016). El acoso es un potente estresor que conjunta un estresor físico (agresión y/o violencia física) y un estresor psicológico (temor, rechazo). A nivel mundial, se estima que entre el 10 y el

30% de los niños y adolescentes, más hombres que mujeres, se encuentran involucrados en situaciones de acoso (Resende et al., 2016). En consecuencia, el acoso en etapas tempranas de la vida como la adolescencia se ha convertido en un factor de riesgo relevante para el desarrollo de trastornos psiquiátricos como la depresión (Iñiguez et al., 2016; Resende et al., 2016), por lo tanto, es necesario un modelo animal que nos permita estudiar el desarrollo de conductas tipo depresión inducidas por la exposición crónica al estrés durante etapas tempranas de la vida como la adolescencia.

Por otro lado, la PFC y el hipocampo son dos estructuras altamente sensibles al estrés que presentan perfiles de desarrollo únicos durante la adolescencia (Lupien et al., 2009; Romeo, 2016). Al inicio de la pubertad la PFC presenta un mayor volumen, seguido de un periodo de adelgazamiento (poda sináptica y apoptosis) durante la adolescencia que se continua hasta el inicio de la edad adulta (Romeo, 2016). Estudios de neuroimagen de pacientes con depresión reportan que existe un menor metabolismo y volumen de la PFC al compararlos con controles sanos (Duman, 2014; Jett et al., 2015; Ferrari and Villa, 2016). En roedores, diversos trabajos han demostrado que la exposición crónica al estrés disminuye de forma significativa el número, la longitud y la ramificación de las dendritas de las neuronas piramidales de la PFC, así como el número de espinas sinápticas de sus dendritas (McEwen, 2011; Duman, 2014; Romeo, 2016). Estudios de neuroimagen en humanos (hombres y mujeres) reportan que el volumen del hipocampo presenta un crecimiento lineal durante la adolescencia temprana, posteriormente, las mujeres presentan una pérdida de volumen en esta región, mientras que en los hombres este crecimiento se continua hasta la adolescencia tardía (Goddings et al., 2014). Se ha observado que las personas con depresión presentan atrofia y un menor volumen del hipocampo, además, estos cambios son más evidentes en pacientes con depresión de larga duración (Bremner et al., 2000; Duman, 2002, 2014; McEwen, 2011; Ferrari and Villa, 2016), quienes probablemente presentaron este trastorno desde la adolescencia. En roedores, la exposición crónica al estrés y los niveles altos de corticosterona inducen atrofia dendrítica en las neuronas del hipocampo (Romeo, 2016) y disminuyen el mRNA del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en el giro dentado (DG) (Smith et al.,

1995), respectivamente. Se ha propuesto que estas alteraciones en la PFC y el hipocampo que son inducidas por el estrés crónico, podrían tener repercusiones neuroanatómicas y funcionales con la subsecuente alteración en los procesos cognitivos y emocionales que son regulados por ambas estructuras, lo que podría contribuir a la labilidad emocional y los déficits cognitivos observados en los pacientes con depresión (Willner et al., 2013; Duman, 2014; Jett et al., 2015, 2017; Jeon and Kim, 2016; Romeo, 2016).

1.5 La derrota social crónica

La derrota social crónica (DSC) es un modelo animal de depresión con validez etológica, predictiva, discriminativa y de apariencia que utiliza el conflicto social para generar estrés. El conflicto social es un estresor que se presenta de forma natural entre individuos de la misma especie (Goyens and Notrot, 1975; Golden et al., 2011; Hollis and Kabbaj, 2014; Iñiguez et al., 2016), en este caso entre ratones macho. Este modelo consta de dos fases, en la primera fase un ratón (sujeto de estudio) es expuesto al ataque directo de un ratón agresor (estresor físico) durante 5-10 minutos (Fig. 5A); en la segunda fase el sujeto de estudio mantiene contacto visual, auditivo y olfativo con el ratón que previamente lo atacó (estresor psicológico) durante ~24 horas (Fig. 5B) (Golden et al., 2011; Hammels et al., 2015).

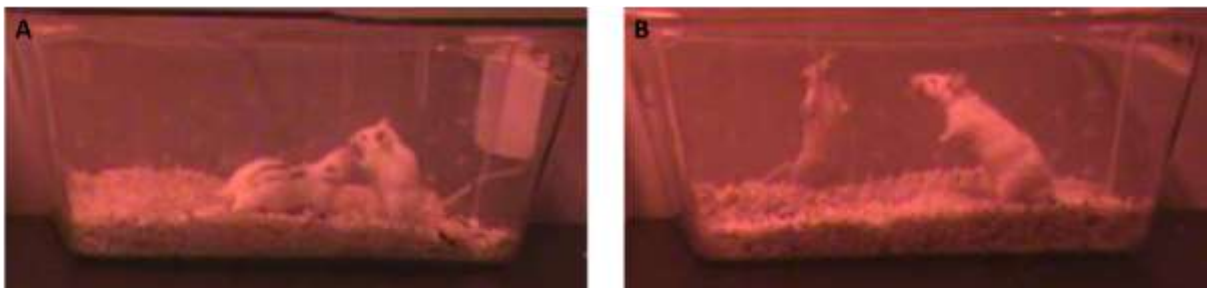


Fig. 5. Fases de la derrota social crónica. A. Primera fase en la que el sujeto de estudio es expuesto al ataque directo de un ratón agresor (estresor físico). B. Segunda fase en la que el sujeto de estudio mantiene contacto visual, auditivo y olfativo con el ratón agresor que previamente lo atacó (estresor psicológico).

Es importante resaltar que el modelo de DSC comparte similitudes con las situaciones de acoso que experimentan los humanos, con el ratón agresor tomando el papel del acosador y con el ratón derrotado siendo equivalente a la víctima de acoso (Huang et al., 2013; Shimizu et al., 2020). En general, la duración de la exposición a la DSC es de

10 a 15 días consecutivos y se emplean ratones macho de la cepa C57BL/6 como sujetos de estudio y ratones macho de la cepa CD-1 como agresores, debido a su susceptibilidad al estrés y a su nivel de agresividad (Golden et al., 2011; Hammels et al., 2015), respectivamente. Por lo que, las alteraciones conductuales inducidas por la DSC han sido poco estudiadas en ratones de otras cepas.

Al finalizar los días de exposición a la DSC los ratones son evaluados en una prueba de interacción social, en la cual se evalúa la propensión de los ratones derrotados para explorar una zona neutral que alberga a un ratón desconocido (Berton et al., 2006; Golden et al., 2011; Chaouloff, 2013). En la prueba de interacción social los ratones derrotados pasan menos tiempo cerca del ratón desconocido, en comparación con los ratones control. A esta conducta se le denomina aislamiento social y se le considera como una conducta tipo depresión (Golden et al., 2011; Hollis and Kabbaj, 2014; Hammels et al., 2015). Sin embargo, es importante resaltar que en la mayoría de los trabajos previos el ratón desconocido que se utilizó durante la prueba de interacción social, pertenece a la misma cepa del ratón agresor y además cumple con las características conductuales de estos ratones (Berton et al., 2006; Golden et al., 2011; Chaouloff, 2013; Hollis and Kabbaj, 2014; Hammels et al., 2015). Por lo tanto, no es sencillo determinar si la conducta de aislamiento social inducida por la exposición a la DSC es una conducta generalizada hacia cualquier tipo de interacción social o si es una conducta determinada por las características conductuales y fenotípicas del ratón desconocido.

En ratones macho adultos se ha demostrado que la exposición a la DSC induce conductas tipo depresión como el aislamiento social (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007; Golden et al., 2011; Razzoli et al., 2011; Yu et al., 2011; Venzala et al., 2013; Shu and Xu, 2017; Wang et al., 2019), la desesperanza (Keeney et al., 2006; Lehmann et al., 2013; Venzala et al., 2013; Wang et al., 2019) y la anhedonia (Krishnan et al., 2007; Yu et al., 2011; Venzala et al., 2013; Shu and Xu, 2017), además de conductas tipo ansiedad (Kinsey et al., 2007; Krishnan et al., 2007; Lehmann et al., 2013; Venzala et al., 2013; Martin et al., 2017) y alteraciones fisiológicas como niveles elevados de corticosterona (Keeney et al., 2006; Lehmann et al., 2013) y una menor ganancia de

peso corporal (Krishnan et al., 2007; Razzoli et al., 2011). Sin embargo, todas estas alteraciones han sido descritas en ratones adultos y en consecuencia la DSC no ha sido examinada a fondo como un modelo animal de depresión inducida por la exposición crónica al estrés crónico durante la etapa adolescente (Iñiguez et al., 2014; Resende et al., 2016).

Como ya se mencionó, las personas con depresión también experimentan déficits cognitivos como alteraciones en el aprendizaje y la memoria, que están relacionados con el número episodios depresivos experimentados por estas personas (Miskowiak et al., 2016; Papp et al., 2017). Por lo tanto, resulta interesante determinar si la DSC es capaz de provocar déficits cognitivos en ratones adolescentes a la par del desarrollo de conductas tipo, ya que esto último solo ha sido estudiado en ratones adultos (Yu et al., 2011; Martin et al., 2017).

1.6 El transportador de serotonina

Las alteraciones en la neurotransmisión serotoninérgica están implicadas en un amplio rango de trastornos psiquiátricos como la depresión (Zhang et al., 2012; Reisinger et al., 2019). En los vertebrados, la activación del sistema serotoninérgico es un elemento altamente conservado de la respuesta al estrés (McKittrick et al., 2000; Stamper et al., 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que en respuesta a la agresión recibida durante la derrota social, los roedores derrotados presentan un aumento en la liberación de serotonina (5-HT) en el núcleo dorsal del rafe (DRN) y en el hipocampo, así como una mayor actividad de las neuronas serotoninérgicas del DRN, (McKittrick et al., 2000; Gardner et al., 2005; Keeney et al., 2006; Cooper et al., 2009; Amat et al., 2010; Hammels et al., 2015). Algunos trabajos sugieren que el sistema serotoninérgico podría estar implicado en las alteraciones conductuales inducidas por la DSC. Primero, la conducta de aislamiento social inducida por la DSC puede ser revertida por un tratamiento crónico con fluoxetina (Berton et al., 2006; Tsankova et al., 2006; Golden et al., 2011; Razzoli et al., 2011), un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (ISRS). Segundo, la conducta de desesperanza inducida por la DSC en la prueba de nado forzado fue secundaria a una disminución significativa en la conducta de nado (Mancha-Gutiérrez and López-Rubalcava, 2017), la cual se sabe está mediada por el sistema serotoninérgico (Detke et al., 1995; Detke and Lucki, 1996; Cryan et al., 2005;

Bogdanova et al., 2013). Tercero, la exposición a la DSC también disminuyó los niveles del mRNA del gen del SERT en el área del DRN de ratones (Boyarskikh et al., 2013). En conjunto, estos trabajos evidencian una interacción entre la DSC y el sistema serotoninérgico, en específico el transportador de serotonina (SERT).

La actividad y cinética de la neurotransmisión serotoninérgica dependen críticamente de la recaptura de 5-HT desde la hendidura sináptica hacia la neurona, la cual es llevada a cabo por el SERT que se localiza en la membrana plasmática de las neuronas serotoninérgicas (McKittrick et al., 2000; Zhang et al., 2012; Reisinger et al., 2019). El rol del SERT como principal elemento regulador del sistema serotoninérgico lo ha convertido en un blanco atractivo para el desarrollo de fármacos psicoactivos, como los ISRS, una clase de antidepresivos (Zhang et al., 2012; Reisinger et al., 2019). Sin embargo, el rol específico del SERT en el desarrollo de psicopatologías como la depresión no es del todo claro.

A nivel clínico, la menor densidad del SERT encontrada en distintas áreas cerebrales de pacientes con depresión ha sido propuesta como un biomarcador de este trastorno (Newberg et al., 2012). En un trabajo reciente, Reisinger et al. desarrollaron una evaluación cuantitativa de la densidad del SERT en el SNC de ratones vivos mediante tomografía por emisión de positrones (PET) (Reisinger et al., 2019). Estos autores encontraron que el tratamiento crónico con corticosterona disminuyó la densidad del SERT en el hipocampo, el estriado, el tálamo y la corteza cerebral de ratones adultos, y al mismo tiempo provocó el desarrollo de un fenotipo conductual asociado con la depresión, evidenciando la participación del SERT en la neurobiología de la depresión inducida por la exposición crónica al estrés (Reisinger et al., 2019).

A pesar de que la 5-HT está implicada en numerosos procesos del neurodesarrollo como la división celular, la migración neuronal, la diferenciación y sinaptogénesis (Daws and Gould, 2011), se sabe muy poco sobre la ontogenia del regulador más poderoso de la concentración extracelular de 5-HT, el SERT, durante la transición de adolescencia a edad adulta. Se ha demostrado que la densidad del SERT en la corteza frontal de roedores aumenta constantemente desde el destete hasta la adultez tardía,

mientras que en otras regiones cerebrales como la corteza parietal y el DRN la densidad del SERT disminuye previo al destete (Daws and Gould, 2011).

En conjunto, estas evidencias resaltan la susceptibilidad del SERT a los efectos de la exposición crónica al estrés y evidencian la necesidad de evaluar estos efectos durante la transición de adolescencia a edad adulta con la finalidad de lograr un mejor entendimiento de la interacción entre el SERT y estrés, así como evaluar la ontogenia del SERT durante esta etapa de la vida. Por último, la PFC y el hipocampo son dos áreas cerebrales clave en la fisiopatología de la depresión (Duman, 2014), que continúan madurando durante la adolescencia (Eiland and Romeo, 2013; Romeo, 2016), que participan en la regulación del eje HHG (Myers et al., 2012; Gunn et al., 2015; Goncharova et al., 2019) y que reciben una gran densidad de proyecciones serotoninérgica desde el DRN (Jacobs and Azmitia, 1992; Zhang et al., 2012), por lo tanto, resulta interesante evaluar los efectos de la DSC sobre la densidad del SERT en estas dos áreas.

2. Justificación.

La exposición crónica al estrés durante la adolescencia favorece el desarrollo de trastornos psiquiátricos como la depresión. El acoso y la agresión son dos estresores sociales altamente prevalentes entre la población adolescente. Actualmente existen pocos modelos animales que integren ambos estresores sociales, uno de ellos es la derrota social crónica. Sin embargo, a pesar de que la prevalencia de la depresión es cada vez mayor entre la población adolescente, la derrota social crónica no ha sido explorada a fondo como un modelo animal de depresión durante la adolescencia. Por lo tanto, es necesario estudiar en ratones adolescentes los efectos conductuales y neuroendocrinos inducidos por la derrota social tanto en el corto como en el largo plazo. Lo que contribuirá a un mejor entendimiento de la neurobiología de la depresión asociada con la exposición crónica al estrés durante la adolescencia y dará mayor validez a un modelo animal de depresión útil para el desarrollo y evaluación de nuevas opciones terapéuticas.

3. Hipótesis.

- 3.1. La derrota social crónica durante la adolescencia temprana inducirá conductas tipo depresión y déficits cognitivos de larga duración en ratones macho de la cepa SW.
- 3.2. Las conductas tipo depresión inducidas por la derrota social crónica tendrán una correlación negativa con la densidad del SERT en la corteza prefrontal y en el hipocampo de ratones macho de la cepa SW.
- 3.3. La derrota social crónica durante la adolescencia temprana inducirá un aumento en la concentración sérica de corticosterona acompañado de una reducción en la concentración sérica de testosterona en ratones macho de la cepa SW.

4. Objetivo general.

- 4.1. Caracterizar en el corto y en el largo plazo las conductas tipo depresión y las alteraciones en el aprendizaje y memoria inducidos por la derrota social crónica durante la adolescencia temprana en ratones macho de la cepa SW
- 4.2. Determinar en el corto y en el largo plazo la participación del SERT en el desarrollo de las conductas tipo depresión (aislamiento social y desesperanza) inducidas por la derrota social crónica durante la adolescencia temprana en ratones macho de la cepa SW.
- 4.3. Determinar en el corto y en el largo plazo los efectos de la derrota social crónica durante la adolescencia temprana sobre la concentración sérica de corticosterona y testosterona en ratones macho de la cepa SW.

5. Objetivos específicos.

- 5.1. Estandarizar el modelo de derrota social crónica durante la adolescencia temprana utilizando únicamente ratones macho de la cepa SW y determinar el desarrollo de la conducta de aislamiento social hacia un ratón no agresor, de la misma cepa y de la misma edad que la del sujeto de estudio.
- 5.2. Determinar en el corto y en largo plazo si la derrota social crónica durante la adolescencia temprana induce conductas tipo depresión (aislamiento social y desesperanza).

- 5.3. Determinar en el corto y en el largo plazo si las conductas tipo depresión inducidas por la DSC durante la adolescencia temprana se correlacionan con alteraciones en la densidad del SERT en la PFC y el hipocampo.
- 5.4. Determinar en el corto y en el largo plazo si la derrota social crónica durante la adolescencia temprana induce déficits en los procesos de aprendizaje y la memoria visoespacial.
- 5.5. Evaluar los efectos de la derrota social crónica durante la adolescencia temprana sobre la concentración sérica de corticosterona y testosterona durante la transición de adolescencia a edad adulta.

6. Materiales y Métodos

6.1 Animales

Dividimos la adolescencia de los ratones en adolescencia temprana (DPN21-34), adolescencia media (DPN34-46) y adolescencia tardía (DPN46-59), con base en lo descrito en la literatura (Lupien et al., 2009; Eiland and Romeo, 2013; Holder and Blaustein, 2014).

Para este trabajo utilizamos ratones macho de la cepa SW, ratones adolescentes como sujetos de estudio y ratones adultos como agresores. Los ratones adolescentes y adultos fueron traídos a nuestras instalaciones en el DPN21 y en el DPN70, respectivamente. Los ratones adolescentes se alojaron en grupo (4-6 por caja) hasta el inicio de los experimentos (DPN28) y los ratones adultos se alojaron de forma individual durante una semana y, posteriormente, se evaluaron y seleccionaron como ratones agresores. Este último proceso se realizó con base a los procedimientos y a las características conductuales descritas por Golden et al. (Golden et al., 2011) (**Anexo I**).

Todos los ratones tuvieron alimento estándar y agua *ad libitum*, se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada (21-23 °C), en condiciones de luz/oscuridad (12:12 horas) y en ciclo invertido, con la fase de luz iniciando a las 21:00 horas.

El Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL 379-02) aprobó nuestros procedimientos experimentales, los cuales se realizaron siguiendo la regulación establecida por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199) para el uso

y cuidado de animales de laboratorio. Todas las pruebas conductuales y las determinaciones de hormonas se realizaron entre las 10:00 y 13:00 horas.

6.2 Derrota social crónica.

Utilizamos el modelo de DSC descrito por Golden et al. (Golden et al., 2011). Para lograr esto fue necesario el uso de cajas especiales equipadas con una tapa con doble bebedero (Fig. 6A) y una división de acrílico que permitió la creación de dos compartimentos dentro de la caja hogar (Fig. 6B). Brevemente, se colocó un ratón adolescente (DPN28) directamente dentro del compartimento de un ratón agresor durante 5 minutos. Durante este tiempo el ratón adolescente fue investigado, atacado y derrotado por el ratón agresor. En promedio, cada ratón adolescente recibió entre 2-3 ataques de 30 segundos de duración cada uno, las lesiones más comunes que presentaron los ratones adolescentes fueron heridas puntiformes ($\emptyset < 1$ mm) en la cola y patas delanteras y, en algunos casos, sangrado escaso en el sitio de la herida. Al finalizar estos 5 minutos, el ratón adolescente se colocó en el compartimento contiguo al del ratón agresor dentro de la misma caja hogar durante las restantes 24 horas. La división de acrílico tenía pequeñas perforaciones en toda su superficie las cuales permitieron que el ratón adolescente mantuviera un contacto sensorial con el ratón agresor que previamente lo atacó (Fig. 6C).

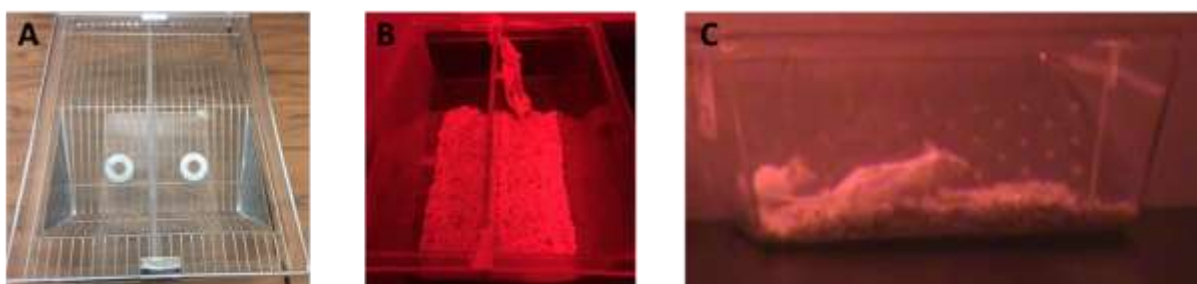


Fig. 6. Material utilizado en el modelo de DSC. A. Caja hogar especial equipada con una tapa con doble bebedero y una división de acrílico. B. Vista superior de los dos compartimentos creados por la división de acrílico dentro de la caja hogar. C. Pequeñas perforaciones sobre la división de acrílico que permiten el contacto sensorial entre los ratones.

Este procedimiento se repitió durante 10 días consecutivos y en cada día los ratones adolescentes se rotaron a la caja hogar de un nuevo ratón agresor, lo anterior se realizó para evitar que los ratones agresores se habituaran a una misma víctima. Por otro lado, los ratones control se alojaron por pares con ratones de su misma edad y

sexo en cajas hogar idénticas a las utilizadas para la DSC, un ratón por compartimento. Al igual que los ratones derrotados, los ratones control se rotaron cada día a una nueva caja hogar evitando en todo momento el contacto físico entre los ratones control y sus respectivos compañeros de caja.

6.3 Pruebas conductuales

6.3.1 Prueba de interacción social

Utilizamos la prueba de interacción social para evaluar el desarrollo de la conducta de aislamiento social (Berton et al., 2006; Golden et al., 2011). La prueba de interacción social se realizó en una arena de campo abierto (42 cm largo x 42 cm ancho x 42 cm alto), la cual estaba equipada con una jaula de alambre (10 cm largo x 10 cm ancho x 6.5 cm alto) en uno de los lados de la arena, el área alrededor de la jaula de alambre se denominó zona de interacción (Fig. 7A).

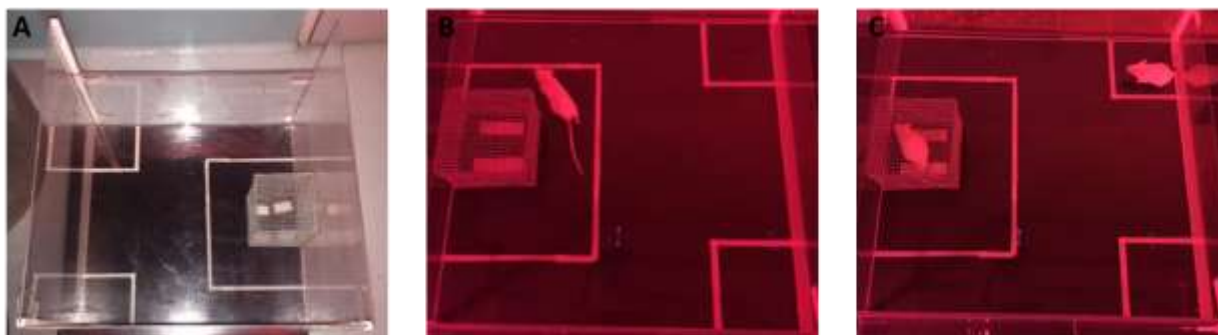


Fig. 7. Arena de interacción social y sus partes. A. Arena de interacción social con la jaula de alambre y la zona de interacción en uno de sus lados. B. Primera fase de la prueba de interacción social con la jaula de alambre vacía. C. Segunda fase de la prueba de interacción social con el ratón desconocido dentro de la jaula de alambre.

La prueba de interacción social consistió en dos fases, en la primera fase (2.5 minutos de duración) se le permitió al ratón control o derrotado explorar libremente la arena; en esta primera fase la jaula de alambre permaneció vacía (Fig. 7B). Al finalizar esta fase se extrajo al ratón control o derrotado de la arena y se colocó en el interior de la jaula de alambre un ratón macho desconocido con las siguientes características: a) agresor y de mayor edad que el sujeto de estudio [experimento 1], b) no agresor y de la misma edad que el sujeto de estudio [experimentos 2, 3 y 4]). En la segunda fase (2.5 minutos de duración) se le permitió al ratón control o derrotado explorar nuevamente la arena,

sin embargo, a lo largo de esta segunda fase un ratón desconocido se encontraba dentro de la jaula de alambre (Fig. 7C).

La prueba de interacción social se videograbó y analizó con el software TopScan 2.0 (Clever Sys Inc. VA, EUA) para determinar la tasa de interacción social. La tasa de interacción social se obtuvo al dividir el tiempo (segundos) que el ratón control o derrotado pasó dentro de la zona de interacción durante la segunda fase (ratón desconocido dentro de la jaula de alambre) entre el tiempo (segundos) que pasó dentro de la zona de interacción durante la primera fase (jaula de alambre vacía) (Golden et al., 2011). Una tasa de interacción social <1 significa que el ratón es susceptible y desarrolló la conducta de aislamiento social, por el contrario, una tasa de interacción social ≥ 1 significa que el ratón es resiliente y no desarrolló la conducta de aislamiento social (Golden et al., 2011).

6.3.2 Prueba de nado forzado

Utilizamos la prueba de nado forzado para medir la conducta de desesperanza, basados en lo descrito por Porsolt et al. (Porsolt et al., 2001). Brevemente, se colocó un ratón control o derrotado durante 6 minutos dentro de un cilindro de vidrio (24 cm altura x 13 cm diámetro) lleno con agua (a 10 cm altura) a 23 ± 2 °C (Fig. 8).

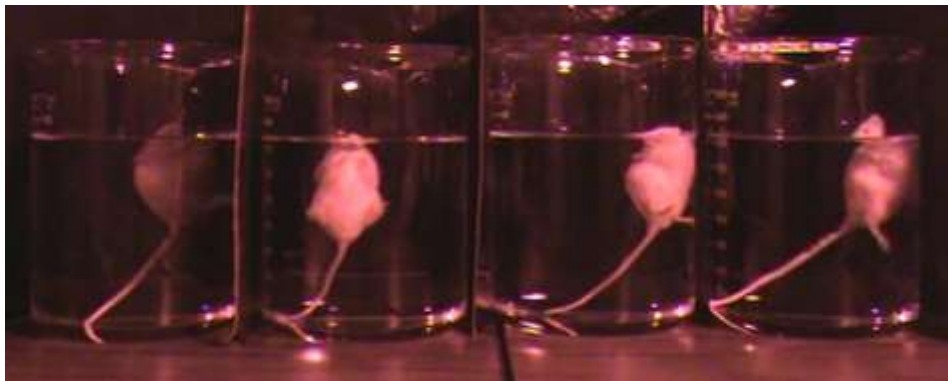


Fig. 8. Prueba de nado forzado en ratones macho adolescentes SW.

Al término de este tiempo, se sacó al ratón del cilindro, se secó y se colocó dentro una caja con calor durante 30 minutos, después, se regresó al ratón a su caja hogar. La prueba de nado forzado se videograbó y se analizaron los últimos 4 minutos de la prueba mediante una técnica de muestreo en la que, al final de cada periodo de 5 segundos se registró la conducta mayormente presentada por el ratón (Detke et al.,

1995). Conducta de inmovilidad – el ratón flotó en el agua sin luchar y sólo realizó los movimientos necesarios para mantener la cabeza por arriba de la superficie del agua, conducta de nado – el ratón realizó movimientos más activos y se movió alrededor del cilindro, conducta de escalamiento – el ratón realizó movimientos vigorosos principalmente con las patas delanteras, dentro y fuera del agua, contra las paredes del cilindro. En esta prueba, un incremento en la conducta de inmovilidad, que resulta de la reducción de las conductas activas (nado o escalamiento), es considerado una medida de desesperanza.

6.3.3 Laberinto de Barnes.

El laberinto acuático de Morris es uno de los laberintos más utilizados para evaluar el aprendizaje y la memoria visuoespacial, sin embargo, los ratones tienen un pobre desempeño en este laberinto (Paul et al., 2009). Al realizarse sobre una plataforma seca, el laberinto de Barnes reduce los efectos del estrés sobre el desempeño cognitivo de los roedores, por lo tanto, utilizamos este último laberinto para evaluar el aprendizaje y la memoria visuoespacial en nuestros ratones (Paul et al., 2009; Sharma et al., 2010). El laberinto consistió en una plataforma circular (92 cm diámetro), abierta y elevada a 90 cm de altura, que contiene 18 agujeros (9.5 cm diámetro) distribuidos equidistantemente en la periferia de la plataforma, uno de los cuales tiene debajo una pequeña cámara oscura (cajón de escape) no visible desde la plataforma.

Durante la prueba, los ratones se expusieron a dos estresores leves (luz y ruido blanco) para inducir la conducta de escape. En consecuencia, los ratones intentaron escapar de la plataforma abierta hacia el cajón de escape a través de los agujeros. El laberinto de Barnes se situó en un cuarto que contenía señales visuoespaciales en sus paredes, las cuales permanecieron siempre en el mismo lugar y ayudaron al ratón a orientarse sobre la localización del agujero que conducía al cajón de escape. Este último, también permaneció siempre en la misma posición (Fig. 9).

La prueba consistió en tres fases, habituación, adquisición y retención, con una duración total de 12 días (Fig. 10), y se realizó en condiciones de luz normal (Sunyer et al., 2007).

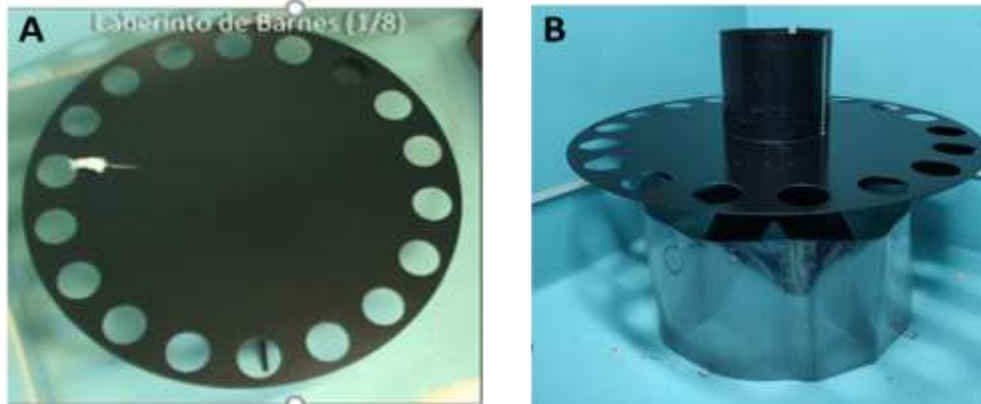


Fig. 9. Laberinto de Barnes A. Vista superior, debajo del agujero con fondo negro se localiza el cajón de escape. B. Vista lateral del laberinto de Barnes y sobre éste se encuentra el cilindro de acrílico de paredes negras.

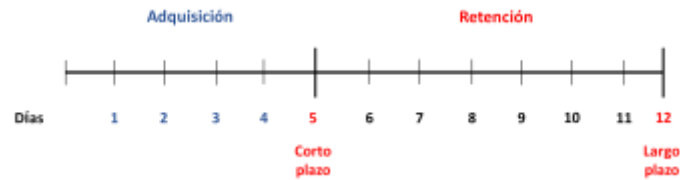


Fig. 10. Esquema de las fases de adquisición (azul) y retención (rojo) del laberinto de Barnes. Los números en negro representan los días que transcurrieron entre las pruebas de corto y de largo plazo de la fase de retención, en estos días los ratones se mantuvieron en reposo sin ningún tipo de manipulación.

Habitación (día 1). Se realizó una hora antes de iniciar la fase de adquisición. En esta fase, un ratón control o derrotado se colocó en el centro de la plataforma debajo de un vaso de vidrio durante 15 segundos. Pasado este tiempo, la fuente de ruido blanco se encendió y el vaso de vidrio con el ratón en su interior se desplazó en dirección al agujero que conducía al cajón de escape, una vez ahí, el ratón se incitó sutilmente para entrar al cajón de escape. En ese momento, la fuente de ruido blanco se apagó y el ratón permaneció dentro del cajón de escape durante un minuto.

Adquisición (día 1-4). En esta fase se realizaron dos ensayos al día, del día 1 al día 4 (8 ensayos en total) con un intervalo de al menos 30 minutos entre cada ensayo, (Riedel et al., 2018). En cada ensayo, un ratón control o derrotado se colocó en el centro de la plataforma debajo de un cilindro de acrílico de paredes negras durante 15 segundos, el cilindro evitó cualquier tipo de orientación visuoespacial antes de iniciar el

ensayo (Fig. 9B). Pasado este tiempo, la fuente de ruido blanco se encendió, el cilindro se eliminó y al ratón se le permitió explorar libremente la plataforma durante tres minutos. El ensayo se dio por terminado cuando el ratón entró al cajón de escape o una vez que transcurrieron los tres minutos. En este último caso, al finalizar los tres minutos el ratón se colocó sutilmente dentro del cajón de escape. En ambos casos, una vez que el ratón estuvo dentro del cajón la fuente de ruido blanco se apagó y el ratón permaneció ahí durante un minuto.

Retención (día 5 y 12). Esta fase consistió en dos pruebas que se realizaron un día (día 5) u ocho días (día 12) después del último ensayo de la fase de adquisición y que evaluaron la retención de corto y de largo plazo, respectivamente (Sunyer et al., 2007). La prueba se realizó igual que los ensayos, sin embargo, la duración de la prueba fue de sólo 1.5 minutos. Es importante resaltar que los ratones estuvieron en reposo sin ninguna manipulación y no se realizó ningún ensayo entre los días 5 y 12.

La plataforma se limpió (con una solución limpiadora elaborada con 100 ml etanol, 100 ml de pino, 100 ml de Extran, 5 ml de amoníaco, y 690 ml de agua) y se rotó sobre su eje central antes de cada ensayo y/o prueba para evitar la presencia de pistas olfativas remanentes que pudieran afectar el desempeño de los ratones. Todos los ensayos y/o pruebas se videograbaron y se analizaron con el software TopScan 2.0 (Clever Sys Inc. VA, EUA) para determinar la latencia primaria y el número de errores. La latencia primaria se definió como el tiempo que transcurrió desde el inicio del ensayo y/o prueba hasta el primer encuentro del ratón con el agujero que conducía al cajón de escape y los errores se definieron como cada ocasión que el ratón se asomó a un agujero que no conducía al cajón de escape.

6.4 Autoradiografías de SERT

Para las autoradiografías utilizamos los cerebros congelados de los ratones control o derrotados, los cuales se cortaron en rebanadas coronales de 20 μm de espesor a -20 °C con un criostato Hyrax C25 (Zeiss, Alemania). Posteriormente, las rebanadas se colocaron sobre portaobjetos previamente gelatinizados y se almacenaron a -80 °C hasta que se procesaron. Para su procesamiento, los portaobjetos con las rebanadas se dejaron a temperatura ambiente por al menos dos horas y, posteriormente, se pre

incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en solución Tris-HCl (50 mM, pH 7.7) con 120 mM de NaCl y 5 mM de KCl. Después de esto, los portaobjetos con las rebanadas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente en una solución con [³H]-paroxetina (0.5 nM; 25 Ci/mM, Perkin Elmer, EUA), un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina-5-HT (Giannaccini et al., 2011; Solich et al., 2011). La unión inespecífica se determinó en presencia de paroxetina (30 µM, Sigma Aldrich, Toluca). Posterior a la incubación, los portaobjetos con las rebanadas se lavaron dos veces durante 10 minutos con solución Tris-HCl fría, después, se sumergieron durante 5 segundos en agua destilada fría y se secaron utilizando un dispositivo de aire frío. Después de esto, los portaobjetos con las rebanadas, un portaobjetos con estándares de tritio (American Radiolabeled Chemicals, MO, EUA) y sobre éstos una película Kodak sensible al tritio, se colocaron dentro de casetes de rayos X y se almacenaron a -80 °C durante 6 meses. Pasado este tiempo, la película se retiró de los castes y se reveló con Kodak GBX Developer (Sigma Aldrich, Toluca, México) durante 5 minutos a 20 °C. Los estándares de tritio se utilizaron para obtener la curva estándar de densidad óptica (DO). Por último, para medir la radioactividad tomamos 10 lecturas de DO por estructura, al menos cinco diferentes rebanadas adyacentes fueron leídas y promediadas (Páez-Martínez et al., 2020). La DO se convirtió en fmol/mg de tejido utilizando un software de video análisis (Quantity One 1-D). Las áreas cerebrales evaluadas incluyeron la PFC y el hipocampo (dorsal y ventral) que se identificaron basados en The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001).

6.5 Inmunoensayo de hormonas séricas

Para el inmunoensayo de hormonas utilizamos el suero de los ratones control o derrotados, el cual se obtuvo de la sangre troncal de los ratones y se almacenó a -80 °C hasta que se procesó. Trabajamos con los kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de Enzo Life Science (Farmingdale, NY, EUA) para determinar la concentración sérica de corticosterona (ADI-900-097) y testosterona (ADI-900-065). Los ensayos se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las muestras se trabajaron por duplicado y las placas se leyeron con un lector de microplacas de la marca Stat Fax 2100 (Fisher Bioblock Scientific, FL, EUA) a 405 nm.

Para el ensayo de corticosterona, la reactividad cruzada fue desoxicorticosterona 28.6%, progesterona 1.7%, tetrahidrocorticosterona 0.28%, aldosterona 0.18%, testosterona 0.13%, cortisol 0.04% y <0.03% para otras hormonas. La variabilidad inter e intra-ensayo fue <15%. La sensibilidad del ensayo fue 26.99 pg/ml. Para el ensayo de testosterona, la reactividad cruzada fue 19-hidroxitestosterona 14.64%, androstenediona 7.2%, dehidroepiandrosterona 0.72%, estradiol 0.4% y <0.001% para otras hormonas. La variabilidad inter e intra-ensayo fue <15%. La sensibilidad del ensayo fue 5.67 pg/ml.

6.6. Diseño experimental.

6.6.1. Experimento 1. Los objetivos de este experimento fueron estandarizar el modelo de DSC en ratones adolescentes macho de la cepa SW, un modelo validado principalmente en ratones adultos de la cepa C57BL/6, y determinar el desarrollo de la conducta de aislamiento social hacia un ratón desconocido no agresor, de la misma cepa y de la misma edad que el sujeto de estudio, una conducta desarrollada primordialmente hacia un ratón desconocido agresor, de diferente cepa y de mayor edad que el sujeto de estudio.

Para lograr estos objetivos, tres grupos independientes (1 control, 2 derrotados; n=7) se expusieron a 10 días consecutivos de DSC o manipulación control durante la adolescencia temprana (DPN28-37). Posteriormente, los ratones de cada grupo fueron evaluados en la prueba de interacción social (DPN39). En uno de los grupos derrotados se utilizó como ratón desconocido a un ratón agresor y de mayor edad que el sujeto de estudio, mientras que en el otro grupo derrotado se utilizó como ratón desconocido a un ratón no agresor y de la misma edad que el sujeto de estudio.

6.6.2. Experimento 2. El objetivo de este experimento fue determinar si la DSC durante la adolescencia temprana era capaz de inducir las conductas tipo depresión como el aislamiento social y la desesperanza tanto en el corto como en el largo plazo.

Para lograr este objetivo, cuatro grupos independientes (2 controles, 2 derrotados; n=7) se expusieron a 10 días consecutivos de DSC o manipulación control durante la

adolescencia temprana (DPN28-37). Para la determinación de los efectos en el corto plazo, los ratones de dos grupos (control y derrotado) se evaluaron durante la adolescencia media en la prueba de interacción social (DPN39) y en la prueba de nado forzado (DPN40). Los ratones de los dos grupos restantes (control y derrotado) se alojaron en grupo y sin ninguna manipulación durante cuatro semanas hasta alcanzar la edad adulta para poder analizar los efectos a largo plazo. En ese momento los ratones se evaluaron en la prueba de interacción social (DPN67) y en la prueba de nado forzado (DPN68).

6.6.3 Experimento 3. El objetivo de este experimento fue determinar si el aislamiento social y la desesperanza inducidas por la DSC durante la adolescencia se correlacionan con alteraciones en la densidad del SERT en la PFC y el hipocampo tanto en el corto como en el largo plazo.

Para lograr este objetivo, cuatro grupos independientes (2 controles, 2 derrotados; n=4) se expusieron a 10 días consecutivos de DSC o manipulación control durante la adolescencia temprana (DPN28-37). Para la determinación en el corto plazo, los ratones de dos grupos (control y derrotado) se evaluaron durante la adolescencia media en la prueba de interacción social (DPN39), en la prueba de nado forzado (DPN40) y en el DPN41 se sacrificaron para obtener sus cerebros. Los ratones de los dos grupos restantes (control y derrotado) se alojaron en grupo y sin ninguna manipulación durante cuatro semanas, hasta alcanzar la edad adulta para poder realizar la determinación en el largo plazo. En ese momento los ratones se evaluaron en la prueba de interacción social (DPN67), en la prueba de nado forzado (DPN68) y en el DPN69 se sacrificaron para obtener sus cerebros. En ambos casos, los cerebros se extrajeron rápidamente, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta que se procesaron para las autoradiografías.

6.6.4 Experimento 4. El objetivo de este experimento fue determinar si la DSC durante la adolescencia temprana era capaz de inducir alteraciones en el aprendizaje y la memoria visuoespacial tanto en el corto como en el largo plazo.

Para lograr este objetivo, cuatro grupos independientes (2 controles, 2 derrotados; n=7) se expusieron a 10 días consecutivos de DSC o manipulación control durante la adolescencia temprana (DPN28-37). Para la determinación en el corto plazo, los ratones de dos grupos (control y derrotado) se evaluaron desde la adolescencia media (DPN39) hasta la adolescencia

tardía (DPN50) debido a la duración de la prueba del laberinto de Barnes. Los ratones de los dos grupos restantes (control y derrotado) se alojaron en grupo y sin ninguna manipulación durante cuatro semanas, hasta alcanzar la edad adulta para poder realizar la determinación en el largo plazo. En ese momento los ratones se evaluaron durante la edad adulta (del DPN67 al 78) en la prueba del laberinto de Barnes.

6.6.5. Experimento 5. El objetivo de este experimento fue evaluar la concentración sérica de corticosterona y testosterona antes, durante y después de la DSC.

Para este objetivo utilizamos 54 ratones (27 controles, 27 derrotados) cuyas edades fueron del DPN25 al 65. Para obtener la sangre troncal estos ratones se sacrificaron por decapitación a intervalos de 5 días (n=3), antes (DPN25), durante (DPN30 y 35) y después (DPN40-65) de ser expuestos a la DSC (DPN28-37). Para controlar las variaciones circadianas en la concentración sérica de corticosterona, obtuvimos todas las muestras sanguíneas durante las primeras 4 horas del ciclo de oscuridad (12:00-13:00 horas, aproximadamente). Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 14500 rpm y a 4 °C durante 25 minutos para obtener el suero, este último se almacenó a -80 °C hasta que se realizó el inmunoensayo.

7. Análisis estadístico.

La latencia primaria y el número de errores durante la fase de retención del laberinto de Barnes y el área bajo la curva de las concentraciones séricas de corticosterona y testosterona se analizaron con la prueba t de Student. La tasa de interacción social en el experimento 1 se analizó con el ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Tukey. Para determinar el efecto de la edad de los ratones y la exposición a la DSC sobre la tasa de interacción social, sobre las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento en la prueba de nado forzado y sobre la densidad del SERT, utilizamos el ANOVA de dos vías y la prueba post hoc de Tukey. Para determinar el efecto de los días de entrenamiento y la exposición a la DSC sobre la latencia primaria y sobre el número de errores durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes, utilizamos el ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba post hoc de Dunnett. Para determinar el efecto de la edad de los ratones y la exposición a la DSC sobre las concentraciones

séricas de corticosterona y testosterona utilizamos el ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba post hoc de Tukey. Las comparaciones del desempeño de los ratones durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes se analizaron con la prueba exacta de Fisher. Por último, la correlación entre las conductas tipo depresión y la densidad del SERT y la correlación entre la concentración sérica de corticosterona y testosterona se determinaron con la prueba de correlación de Pearson. La significancia se estableció como $p < 0.05$ para todas las pruebas. Todo el análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism.

8. Resultados.

8.1. Experimento 1. Los ratones macho adolescente de la cepa SW desarrollaron la conducta de aislamiento social hacia un ratón no agresor, de su misma cepa y de su misma edad.

En la prueba de interacción social (Fig. 11), encontramos que los ratones adolescentes derrotados presentaron una tasa de interacción social significativamente menor a la presentada por los ratones control [$F_{2, 18} = 15.39$, $p < 0.001$].

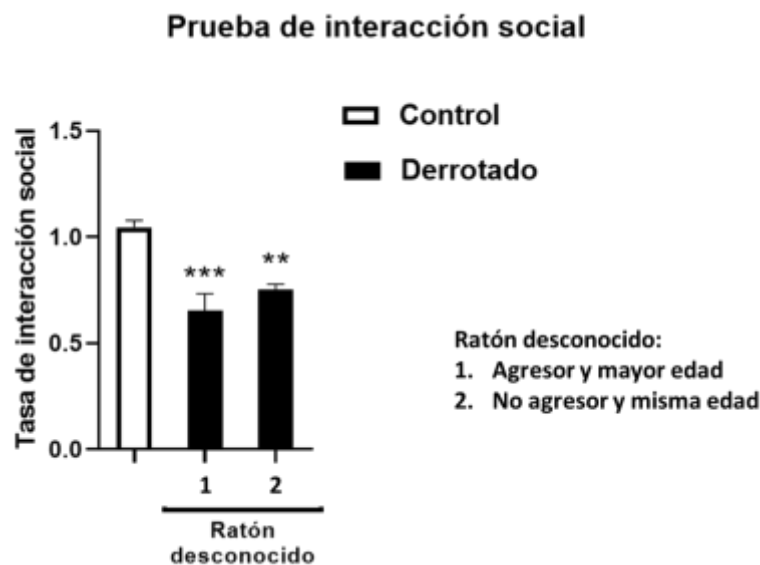


Fig. 11. Efectos de la DSC durante la adolescencia sobre la prueba de interacción social, utilizando como ratón desconocido a un ratón agresor y de mayor edad o a un ratón no agresor y de la misma edad. Se presenta la media \pm SEM de la tasa de interacción social. ANOVA de una vía. Post hoc Tukey *** $p < 0.001$ y ** $p < 0.01$, $n = 7$ por grupo.

La prueba de comparaciones múltiple de Tukey demostró que la disminución en la tasa de interacción social se presentó en ambos casos: cuando utilizamos como ratón desconocido a un ratón agresor y de mayor edad que el sujeto de estudio ($p < 0.001$) y cuando utilizamos como ratón desconocido a un ratón no agresor y de la misma edad que el sujeto de estudio ($p = 0.002$), en ambos casos un ratón de la cepa SW. Además, al comparar la tasa de interacción social entre los dos grupos de ratones adolescentes derrotados no encontramos diferencias significativas ($p = 0.393$). Estos resultados indican que al comparar con los ratones control, los ratones derrotados pasaron en promedio menos tiempo dentro de la zona de interacción cuando el ratón desconocido estuvo presente dentro de la jaula de alambre, lo que se puede observar al analizar el trazo representativo del recorrido realizado por un ratón control y un ratón derrotado dentro de la arena de interacción social durante la segunda fase de la prueba (Fig. 12).

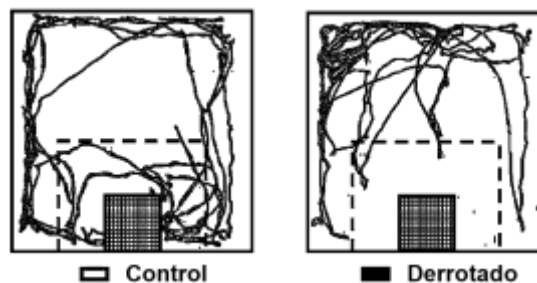


Fig. 12. Trazo representativo del recorrido realizado dentro de la arena de interacción social por un ratón control y un ratón derrotado cuando el ratón desconocido estuvo presente dentro de la jaula de alambre (segunda fase de la prueba de interacción social).

8.2. Experimento 2. La DSC durante la adolescencia temprana indujo conductas tipo depresión de larga duración.

El ANOVA de dos vías reveló que la tasa de interacción (Fig. 13) se modificó de forma significativa por exposición a la DSC ($F_{1, 24} = 24.06$, $p < 0.001$), no se modificó por la edad de los ratones ($F_{1, 24} = 2.179$, $p = 0.152$) y no hubo interacción entre ambos factores ($F_{1, 24} = 0.207$, $p = 0.652$). El análisis post hoc reveló una disminución significativa en la tasa de interacción social en los grupos derrotados, tanto en los ratones adolescentes ($p = 0.021$) como en los ratones adultos ($p = 0.004$), comparados con su respectivo grupos control.

Prueba de interacción social

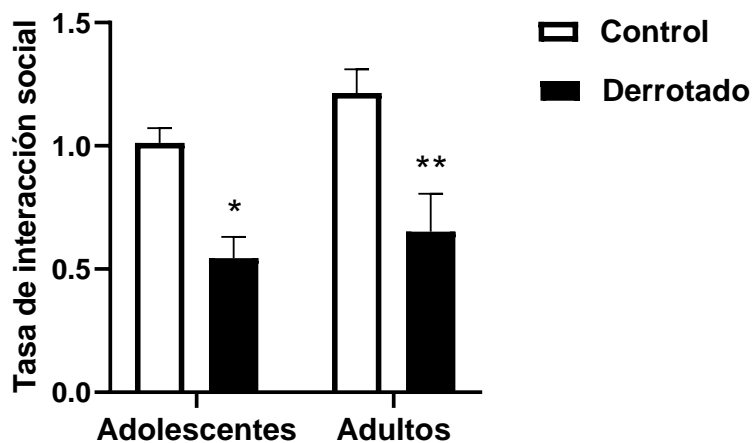


Fig. 13. Efectos de la DSC durante la adolescencia sobre la prueba de interacción social, tanto en ratones adolescentes como en ratones adultos. Se presenta la media \pm SEM de la tasa de interacción social. ANOVA de dos vías ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ vs control, $n = 7$ por grupo.

El ANOVA de dos vías reveló que la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado (Fig. 14A) se modificó de forma significativa por exposición a la DSC ($F_{1, 24} = 25.88$, $p < 0.001$), no se modificó por la edad de los ratones ($F_{1, 24} = 0.011$, $p = 0.914$) y no hubo interacción entre ambos factores ($F_{1, 24} = 0.292$, $p = 0.593$). El análisis post hoc reveló un incremento significativo en esta conducta en los grupos derrotados, tanto en los ratones adolescentes ($p = 0.002$) como en los ratones adultos ($p = 0.018$), comparados con su respectivo grupo control.

El ANOVA de dos vías reveló que la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado (Fig. 14B) se modificó de forma significativa por exposición a la DSC ($F_{1, 24} = 24.50$, $p < 0.001$) y por la edad de los ratones ($F_{1, 24} = 5.736$, $p = 0.024$), aunque no hubo interacción entre ambos factores ($F_{1, 24} = 0.407$, $p = 0.529$). El análisis post hoc reveló una disminución significativa en esta conducta en los grupos derrotados, tanto en los ratones adolescentes ($p = 0.003$) como en los ratones adultos ($p = 0.026$), comparados con su respectivo grupo control.

El ANOVA de dos vías reveló que la conducta de escalamiento en la prueba de nado forzado (Fig. 14C) no se modificó por la exposición a la DSC ($F_{1, 24} = 0.621$, $p = 0.438$), se modificó de forma significativa por la edad de los ratones ($F_{1, 24} = 6.987$, $p = 0.014$) y

no hubo interacción entre ambos factores ($F_{1, 24} = 0.002$, $p=0.963$). El análisis post hoc no reveló diferencias significativas.

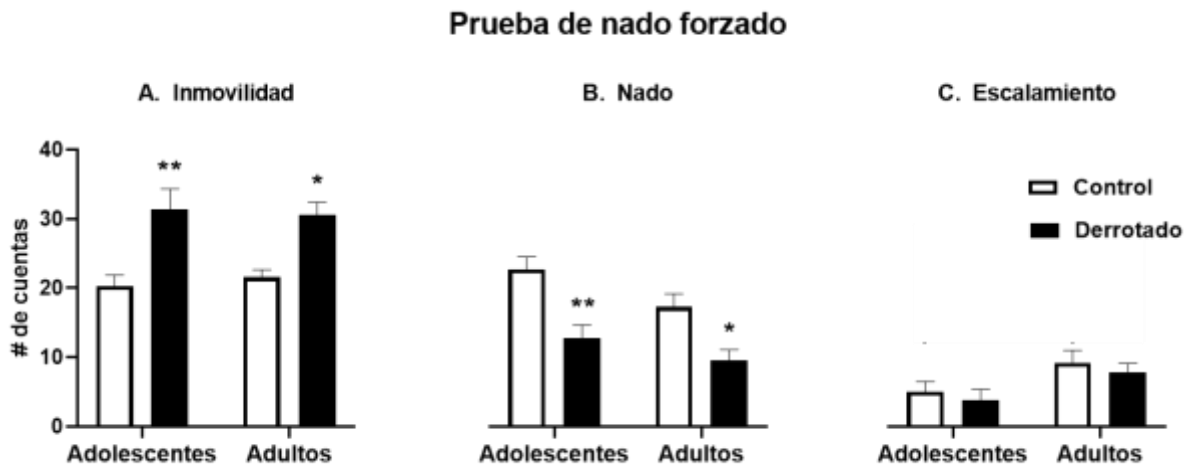


Fig. 14. Efectos de la DSC durante la adolescencia sobre las conductas de inmovilidad (A), nado (B) y escalamiento (C) en la prueba de nado forzado, tanto en ratones adolescentes como en ratones adultos. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento. ANOVA de dos vías ** $p<0.01$, * $p<0.05$ vs control, $n=7$ por grupo.

8.3. Experimento 3. La DSC durante la adolescencia temprana provocó efectos contrarios y dependientes de la edad sobre la densidad del SERT en el hipocampo. Además, la densidad del SERT en el hipocampo se correlacionó con las conductas tipo depresión de forma dependiente de la edad.

El ANOVA de dos vías reveló que la densidad del SERT en la PFC (Fig. 15A) no se modificó por la exposición a la DSC ($F_{1, 76} = 0.066$, $p=7.960$), se modificó de forma significativa por la edad de los ratones ($F_{1, 76} = 338.8$, $p<0.001$) y no hubo interacción entre ambos factores ($F_{1, 76} = 0.336$, $p=0.563$). El análisis post hoc reveló un incremento significativo en la densidad del SERT en los ratones adultos, tanto controles ($p<0.001$) como derrotados ($p<0.001$), comparados con su respectivo grupo adolescente.

El ANOVA de dos vías reveló que la densidad del SERT en el hipocampo dorsal (Fig. 15B) se modificó por la exposición a la DSC ($F_{1, 76} = 23.34$, $p<0.001$), por la edad de los ratones ($F_{1, 76} = 627.4$, $p<0.001$) y hubo interacción entre ambos factores ($F_{1, 76} = 367.9$,

p<0.001). El análisis post hoc demostró un incremento significativo en la densidad del SERT en el hipocampo dorsal de los ratones adolescentes derrotados comparados con su grupo control (p<0.001). Por el contrario, demostró una disminución significativa en la densidad del SERT en el hipocampo dorsal de los ratones adultos derrotados comparados con su grupo control (p<0.001). Además, demostró un incremento significativo en la densidad del SERT en el hipocampo dorsal de los ratones adultos, tanto controles (p<0.001) como derrotados (p<0.001), comparados con su respectivo grupo adolescente.

El ANOVA de dos vías reveló que la densidad del SERT en el hipocampo ventral (Fig. 15C) se modificó por la exposición a la DSC ($F_{1, 76} = 12.87$, p<0.001), por la edad de los ratones ($F_{1, 76} = 392.8$, p<0.001) y hubo interacción entre ambos factores ($F_{1, 76} = 351.4$, p<0.001). El análisis post hoc demostró un incremento significativo en la densidad del SERT en el hipocampo dorsal de los ratones adolescentes derrotados comparados con su grupo control (p<0.001). Por el contrario, demostró una disminución significativa en la densidad del SERT en el hipocampo dorsal de los ratones adultos derrotados comparados con su grupo control (p<0.001). Además, demostró un incremento significativo en la densidad del SERT en el hipocampo dorsal de los ratones adultos comparados con los ratones adolescentes (p<0.001), pero únicamente en los grupos control.

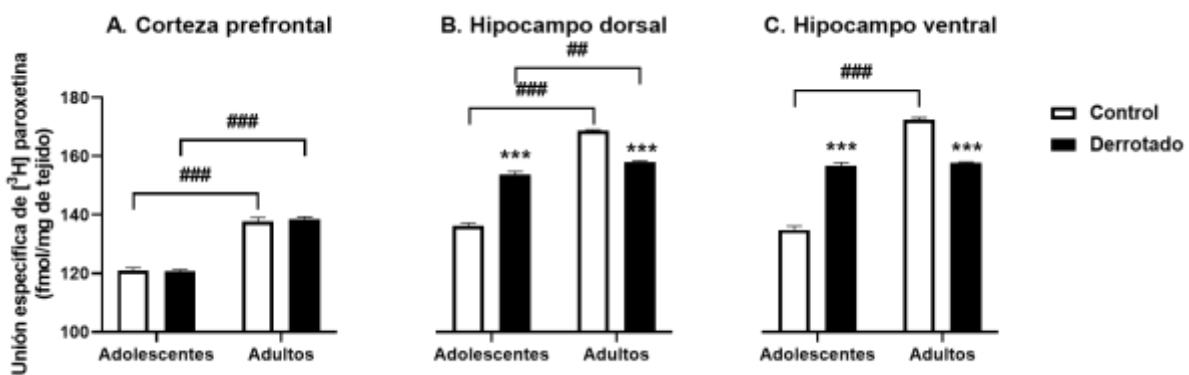


Fig. 15. Efectos de la DSC durante la adolescencia sobre la densidad del SERT en la PFC (A), el hipocampo dorsal (B) y el hipocampo ventral (C), tanto en ratones adolescentes como adultos. Se presenta la media \pm SEM de la unión específica de [³H] paroxetina (fmol/mg de tejido). ANOVA de dos vías ***p<0.001 vs control y ###p<0.001 vs adolescentes, n=4 por grupo (5 lecturas de DO por ratón).

En la Fig. 16 se muestran algunas autorradiografías representativas de las rebanadas de la PFC, el hipocampo dorsal y el hipocampo ventral de los ratones adolescentes (control y derrotados) y adultos (control y derrotados).

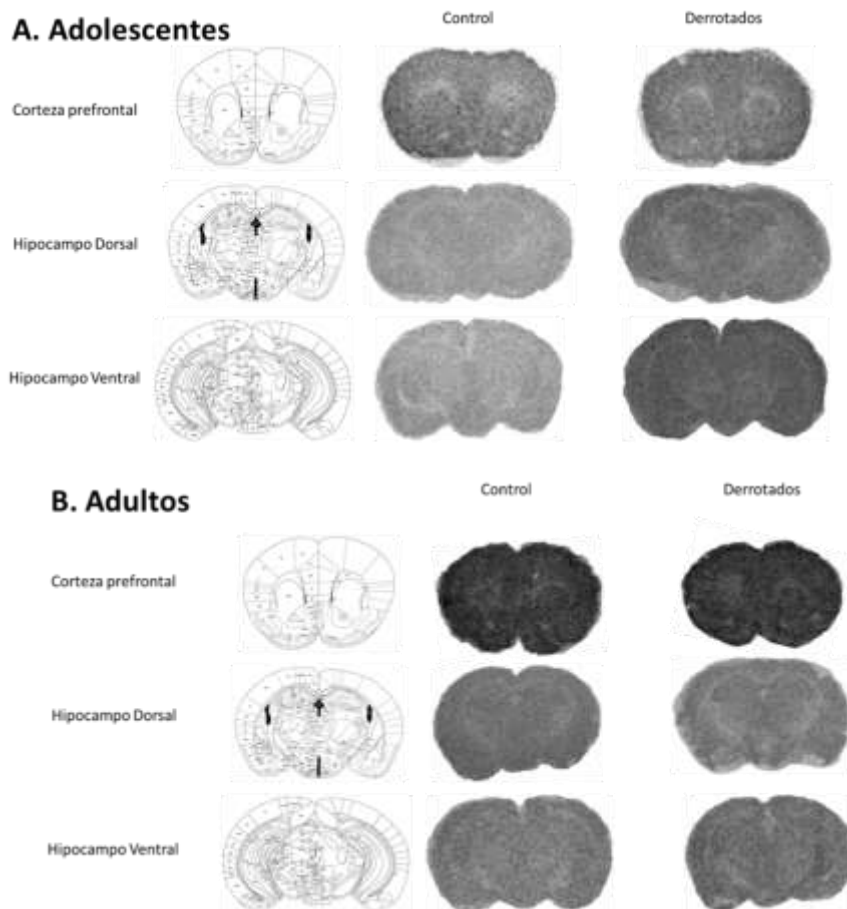
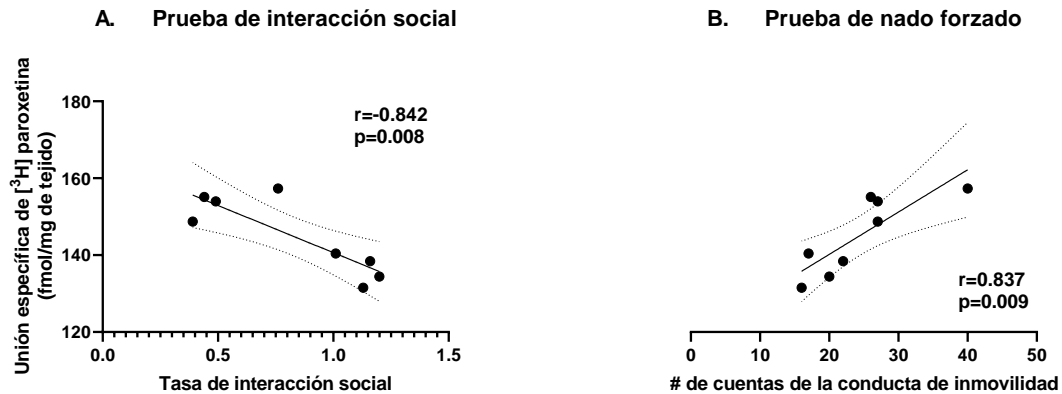


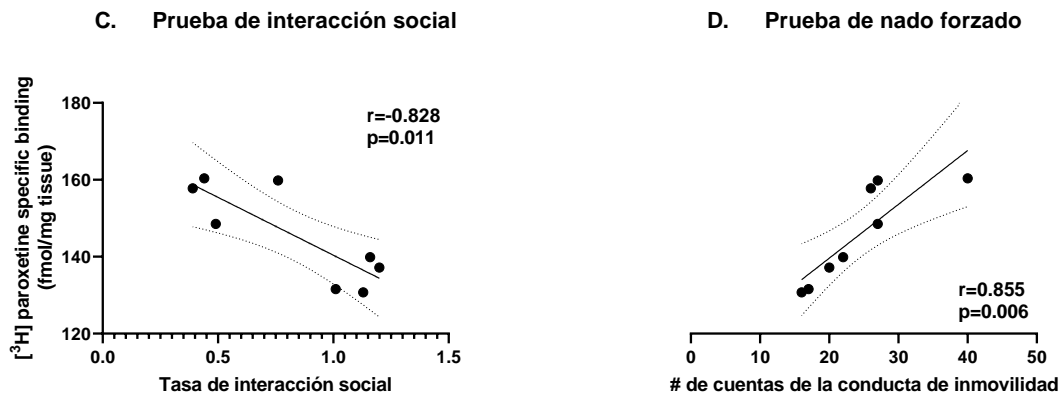
Fig. 16. Autorradiografías representativas de la PFC, el hipocampo dorsal y el hipocampo ventral de ratones adolescentes (A) y adultos (B).

En los ratones adolescentes la prueba de Pearson reveló que la densidad del SERT en el hipocampo dorsal y ventral se correlacionó negativamente con la tasa de interacción social (dorsal: $r=-0.842$, $p=0.008$ [Fig. 17A]; ventral: $r=-0.828$, $p=0.011$ [Fig. 17C]) y positivamente con la conducta de inmovilidad (dorsal: $r=0.837$, $p=0.009$ [Fig. 17B]; ventral: $r=0.855$, $p=0.006$ [Fig. 17D]). Esto indica que, en la adolescencia los ratones con las conductas tipo depresión más evidentes (menores tasas de interacción social y mayor número de cuentas de conducta de inmovilidad) presentaron las densidades más elevadas del SERT en el hipocampo.

Correlación en ratones adolescentes



Hipocampo dorsal

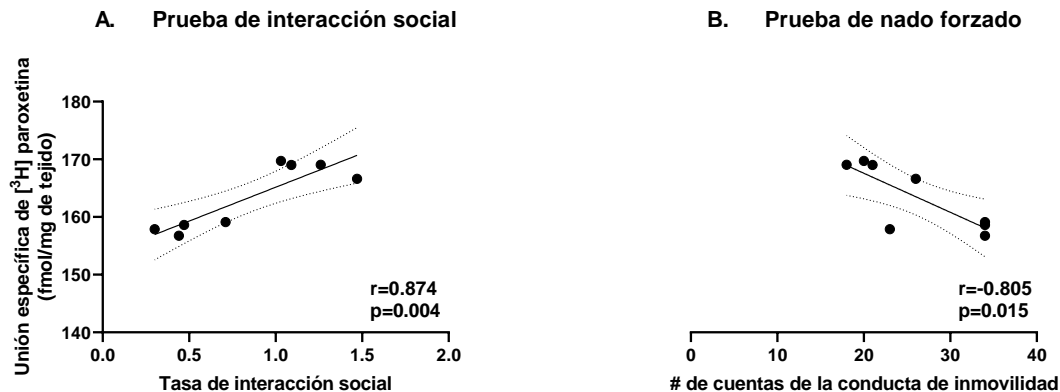


Hipocampo ventral

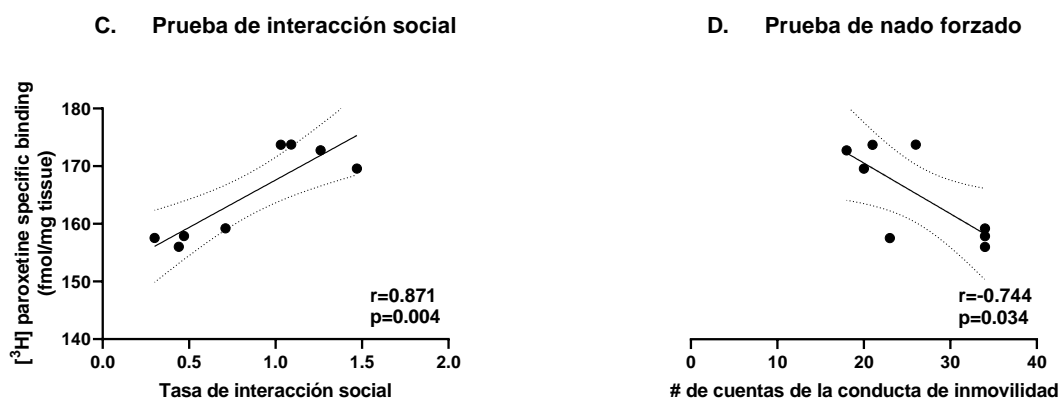
Fig. 17. Correlación entre la densidad del SERT en el hipocampo dorsal y la tasa de interacción social (A) o la conducta de inmovilidad (B) en ratones adolescentes. Correlación entre la densidad del SERT en el hipocampo ventral y la tasa de interacción social (C) o la conducta de inmovilidad (D) en ratones adolescentes. Se presenta la unión específica de [³H] paroxetina (fmol/mg de tejido) y la tasa de interacción social o el # de cuentas de la conducta de inmovilidad. Prueba de Pearson, n=4 por grupo.

En los ratones adultos la prueba de Pearson reveló que la densidad del SERT en el hipocampo dorsal y ventral se correlacionó positivamente con la tasa de interacción social (dorsal: $r=0.874$, $p=0.004$ [Fig. 18A]; ventral: $r=0.871$, $p=0.004$ [Fig. 18C]) y negativamente con la conducta de inmovilidad (dorsal: $r=-0.805$, $p=0.015$ [Fig. 18B]; ventral: $r=-0.744$, $p=0.034$ [Fig. 18D]). Esto nos indica que, en la edad adulta los ratones con las conductas tipo depresión más evidentes (menores tasas de interacción social y mayor número de cuentas de conducta de inmovilidad) presentaron las densidades más bajas del SERT en el hipocampo.

Correlación en ratones adultos



Hipocampo dorsal



Hipocampo ventral

Fig. 18. Correlación entre la densidad del SERT en el hipocampo dorsal y la tasa de interacción social (A) o la conducta de inmovilidad (B) en ratones adultos. Correlación entre la densidad del SERT en el hipocampo ventral y la tasa de interacción social (C) o la conducta de inmovilidad (D) en ratones adultos. Se presenta la unión específica de [³H] paroxetina (fmol/mg de tejido) y la tasa de interacción social o el # de cuentas de la conducta de inmovilidad. Prueba de Pearson, n=4 por grupo.

La prueba de Pearson no reveló correlación entre la densidad del SERT en la PFC y la tasa de interacción social ($r=0.301$, $p=0.091$; $r=0.156$, $p=0.711$) o la conducta de inmovilidad ($r=0.046$, $p=0.913$; $r=0.197$, $p=0.639$), ni en la adolescencia ni en la edad adulta (datos no presentados).

8.4. Experimento 4. La DSC durante la adolescencia temprana provocó déficits duraderos en los procesos de aprendizaje y fenotipos de afrontamiento diferentes por edad durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes. En la adolescencia, un porcentaje de ratones derrotados presentaron un desempeño

deficiente con tendencia a la inmovilidad; en la edad adulta, los ratones derrotados presentaron un desempeño deficiente con tendencia tanto a la inmovilidad como a la hiperactividad.

El ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló que en los ratones adolescentes la latencia primaria (Fig. 19A) y el número de errores (Fig. 19B) durante la fase de adquisición no se modificaron por la exposición a la DSC [latencia ($F_{1, 12} = 3.489$, $p=0.086$), errores ($F_{1, 12} = 2.624$, $p=0.131$)], no se modificaron por los días de entrenamiento [latencia ($F_{1, 12} = 3.141$, $p=0.067$), errores ($F_{1, 12} = 0.221$, $p=0.880$)] y no hubo interacción entre ambos factores [latencia ($F_{1, 12} = 0.670$, $p=0.576$), errores ($F_{1, 12} = 0.825$, $p=0.488$)].

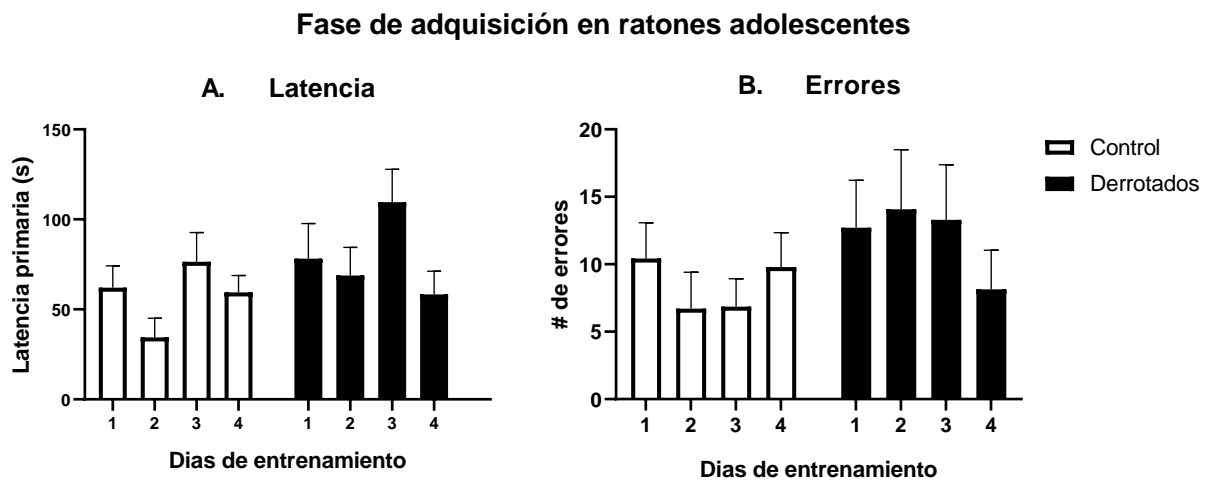


Fig. 19. Efectos de la DSC durante la adolescencia temprana sobre la latencia primaria (A) y el número de errores (B) durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes en ratones adolescentes (adolescencia tardía). Se presenta la media \pm SEM de la latencia primaria (s) y el número de errores. ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=7$ por grupo.

En los ratones adolescentes no encontramos diferencias significativas ni en la latencia primaria ($t_{[12]} = 0.651$, $p=0.263$) ni el número de errores ($t_{[12]} = 0.523$, $p=0.305$) entre los ratones control y los ratones derrotados, en el día 5 de la fase de retención (Fig. 20A y B). Por el contrario, encontramos un incremento significativo en la latencia primaria ($t_{[12]} = 2.081$, $p=0.029$) y en el número de errores ($t_{[12]} = 2.128$, $p=0.027$) en los ratones derrotados comparados con los ratones control, en el día 12 de la fase de retención (Fig. 20A y B).

Fase de retención en ratones adolescentes

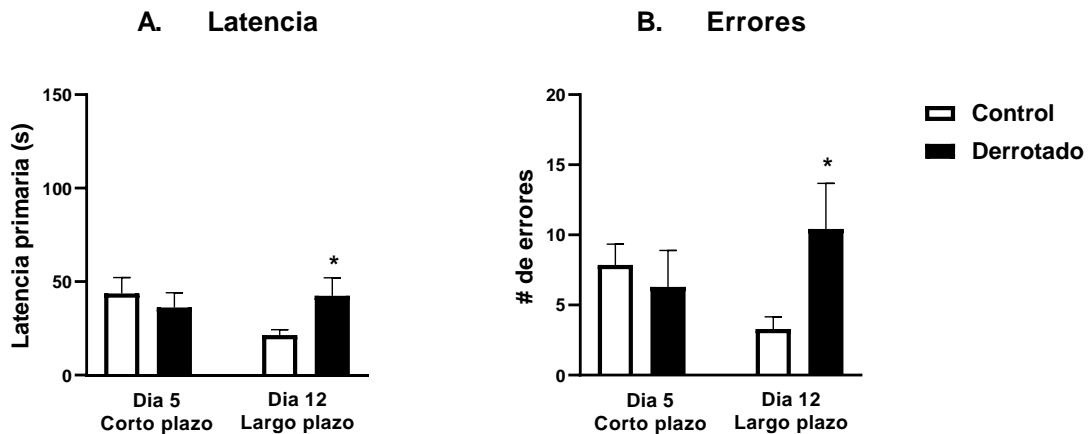


Fig. 20. Efectos de la DSC durante la adolescencia temprana sobre la latencia primaria (A) y el número de errores (B) durante la fase de retención del laberinto de Barnes en ratones adolescentes (adolescencia tardía). Se presenta la media \pm SEM de la latencia primaria (s) y el número de errores. t de Student * $p < 0.05$, $n = 7$ por grupo.

El ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló que en los ratones adultos la latencia primaria (Fig. 21A) se afectó por la exposición a la DSC ($F_{1, 12} = 6.432$, $p = 0.026$) y por los días de entrenamiento ($F_{1, 12} = 5.160$, $p = 0.010$), aunque no hubo interacción entre ambos factores ($F_{3, 36} = 2.586$, $p = 0.068$). El análisis post hoc reveló una reducción significativa en la latencia primaria en los días 2 ($p = 0.001$), 3 ($p = 0.005$) y 4 ($p = 0.020$), comparados con su respectivo día 1 de la fase de adquisición.

El ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló que en los ratones adultos el número de errores (Fig. 21B) no se afectó por la exposición a la DSC ($F_{1, 12} = 1.714$, $p = 0.215$), se modificó por los días de entrenamiento ($F_{2, 019, 24, 23} = 7.075$, $p = 0.003$) y hubo interacción entre ambos factores ($F_{3, 36} = 3.944$, $p = 0.015$). El análisis post hoc demostró una reducción significativa en el número errores en los días 2 ($p = 0.001$), 3 ($p = 0.001$) y 4 ($p = 0.004$), comparados con su respectivo día 1 de la fase de adquisición.

Fase de adquisición en ratones adultos

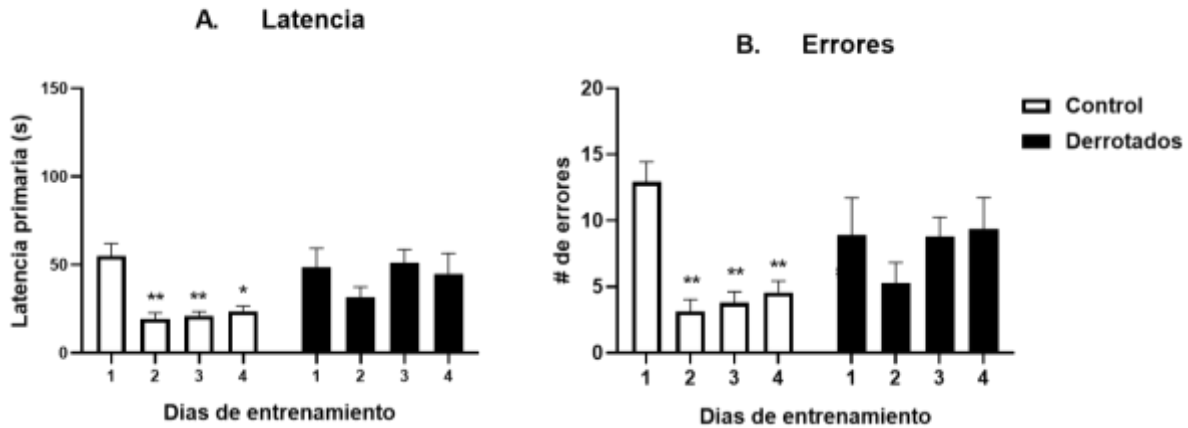


Fig. 21. Efectos de la DSC durante la adolescencia temprana sobre la latencia primaria (A) y el número de errores (B) durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes en ratones adultos. Se presenta la media \pm SEM de la latencia primaria (s) y el número de errores. ANOVA de dos vías de medidas repetidas, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs día 1 control, $n = 7$ por grupo.

En los ratones adultos encontramos un incremento significativo en la latencia primaria en los ratones derrotados tanto en el día 5 ($t_{[12]} = 1.883$, $p = 0.048$) como en el día 12 ($t_{[12]} = 2.909$, $p = 0.006$), comparado con los ratones control (Fig. 22A). Con respecto al número de errores, encontramos un incremento significativo en los ratones derrotados en el día 12 ($t_{[12]} = 3.081$, $p = 0.004$), pero no en el día 5 ($t_{[12]} = 1.647$, $p = 0.067$), comparados con los ratones control (Fig. 22B).

Fase de retención en ratones adultos

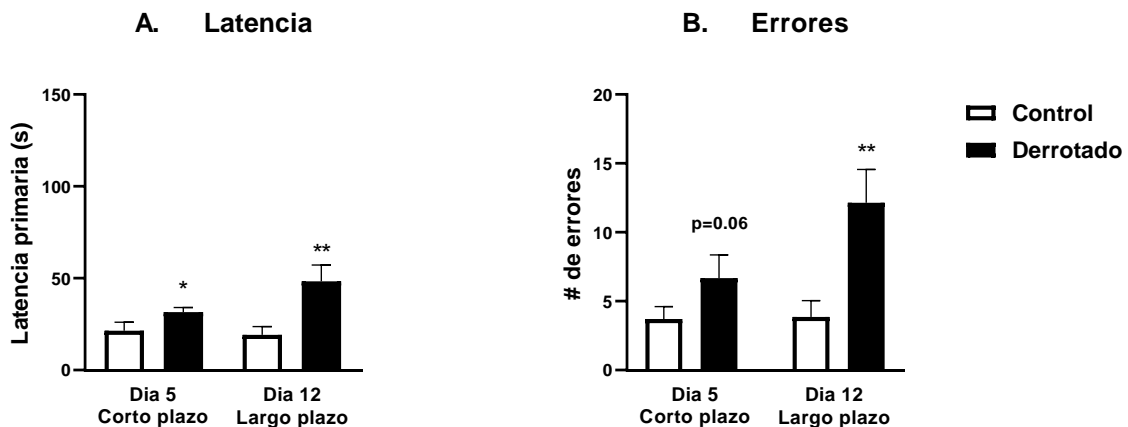


Fig. 22. Efectos de la DSC durante la adolescencia temprana sobre la latencia primaria (A) y el número de errores (B) durante la fase de retención del laberinto de Barnes en ratones adultos. Se presenta la media \pm SEM de la latencia primaria (s) y el número de errores. t de Student ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ entre grupos control y derrotado, $n = 6-7$ por grupo.

A pesar de no encontrar diferencias significativas en la latencia primaria ni en el número de errores durante la fase de adquisición en el laberinto de Barnes entre los ratones adolescentes control y derrotados, si observamos que algunos de los ratones adolescentes mostraron diferentes desempeños durante esta fase. El desempeño de los ratones fue definido con base en el tiempo invertido para localizar el agujero que conduce al cajón de escape y número de errores cometidos durante ese tiempo. Para analizar el desempeño de los ratones durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes diseñamos un gráfico utilizando la latencia primaria en el eje X y el número de errores en eje Y. Posteriormente, trazamos dos líneas perpendiculares a cada uno de los ejes (líneas punteadas) cuyos orígenes correspondieron al doble de la \bar{x} de la latencia primaria (50 segundos en el eje X) y al doble del número de errores (10 errores en el eje Y) presentados por los ratones adultos control durante la fase de adquisición. Elegimos a los ratones adultos control ya que fueron los que presentaron las latencias más cortas y el menor número de errores durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes. El trazo de las dos líneas perpendiculares resultó en la formación de cuatro cuadrantes dentro de nuestro gráfico (Fig. 23).

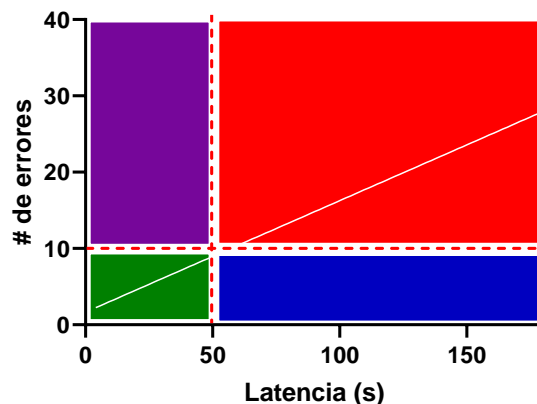


Fig. 23. Gráfico para el análisis del desempeño de los ratones durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes.

En el cuadrante de color verde se localizaron los ratones con las latencias más cortas y el menor número de errores, por lo tanto, su desempeño se consideró eficiente. Por el contrario, en el cuadrante de color rojo se localizaron los ratones con latencias más prolongadas y un alto número de errores, por lo tanto, su desempeño se consideró

deficiente. En el cuadrante de color azul se localizaron los ratones con latencias más prolongadas, pero con un bajo número de errores, por lo tanto, su desempeño se consideró deficiente con tendencia a la inmovilidad. Finalmente, en el cuadrante de color morado se localizaron los ratones con latencias más cortas, pero con un elevado número de errores, por lo tanto, su desempeño se consideró deficiente con tendencia a la hiperactividad (Fig. 24). Una vez que el ensayo de cada ratón durante la fase de adquisición fue clasificado a una de estas cuatro categorías, realizamos una comparación del porcentaje de ratones pertenecientes a cada una de estas categorías.

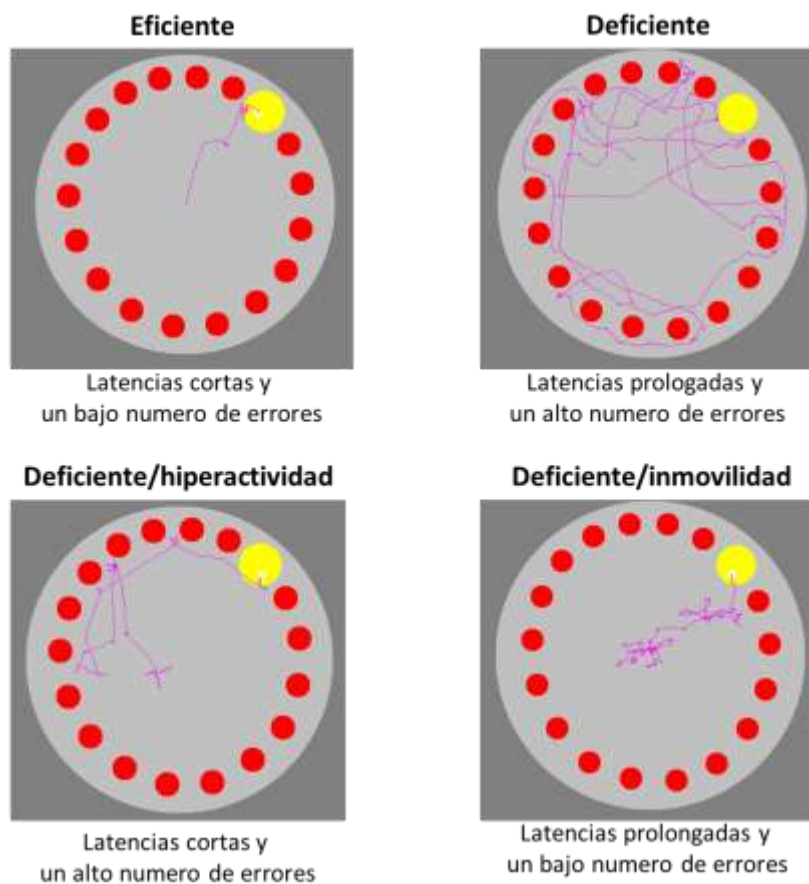


Fig. 24. Trazo representativo del recorrido realizado por un ratón con un desempeño eficiente, deficiente, deficiente con tendencia a la hiperactividad o deficiente con tendencia a la inmovilidad, durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes.

Primero, determinamos el efecto de la DSC durante la adolescencia temprana sobre el desempeño presentado los ratones adolescentes durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes (Fig. 25) y encontramos que a pesar de que el porcentaje de

ratones con un desempeño eficiente fue mayor en el grupo control comparado con el grupo derrotado (57% vs 37%) no alcanzo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.057$). En cuanto al desempeño deficiente ($p=0.329$), deficiente con tendencia a la inmovilidad ($p=0.237$) y deficiente con tendencia a la hiperactividad ($p>0.999$) tampoco encontramos diferencias significativas entre ambos grupos.

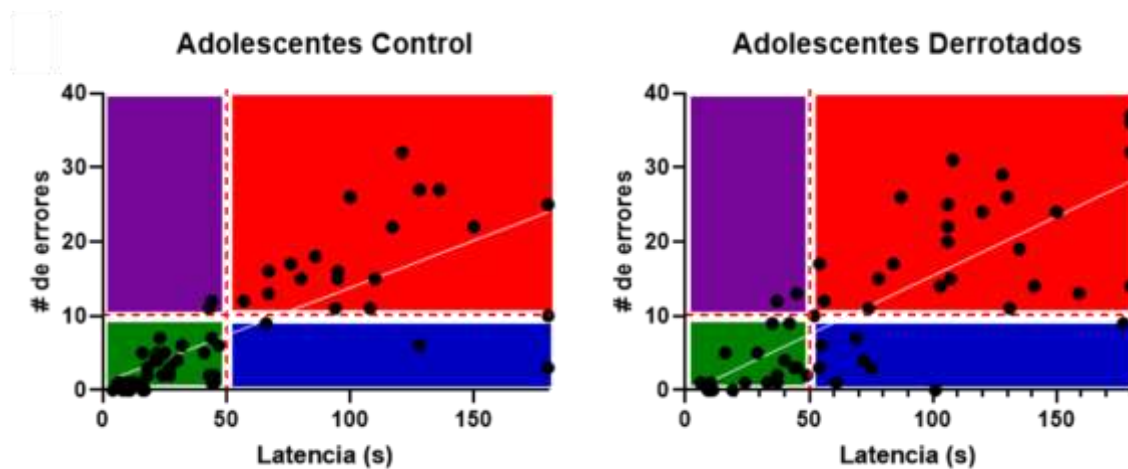


Fig. 25. Categorización del desempeño presentado por lo ratones adolescentes, control y derrotados, durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes. Cada circulo negro representa la intersección entre la latencia primaria y el número de errores de un ratón en cada uno de los ensayos. Eficiente (57% vs 37%), no eficiente (32% vs 43%), no eficiente con tendencia a la inmovilidad (7% vs 16%) y no eficiente con tendencia a la hiperactividad (4% vs 4%); control vs derrotado. Prueba de Chi cuadrada.

Segundo, determinamos el efecto de la DSC durante la adolescencia temprana sobre el desempeño presentado por los ratones adultos durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes (Fig. 26) y encontramos que el porcentaje de ratones que presentaron un desempeño eficiente fue significativamente mayor en el grupo control comparado con el grupo derrotado (86% vs 59%, $p=0.002$). A pesar de que el porcentaje de ratones con un desempeño deficiente con tendencia a la inmovilidad y deficiente con tendencia a la hiperactividad fue mayor en el grupo derrotado (0% vs 9% y 3% vs 16%, respectivamente) no alcanzaron una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.056$ y $p=0.052$, respectivamente). En cuanto al desempeño deficiente tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0.580$).

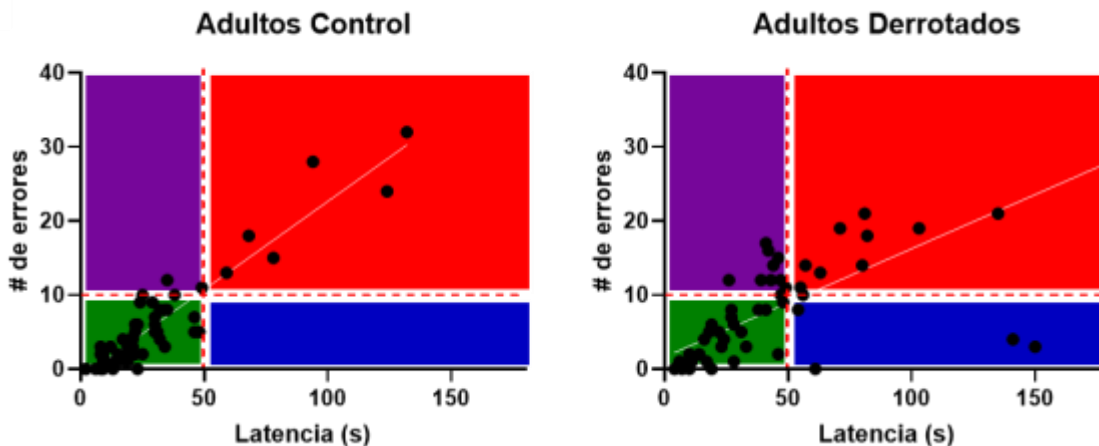


Fig. 26. Categorización del desempeño presentado por los ratones adultos, control y derrotados, durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes. Cada círculo negro representa la intersección entre la latencia primaria y el número de errores de un ratón en cada uno de los ensayos. Eficiente (86% vs 59%), no eficiente (11% vs 16%), no eficiente con tendencia a la inmovilidad (0% vs 9%) y no eficiente con tendencia a la hiperactividad (3% vs 16%); control vs derrotado. Prueba de Chi cuadrada.

Tercero, determinamos el efecto de la edad sobre el desempeño presentado por los ratones control durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes (Fig. 27) y encontramos que el porcentaje de ratones que presentaron un desempeño eficiente fue significativamente menor en el grupo control adolescente comparado con el grupo control adulto (57% vs 86%, $p=0.001$). Por el contrario, el porcentaje de ratones que presentaron un desempeño deficiente fue significativamente mayor en el grupo control adolescente comparado con el grupo control adulto (32% vs 11%, $p=0.010$). En cuanto al desempeño deficiente con tendencia a la inmovilidad y deficiente con tendencia a la hiperactividad no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0.118$ y $p>0.999$, respectivamente).

Por último, determinamos el efecto de la edad sobre el desempeño presentado por los ratones derrotados durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes (Fig. 28) y encontramos que el porcentaje de ratones que presentaron un desempeño eficiente fue significativamente menor en el grupo adolescente derrotado comparado con el grupo adulto derrotado (37% vs 59%, $p=0.018$). Por el contrario, el porcentaje de ratones que presentaron un desempeño deficiente fue significativamente mayor en el grupo adolescente derrotado comparado con el grupo adulto derrotado (43% vs 16%, $p=0.001$). A pesar de que el desempeño deficiente con tendencia a la hiperactividad fue

menor en el grupo adolescente derrotado (4%) comparado con el grupo adulto derrotado (16%) no alcanzo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.052$). En cuanto al desempeño deficiente con tendencia a la inmovilidad no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0.392$).

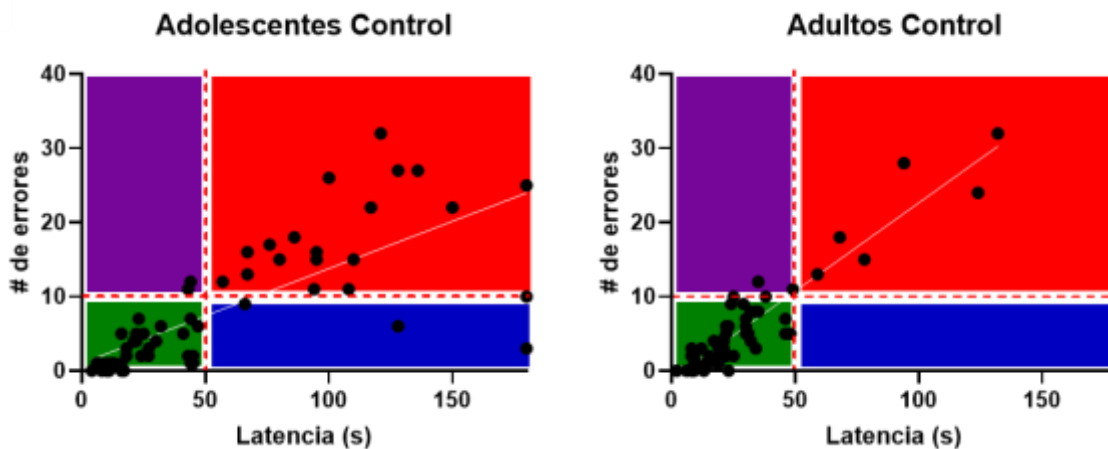


Fig. 27. Categorización del desempeño presentado por los ratones control, adolescentes y adultos, durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes. Cada círculo negro representa la intersección entre la latencia primaria y el número de errores de un ratón en cada uno de los ensayos. Eficiente (57% vs 86%), no eficiente (32% vs 11%), no eficiente con tendencia a la inmovilidad (7% vs 0%) y no eficiente con tendencia a la hiperactividad (4% vs 3%); adolescentes vs adultos. Prueba de Chi cuadrada.

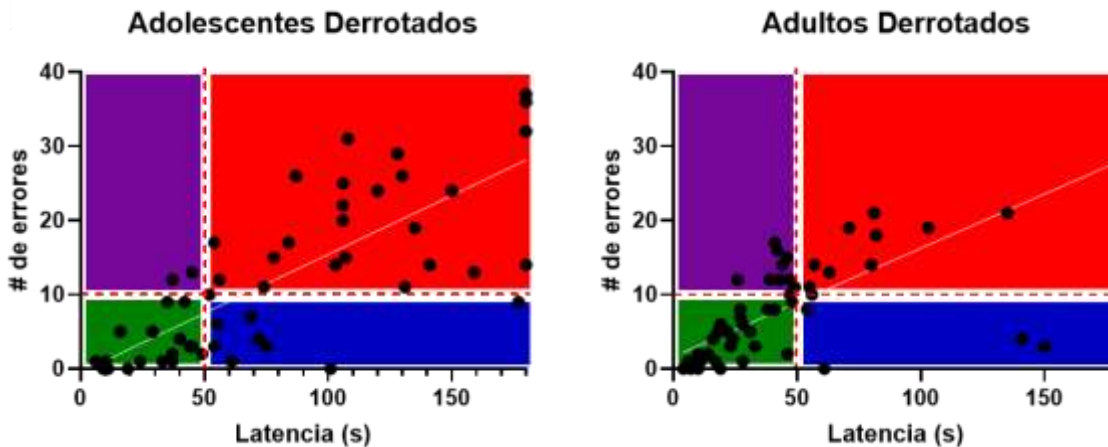


Fig. 28. Categorización del desempeño presentado por los ratones derrotados, adolescentes y adultos, durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes. Cada círculo negro representa la intersección entre la latencia primaria y el número de errores de un ratón en cada uno de los ensayos. Eficiente (37% vs 59%), no eficiente (43% vs 16%), no eficiente con tendencia a la inmovilidad (16% vs 9%) y no eficiente con tendencia a la hiperactividad (4% vs 16%); adolescentes vs adultos. Prueba de Chi cuadrada.

8.5. Experimento 5. La DSC durante la adolescencia temprana incrementó la concentración sérica de corticosterona y disminuyó la concentración sérica de testosterona durante la transición de adolescencia a edad adulta. en la adolescencia media y en la edad adulta. Además, la DSC durante la adolescencia temprana revirtió la correlación negativa entre ambas hormonas observada en los ratones control.

El ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló que la concentración sérica de corticosterona (Fig. 29A) se afectó por la exposición a la DSC ($F_{8, 16} = 77.41, p=0.012$) y por la edad de los ratones ($F_{8, 16} = 54.46, p<0.001$) y hubo interacción entre ambos factores ($F_{8, 16} = 6.258, p<0.001$). El análisis post hoc demostró una reducción significativa en los niveles de esta hormona a partir del DPN40 y hasta el DPN65 en los ratones control y a partir del DPN45 y hasta el DPN65 en los ratones derrotados, en ambos casos la comparación se realizó con la respectiva concentración sérica de corticosterona presentada por ambos grupos en el DPN25.

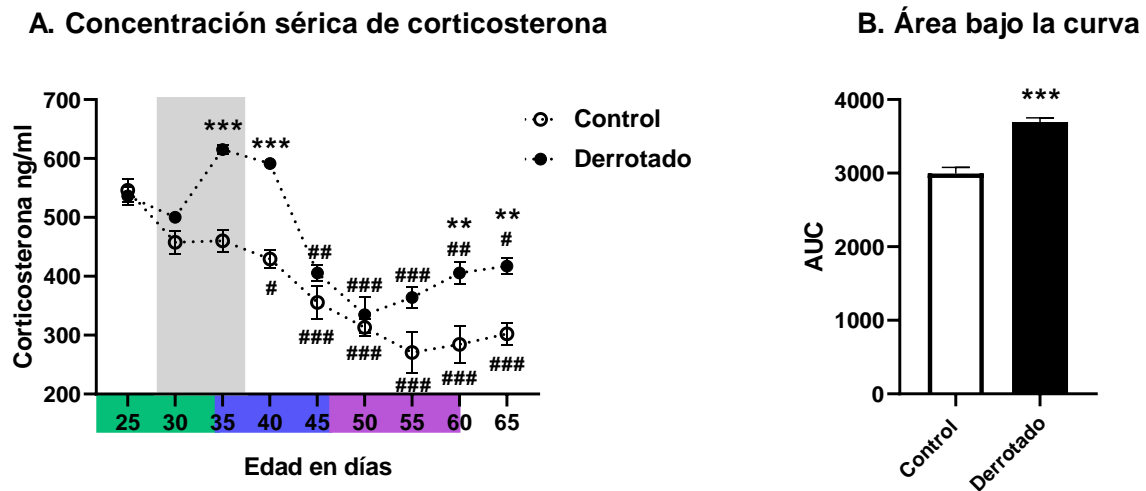


Fig. 29. Concentración sérica de corticosterona antes, durante y después de la exposición a la DSC (A) y el área bajo la curva de este gráfico (B). Se presenta la media \pm SEM de la concentración sérica de corticosterona (ng/ml). Área sombreada gris corresponde al protocolo de DSC. Adolescencia temprana color verde, adolescencia media color azul y adolescencia tardía color morado. (A) ANOVA de dos vías de medidas repetidas *** $p<0.001$, ** $p<0.01$ y * $p<0.05$ vs control, ### $p<0.001$, ## $p<0.01$ y # $p<0.05$ vs día 25 (control o derrotado); (B) t de Student *** $p<0.001$. $n=3$ por grupo para cada una de las edades (grupos independientes).

Además, demostró un incremento significativo en la concentración sérica de corticosterona en la adolescencia media [DPN35 ($p < 0.001$) y 40 ($p < 0.001$)] y en la edad adulta [DPN60 ($p = 0.009$) y 65 ($p = 0.014$)] en los ratones derrotados comparados con los ratones control. Al analizar el área bajo la curva de la concentración sérica de corticosterona (Fig. 29B), encontramos un incremento significativo de ésta en los ratones derrotados comparados con los ratones control ($t_{[46]} = 7.039$, $p < 0.001$).

En el análisis de regresión lineal encontramos que la concentración sérica de corticosterona se correlacionó linealmente con la edad de los ratones, tanto controles ($F_{1, 25} = 89.87$, $p < 0.001$, $R_2 = 0.782$) como derrotados ($F_{1, 25} = 20.26$, $p < 0.001$; $R_2 = 0.447$). En ambos casos, los ratones de mayor edad presentaron las concentraciones séricas de corticosterona más bajas (Fig. 30). No encontramos diferencias significativas entre las pendientes del grupo control y del grupo derrotado ($F_{1,50} = 1.408$, $p = 0.241$). Sin embargo, encontramos una diferencia significativa entre las intersecciones de cada pendiente ($F_{1,51} = 23.62$, $p < 0.001$). Por último, utilizamos la ecuación obtenida de la regresión lineal en los ratones derrotados ($y = -5.065 * X + 691$) y estimamos que, los ratones derrotados podrían alcanzar la concentración sérica de corticosterona observada en los ratones control en el DPN65 (302.1 ± 19.15 ng/ml), aproximadamente hasta el DPN 73 ± 7 .

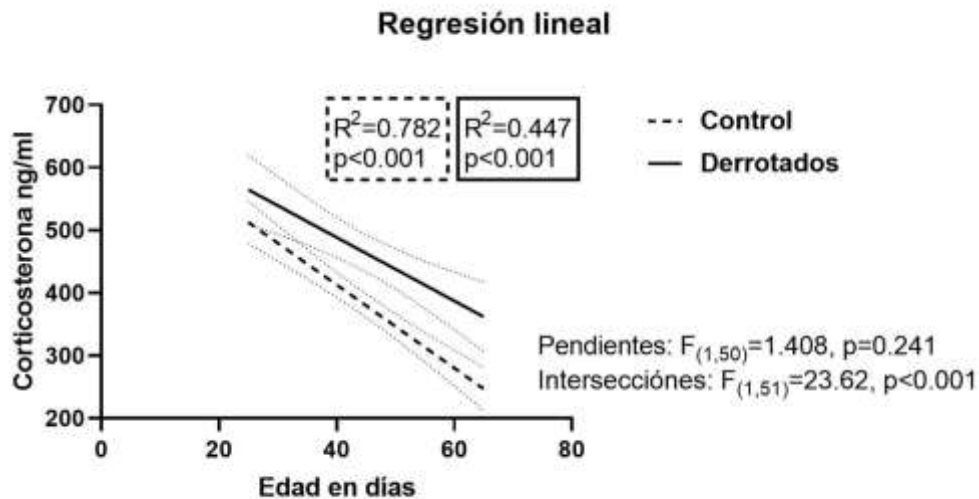


Fig. 30. Regresión lineal entre la concentración sérica de corticosterona y la edad de los ratones control (línea punteada) y derrotados (línea negra continua).

El ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló que la concentración sérica de testosterona (Fig. 31A) se afectó por la exposición a la DSC ($F_{8, 16} = 37.39$, $p=0.025$) y por la edad de los ratones ($F_{8, 16} = 14.68$, $p<0.001$) y hubo interacción entre ambos factores ($F_{8, 16} = 10.10$, $p<0.001$). El análisis post hoc demostró un incremento significativo en los niveles de esta hormona a partir del DPN40 y hasta el DPN65 en los ratones control, mientras que este incremento se desplazó hacia la derecha, a partir del DPN60 y hasta el DPN 65 en los ratones derrotados; en ambos casos la comparación se realizó con la respectiva concentración sérica de testosterona presentada por ambos grupos en el DPN25. Además, demostró una disminución significativa en la concentración sérica de testosterona durante la adolescencia media [DPN40 ($p<0.001$) y 45 ($p=0.014$)] y el inicio de la adolescencia tardía [DPN50 ($p=0.041$)] en los ratones derrotados comparados con los ratones control. Al analizar el área bajo la curva de la concentración sérica de testosterona (Fig. 31B), encontramos una disminución significativa de esta en los ratones derrotados comparados con los ratones control ($t_{[46]} = 5.822$, $p<0.001$).

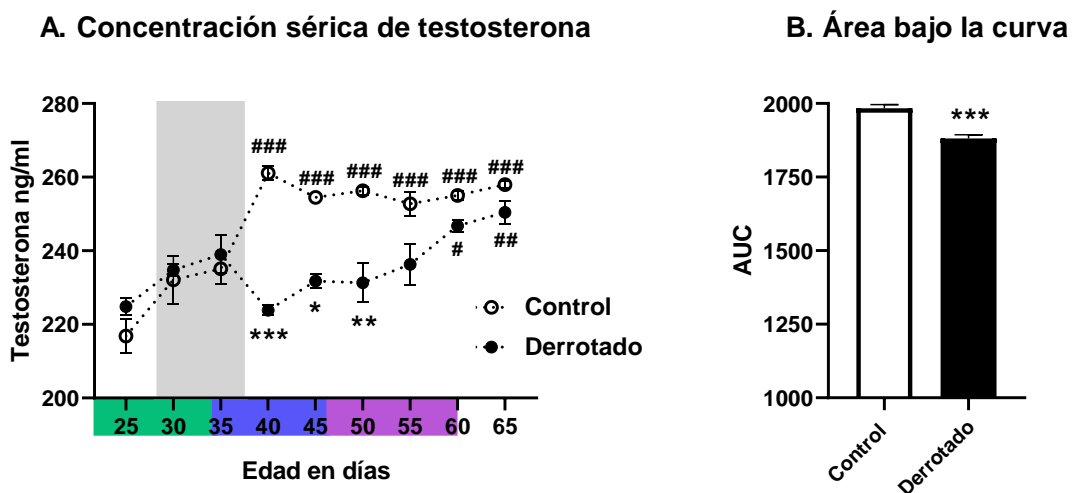


Fig. 31. Concentración sérica de testosterona antes, durante y después de la exposición a la DSC (A) y el área bajo la curva de este grafico (B). Se presenta la media \pm SEM de la concentración sérica de testosterona (ng/ml). Área sombreada color gris corresponde al protocolo de DSC. Adolescencia temprana color verde, adolescencia media color azul y adolescencia tardía color morado. (A) ANOVA de dos vías de medidas repetidas $***p<0.001$, $**p<0.01$ y $*p<0.05$ vs control, $###p<0.001$, $##p<0.01$ y $\#p<0.05$ vs día 25 (control o derrotado); (B) t de Student $***p<0.001$. $n=3$ por grupo para cada una de las edades (grupos independientes).

En el análisis de regresión lineal encontramos que la concentración sérica de testosterona se correlacionó linealmente con la edad de los ratones, tanto controles ($F_{1, 25} = 33.2$, $p < 0.001$, $R_2 = 0.570$) como derrotados ($F_{1, 25} = 15.13$, $p < 0.001$; $R_2 = 0.377$). En ambos casos, los ratones de mayor edad presentaron las concentraciones séricas de testosterona más altas (Fig. 32). Además, encontramos una diferencia significativa entre las pendientes del grupo control y del grupo derrotado ($F_{1,50} = 4.500$, $p = 0.038$). Por último, utilizamos la ecuación obtenida de la regresión lineal en los ratones derrotados ($y = 0.467 * X + 214$) y estimamos que, los ratones derrotados podrían alcanzar la concentración sérica de testosterona observada en los ratones control en el DPN65 (258 ± 1.019 ng/ml), aproximadamente hasta el DPN 94 ± 3 .

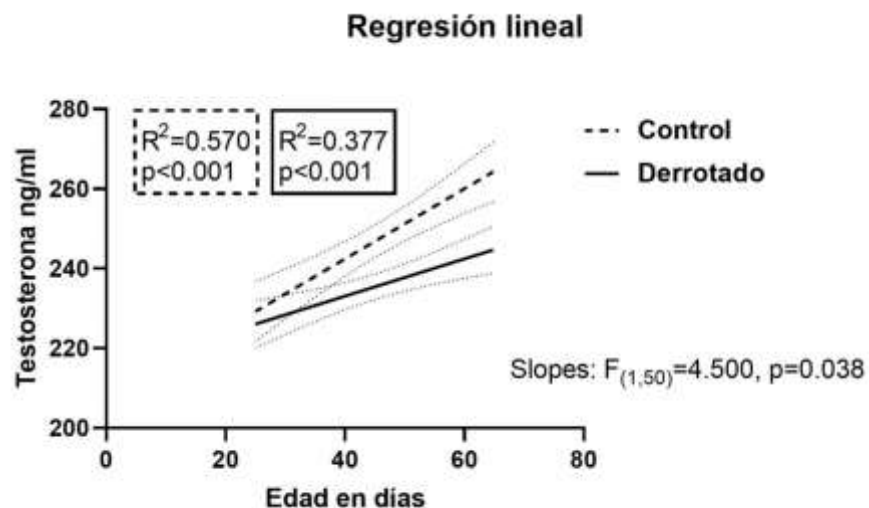


Fig. 32. Regresión lineal entre la concentración sérica de corticosterona y la edad de los ratones control (línea punteada) y derrotados (línea negra continua).

Finalmente, durante la transición de adolescencia a edad adulta (DPN25-65) la prueba de Pearson reveló una correlación negativa entre la concentración sérica de testosterona y corticosterona en los ratones control ($r = -0.792$, $p = 0.019$) (Fig. 33A). En los ratones control con las concentraciones séricas más altas de testosterona se presentaron las concentraciones séricas más bajas de corticosterona y, viceversa, los ratones control con las concentraciones séricas más altas de corticosterona presentaron las concentraciones séricas más bajas de testosterona. Por el contrario,

esta correlación entra las concentraciones séricas de testosterona y corticosterona no se presentó en los ratones derrotados ($r=-0.329$, $p=0.425$) (Fig. 33B).

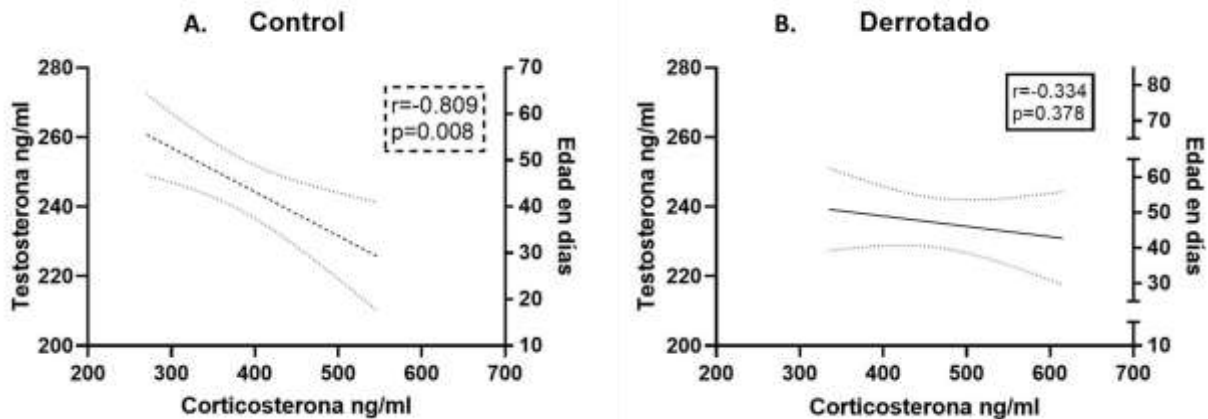


Fig. 33. Correlación entre las concentraciones séricas de testosterona y corticosterona en ratones control (A) y en ratones derrotados (B). Prueba de Pearson, $n=3$ por grupo.

9. Discusión.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que la DSC durante la adolescencia temprana favoreció el desarrollo de conductas tipo depresión (aislamiento social y desesperanza) y déficits cognitivos (aprendizaje y memoria visuoespacial) que se mantiene hasta la edad adulta. Además, las conductas tipo depresión se correlacionaron de forma dependiente de la edad con la densidad del SERT en el hipocampo. Los ratones adolescentes derrotados que desarrollaron las conductas tipo depresión más evidentes presentaron una mayor densidad del SERT en el hipocampo. Por el contrario, los ratones adultos derrotados que desarrollaron las conductas tipo depresión más evidentes presentaron una menor densidad del SERT en el hipocampo. Por último, la DSC durante la adolescencia temprana también alteró los niveles de corticosterona y testosterona durante la transición de adolescencia a edad adulta.

Con respecto a las conductas tipo depresión, se ha reportado que la DSC durante la adolescencia induce la conducta de aislamiento social a las 24 horas y hasta por 2, 4 y 6 semanas después de haber cesado el estresor (Huang et al., 2013; Iñiguez et al., 2014, 2016; Zhang et al., 2016; Mouri et al., 2018; Hasegawa et al., 2019), de forma similar a nuestros resultados. Sin embargo, los trabajos previos emplearon ratones de

diferentes cepas (ratones de la cepa C57BL/6 como adolescentes y ratones de la cepa CD-1 como agresores) durante la DSC, además, el ratón desconocido utilizado en la prueba de interacción social pertenecía a la misma cepa del ratón agresor (CD-1) y cumplía con las características de los ratones agresores. Bajo estas condiciones, resulta difícil interpretar si la conducta de aislamiento social es un comportamiento dirigido hacia las características conductuales del ratón desconocido o si es un comportamiento generalizado hacia cualquier tipo de interacción social independientemente de las características conductuales del ratón desconocido. En nuestro trabajo, utilizamos únicamente ratones de la cepa SW (como ratones adolescentes, ratones agresores y ratones desconocidos) y demostramos que la DSC durante la adolescencia temprana favorece el desarrollo de la conducta de aislamiento social hacia un ratón no agresor, de la misma cepa y de la misma edad que el sujeto de estudio. Los efectos de la DSC los observamos tanto a las 24 horas (adolescencia media) como a las 4 semanas (edad adulta) después de haber cesado el estresor. Estos resultados indican que la conducta de aislamiento social es un comportamiento generalizado y de larga duración hacia cualquier tipo de interacción social, que no depende de las características conductuales del ratón desconocido. Además, estos resultados resaltan que la exposición a la DSC durante la adolescencia es un factor relevante para la persistencia de la conducta de aislamiento social.

Con respecto a la conducta de desesperanza inducida por la DSC los reportes publicados son contradictorios y dependen de la edad a la cual los roedores fueron evaluados. Por ejemplo, Krishnan et al. (2007) señalan que los ratones adultos derrotados (C57BL/6) no presentaron la conducta de desesperanza, tanto en la prueba de nado forzado como en la prueba de suspensión de la cola, 24 horas después de haber cesado el estresor (Krishnan et al., 2007). De manera similar, Mouri et al. (2018) reportó que los ratones adolescentes derrotados (C57BL/6) tampoco presentaron la conducta de desesperanza en la prueba de nado forzado, a las 24 horas ni a las 4 semanas después de haber cesado el estresor (Mouri et al., 2018). Por el contrario, otros trabajos señalan que los ratones adolescentes derrotados (C57BL/6) sí desarrollaron la conducta de desesperanza en la prueba de nado forzado (Huang et al., 2013; Iñiguez et al., 2014; Shimizu et al., 2020) y en la prueba de suspensión de la cola

(Iñiguez et al., 2016), sin embargo, en ambos casos esta conducta sólo se estudió a las 24 horas después de haber cesado el estresor. Por lo tanto, nuestro trabajo es el primero en reportar que la DSC durante la adolescencia temprana induce el desarrollo de una conducta de desesperanza a corto y largo plazo en ratones SW, ya que dicha conducta estuvo presente a las 24 horas (adolescencia media) y a las 4 semanas (edad adulta) después de haber cesado el estresor. Estos resultados sugieren que, la cepa de ratón utilizada durante la DSC también debe ser considerada al momento de evaluar la duración y/o la persistencia de las conductas tipo depresión inducidas por este modelo. Además, en cuanto al desarrollo de estas conductas tipo depresión es probable que los ratones de la cepa SW sean más susceptibles que los ratones de la cepa C57BL/6.

Por otro lado, encontramos un incremento dependiente de la edad en la densidad del SERT en la PFC y en el hipocampo de los ratones control, con los ratones control adultos presentando una mayor densidad del SERT que los ratones control adolescentes. En línea con nuestros resultados, Mitchell et al. reportaron que los ratones adultos (hembras y machos) presentan una mayor densidad del SERT en el hipocampo y en la amígdala que los ratones adolescentes (Mitchell et al., 2016) y resultados similares se han descrito en la PFC, la corteza cingulada y el núcleo del rafé de ratas adultas (macho) comparadas con ratas adolescentes (Moll et al., 2000; Bouet et al., 2012). De manera interesante, estos resultados en roedores macho son similares a lo observado en hombres sanos en los cuales existe una correlación positiva entre la edad (media 41.9 ± 11.4 años) y la densidad del SERT (medida por PET) en la amígdala, el núcleo caudado, la corteza frontal, la ínsula y el putamen, con los hombres de mayor edad presentando las densidades más altas de SERT (Selvaraj et al., 2011). A pesar de que la ontogenia del SERT durante la transición de adolescencia a edad adulta ha sido poco estudiada, la evidencia acumulada y nuestros resultados indican que al menos en hombres y roedores macho existe un incremento dependiente de la edad en la densidad del SERT en áreas de proyección serotoninérgica como la PFC, el hipocampo y la amígdala. Dado que la activación del sistema serotoninérgico es un elemento altamente conservado de la respuesta al estrés (McKittrick et al., 2000; Stamper et al., 2017), creemos que este incremento dependiente de la edad en la densidad del SERT podría ir de la mano de la maduración de la respuesta al estrés (ver

más adelante), lo cual también ocurre en los ratones macho durante la transición de adolescencia a edad adulta. Sin embargo, es necesario que otros trabajos evalúen a fondo esta propuesta.

Con respecto a la interacción entre la exposición crónica al estrés y el SERT, trabajos previos han demostrado que en roedores la exposición a un día de derrota social incrementa los niveles de 5-HT en el hipocampo (Keeney et al., 2006) y la expresión de la proteína c-fos en el DRN (Cooper et al., 2009), lo que sugiere una mayor actividad del sistema serotoninérgico en respuesta a la agresión recibida (Hammels et al., 2015). Se ha propuesto que esta mayor actividad del sistema serotoninérgico podría desencadenar mecanismos de retroalimentación encargados de normalizar su actividad, uno de estos mecanismos podría ser el incremento en la densidad y/o expresión del SERT (Filipenko et al., 2002; Zhang et al., 2012, 2017), en algunas áreas de proyección serotoninérgica como el hipocampo. En nuestro trabajo encontramos un incremento significativo en la densidad del SERT en el hipocampo dorsal y ventral de los ratones derrotados, 24 horas después de haber cesado el estresor (adolescencia media), comparados con los ratones control. En trabajos previos se han reportado niveles más altos del mRNA del SERT y de la proteína SERT en los núcleos del rafe y sus áreas de proyección como el hipocampo, la corteza frontal y la amígdala de roedores adultos derrotados, 24 horas después de haber cesado el estresor, comparados con roedores control (Filipenko et al., 2002; Zhang et al., 2012, 2017). En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis del incremento en la densidad del SERT, en áreas de proyección serotoninérgica como el hipocampo, en respuesta a la mayor actividad del sistema serotoninérgico inducida por un estresor como la DSC.

Por el contrario, encontramos una menor densidad del SERT en el hipocampo dorsal y ventral de los ratones derrotados, 4 semanas después de haber cesado el estresor (edad adulta), comparados con los ratones control. Aunque no existen trabajos previos que hayan utilizado un enfoque experimental similar, los resultados son comparables y consistentes con trabajos previos en los que se emplearon ratones adultos. Por ejemplo, la DSC (durante 21 días) disminuyó los niveles del mRNA del SERT en los núcleos del rafe (Boyarskikh et al., 2013), el estrés crónico moderado impredecible

(durante 70 días) redujo los niveles de la proteína SERT en el hipocampo (Tang et al., 2013, 2014) y el tratamiento crónico con corticosterona (durante 21-57 días) disminuyó la densidad del SERT en el hipocampo, el estriado, el tálamo y la corteza cerebral (Reisinger et al., 2019). Estos resultados nos indican que, la exposición crónica al estrés u hormonas del estrés son capaces de inducir una reducción del SERT dentro del SNC.

Por lo tanto, proponemos que la regulación al alza en la densidad del SERT, observada durante la adolescencia media (24 horas después de haber cesado el estresor), debería ser interpretada como un mecanismo de retroalimentación negativa en respuesta a la mayor actividad del sistema serotoninérgico provocada por la DSC; mientras que la regulación a la baja en la densidad del SERT, observada durante la edad adulta (4 semanas después de haber cesado el estresor), debería ser interpretada como una maduración prematura de este sistema que no alcanzó el desarrollo normal observado en la edad adulta. Sin embargo, es necesario evaluar la ontogenia del SERT durante la transición de adolescencia a edad adulta a intervalos más cortos para poder comprobar esta propuesta (Fig. 34).

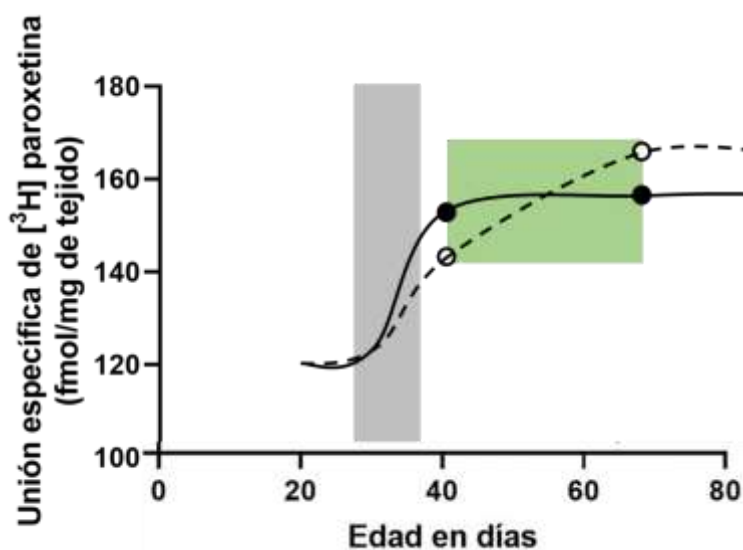


Fig. 34. Propuesta de la ontogenia del SERT durante la transición de adolescencia a edad adulta después de la exposición a la DSC durante la adolescencia temprana (barra gris). Los círculos blancos y negros representan la edad (DPN41 y 69) a la que determinamos la densidad del SERT en el hipocampo de los ratones control (línea punteada) y derrotados (línea continua), respectivamente. El área en color verde representa el intervalo en cual sería necesario evaluar la densidad del SERT para comprobar nuestra propuesta.

En nuestro conocimiento, este trabajo fue el primero en evaluar si las conductas tipo depresión inducidas por la DSC durante la adolescencia temprana se correlacionaron con cambios en la densidad del SERT en el hipocampo. Se ha descrito que el hipocampo dorsal realiza funciones cognitivas, mientras que el hipocampo ventral está relacionado con la respuesta al estrés, la emoción y el afecto (Fanselow and Dong, 2010), por lo tanto, decidimos evaluar la densidad del SERT en ambas estructuras. En la adolescencia media encontramos una correlación entre las conductas tipo depresión y la densidad del SERT en el hipocampo dorsal y ventral, en la cual los ratones con las conductas tipo depresión más evidentes (menor tasa de interacción social y mayor número de cuentas de la conducta de inmovilidad) presentaron las densidades más altas del SERT en ambos hipocampos. Nuestros resultados son similares a lo reportado en niños y adolescentes con depresión (de 7 a 17 años), en los cuales se encontró una mayor densidad del SERT (medida por tomografía por emisión de un solo fotón) en el área hipotalámica/mesencefálica al compararse con controles no deprimidos (Dahlström et al., 2000).

Por otro lado, en la edad adulta también encontramos una correlación entre las conductas tipo depresión y la densidad del SERT en el hipocampo dorsal y ventral, en la cual los ratones con las conductas tipo depresión más evidentes (menor tasa de interacción social y mayor número de cuentas de la conducta de inmovilidad) presentaron las densidades más bajas del SERT en ambos hipocampos. En línea con nuestros resultados, se ha reportado que en ratas macho adultas la anhedonia y la conducta de desesperanza inducidas por el estrés crónico moderado impredecible y por el tratamiento crónico con corticosterona, respectivamente, se relaciona con niveles bajos de la proteína del SERT en el hipocampo (Tang et al., 2013, 2014). Estos resultados son similares a lo encontrado en humanos con depresión, en los cuales se reportó una correlación negativa entre la densidad del SERT en la corteza frontal (medida por PET) y la sintomatología de pacientes adultos deprimidos, en la cual los sujetos con mayor sintomatología depresiva presentaron las densidades más bajas del SERT (Selvaraj et al., 2011).

En conjunto, estos resultados resaltan que la densidad y/o expresión del SERT puede ser modificada por la exposición crónica al estrés y/o las hormonas del estrés y que estos cambios dependerán en gran medida de la edad en la cual se realice la exposición al estrés y la edad en la cual se realice la determinación del SERT. Además, nos indican que tanto los cambios al alza como a la baja en la densidad del SERT están relacionados con el desarrollo y la persistencia de las conductas tipo depresión y/o síntomas depresivos. De hecho, en los humanos la reducción en la densidad del SERT dentro del SNC ha sido sugerida como un biomarcador putativo de depresión (Selvaraj et al., 2011; Newberg et al., 2012), ya que diferentes estudios de neuroimagen han reportado que en pacientes deprimidos no medicados existe una reducción significativa en la densidad del SERT en el tallo cerebral, el mesencéfalo, los ganglios basales, el tálamo, la amígdala, el lóbulo temporal media, la corteza cingulada anterior y la corteza frontal, comparados con controles sanos (Malison et al., 1998; Parsey et al., 2006; Joensuu et al., 2007; Selvaraj et al., 2011; Newberg et al., 2012). Si bien, la menor densidad del SERT en el hipocampo no es un reflejo directo del número de fibras serotoninérgicas que proyectan a esta área, si es un indicador de la actividad y cinética de la neurotransmisión serotoninérgica, la cual se encontraría mermada tanto en los pacientes adultos deprimidos como en los ratones adultos que desarrollaron las conductas tipo depresión.

Es importante señalar que no encontramos diferencias significativas en la densidad del SERT en la PFC de los ratones control y derrotados, ni en la adolescencia media ni en la edad adulta. Aunque nuestros resultados son similares a lo reportado en niños y adolescentes deprimidos no medicados en los cuales no se presentaron cambios en la densidad del SERT en la PFC (Dahlström et al., 2000), también difieren de la menor densidad del SERT reportada en la corteza frontal de adultos deprimidos no medicados (Selvaraj et al., 2011) y de la mayor densidad del SERT encontrada en la corteza frontal de roedores adultos derrotados (Zhang et al., 2012). Creemos que al menos en los roedores, la edad a la cual el estresor fue aplicado (adolescencia temprana vs edad adulta) podría ser responsable de estos resultados contradictorios observados en la densidad del SERT. Por lo tanto, trabajos futuros deberían investigar la ontogenia del SERT dentro de la PFC durante la transición de adolescencia a edad adulta, ya que

como mencionamos anteriormente la PFC experimenta grandes cambios durante esta etapa de la vida.

Por otro lado, los deterioros en el aprendizaje y la memoria visuoespacial son déficits cognitivos observados con frecuencia en las personas deprimidas (Bourke et al., 2012). Encontramos que la DSC durante la adolescencia temprana provocó un deterioro en el aprendizaje y la memoria de largo plazo durante la adolescencia media (DPN39-42) y tardía (DPN50), respectivamente. Similar a nuestros resultados, las ratas estresadas durante la adolescencia temprana presentaron deterioros en el aprendizaje y en la memoria de corto plazo tanto en el laberinto de Barnes (Kim et al., 2017) como en el laberinto de Morris (Jianhua et al., 2017), evaluadas durante la adolescencia tardía en ambos casos. Sin embargo, contrario a nuestros resultados las ratas estresadas durante la adolescencia temprana no presentaron deterioros cognitivos en el laberinto de Morris al ser evaluadas durante la adolescencia tardía (Isgor et al., 2004). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio también han arrojado resultados contradictorios al evaluar el aprendizaje y la memoria visuoespacial en el laberinto de Barnes en ratas adolescentes. De forma interesante, cuando comparamos el desempeño de los ratones adolescentes control y los ratones adultos control durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes, encontramos que el porcentaje de ratones con un desempeño eficiente fue mayor en los ratones adultos que en los adolescentes. Este resultado indica que el desempeño de los roedores en el laberinto de Barnes podría ser influenciado por la edad de los animales evaluados, lo que podría explicar los resultados contradictorios ya mencionados. Sin embargo, esta propuesta debe ser tomada con cautela ya que no existe en la literatura un análisis del desempeño similar al utilizado en este trabajo y, por lo tanto, futuros trabajos deberían centrarse en este aspecto tan relevante para el estudio de las alteraciones cognitivas inducidas por la exposición crónica al estrés en etapas críticas del neurodesarrollo, como la adolescencia.

En nuestro trabajo, encontramos que la DSC durante la adolescencia temprana también provocó un deterioro duradero en el aprendizaje (DPN67-70) y la memoria de corto (DPN71) y de largo plazo (DPN78), los cuales fueron evidentes durante la edad

adulta. En línea con nuestros resultados, las ratas adolescentes expuestas a estrés físico durante la adolescencia temprana presentaron deterioros en el aprendizaje y la memoria de corto plazo en el laberinto de Morris (Isgor et al., 2004), y las ratas adolescentes expuestas a estrés por restricción durante la adolescencia media, también presentaron deterioros en la memoria de corto plazo en el laberinto de Barnes (Trofimiuk et al., 2019), al ser evaluadas durante la edad adulta en ambos casos. Además, las ratas adultas tratadas de forma crónica con corticosterona presentaron deterioros en el aprendizaje y la memoria de corto y de largo plazo en el laberinto de Barnes (McLay et al., 1998; Darcet et al., 2014). Si bien el laberinto de Barnes y el laberinto de Morris difieren en diseño, procedimiento y experiencia estresante, ambos laberintos evalúan el aprendizaje y la memoria visuoespacial dependiente del hipocampo, por lo tanto, estos resultados demuestran que la exposición crónica al estrés y/o a las hormonas del estrés durante la adolescencia, tiene efectos deletéreos y de larga duración sobre los procesos de aprendizaje y de memoria visuoespacial.

Si bien la respuesta al estrés es un proceso adaptativo, la activación inadecuada, excesiva o prolongada del eje HHA provocará una mayor carga alostática y efectos fisiológicos deletéreos en el organismo (De Kloet et al., 2005; Green and McCormick, 2016). Por tal motivo, el organismo necesita desarrollar estrategias de afrontamiento efectivas que le permitan eliminar, evitar, dominar, minimizar o tolerar las demandas exigidas por un estresor (Puglisi-Allegra and Andolina, 2015). Los humanos han desarrollado un gran número de estrategias de afrontamiento al estrés, las cuales se pueden agrupar en dos categorías. La primera categoría (enfocada hacia el problema) incluye respuestas conductuales y fisiológicas que favorecen la eliminación o evitación del estresor y la segunda categoría (orientada emocionalmente) incluye estrategias destinadas a reducir o mantener al mínimo el impacto emocional del estresor (Puglisi-Allegra and Andolina, 2015). A estas estrategias también se les conoce como afrontamiento activo o afrontamiento pasivo, con base en la presencia (activo) o ausencia (pasivo) de intentos de actuar sobre el estresor (Puglisi-Allegra and Andolina, 2015). Estrategias de afrontamiento similares han sido descritas en animales observados en entornos naturales y en el laboratorio.

Nuestro análisis del desempeño durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes nos permitió observar la presencia de dos posibles estrategias de afrontamiento que, a pesar de no alcanzar una diferencia estadísticamente significativa, fueron más evidentes en los ratones adultos derrotados. Una estrategia de afrontamiento activo en la cual los ratones presentaron latencias cortas y cometieron muchos errores (deficiente con tendencia a la hiperactividad) y una estrategia de afrontamiento pasivo en la cual los ratones presentaron latencias largas y cometieron pocos errores (deficiente con tendencia a la inmovilidad). Durante el afrontamiento activo los ratones lograron el objetivo de la prueba (localizar el agujero que conduce al cajón de escape) en poco tiempo a pesar de cometer muchos errores (hiperactividad), por lo tanto, creemos que estos ratones tratan de eliminar o evitar el estresor (campo abierto, luz y ruido blanco). Por el contrario, durante el afrontamiento pasivo los ratones no logran o invierten demasiado tiempo en alcanzar el objetivo de la prueba a pesar de cometer pocos errores (inmovilidad), lo que nos indica que estos ratones solamente tratan de reducir o mantener al mínimo el impacto emocional del estresor. En trabajos previos realizados en el laboratorio, encontramos que la DSC no afecta la actividad locomotora de los ratones derrotados (velocidad y distancia recorrida en campo abierto), por lo tanto, podemos descartar que tanto la hiperactividad como la inmovilidad encontrada en los ratones adultos derrotados pudiera ser debida a una afectación locomotora inducida por la DSC. Por lo tanto, creemos que el análisis de las estrategias de afrontamiento durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes podría arrojar resultados interesantes en el estudio de las diferentes estrategias de afrontamiento adoptadas por roedores sometidos al estrés crónico durante la adolescencia temprana.

Se sabe que la hiperactividad del eje HHA inducida por la exposición crónica al estrés tiene efectos negativos sobre el desempeño cognitivo de humanos y roedores (Darcet et al., 2014). En nuestro trabajo, los déficits cognitivos que observamos en los ratones adolescentes (DPN39-50) y adultos (DPN67-78) derrotados fueron precedidos por niveles séricos de corticosterona elevados en los DPN35-40 y DPN60-65, respectivamente. Los niveles séricos de corticosterona que encontramos elevados en los ratones adolescentes derrotados (DPN35-40) podrían ser parte de la respuesta al estrés, ya que esta elevación se presentó durante los últimos días de la DSC y en los

primeros días posteriores al cese de ésta. Por otro lado, los niveles séricos de corticosterona que encontramos elevados en los ratones adultos derrotados (DPN60-65), entre 3-4 semanas después de haber cesado la DSC y de haber permanecido en reposo, podrían ser reflejo de una hiperactividad del eje HHA. Esto último coincide con la hiperactividad del eje HHA encontrada en un elevado porcentaje de pacientes con depresión (Ferrari and Villa, 2016; Jeon and Kim, 2016). Al compararse con controles sanos, un elevado porcentaje de personas con depresión presenta niveles altos de cortisol en saliva, plasma y orina; niveles elevados de CRH en líquido cefalorraquídeo (LCR); un aumento en el tamaño de la hipófisis y las glándulas adrenales, así como una mayor funcionalidad de estas estructuras en respuesta a pruebas de estimulación con CRH y ACTH, respectivamente; y un deterioro en la respuesta de supresión de cortisol ante un desafío con dexametasona (Nemeroff and Vale, 2005; Ferrari and Villa, 2016; Jeon and Kim, 2016). Por lo tanto, nuestros resultados evidencian los efectos negativos y de largo plazo de la exposición crónica al estrés durante la adolescencia temprana sobre la funcionalidad del eje HHA y, además, le añaden mayor validez de apariencia al modelo de DSC.

Con respecto a la interacción entre el eje HHA y el SERT, un trabajo previo demostró que los ratones con una reducción y/o una ausencia del SERT (SERT +/- y/o SERT -/-, respectivamente) presentaron una mayor sensibilidad al estrés, en comparación con los ratones control (SERT +/+) (Jiang et al., 2009). Por lo tanto, creemos que la menor densidad del SERT encontrada en el hipocampo de los ratones adultos derrotados podría contribuir a la hiperactividad del eje HHA observada en estos animales. Sin embargo, no podemos descartar que la menor densidad del SERT encontrada en el hipocampo de los ratones adultos derrotados pudiera efecto deletéreo a largo plazo inducido por la DSC durante la adolescencia temprana, ya que en un trabajo previo se demostró que el tratamiento crónico con corticosterona fue capaz de disminuir la densidad del SERT en el hipocampo, el estriado, el tálamo y la corteza cerebral de ratones adultos (Reisinger et al., 2019). En conjunto, estos resultados demuestran que la interacción entre el eje HHA y el SERT es un punto clave en el estudio de la depresión inducida por el estrés.

Como ya se mencionó, el hipocampo es una estructura que presenta un perfil de desarrollo único durante la adolescencia y que, además, es sensible a los efectos del estrés crónico (Lupien et al., 2009; Romeo, 2016). El estrés crónico durante la adolescencia reduce la ramificación dendrítica de las neuronas piramidales del hipocampo en ratas macho y hembra (Eiland and Romeo, 2013). Además, el estrés crónico ralentiza el desarrollo normal de la capa piramidal y granular del hipocampo durante la transición de la adolescencia a edad adulta en ratas macho (Isgor et al., 2004). Uno de los hallazgos neuroanatómicos más frecuentemente encontrados en personas con depresión es un menor volumen hipocampal, el cual tiene una correlación negativa con la duración de la depresión (Bremner et al., 2000; Sheline et al., 2003). Si bien en nuestro trabajo no se evaluó directamente la morfología del hipocampo, sí encontramos que los mayores cambios en la densidad del SERT ocurrieron en esta área. Por lo tanto, creemos que los cambios neuroanatómicos y funcionales en el hipocampo, inducidos por la DSC durante la adolescencia temprana, podrían estar relacionados con las alteraciones conductuales observadas en los ratones derrotados.

Por otro lado, se sabe que las hormonas gonadales afectan la actividad del eje HHA tanto en humanos como en roedores (Oyola and Handa, 2017). Por ejemplo, el patrón general de la respuesta al estrés se caracteriza por una disminución en la reactividad del eje HHA al estrés conforme los individuos transitan a través de la adolescencia (Romeo, 2010). De forma interesante, encontramos que la concentración sérica de corticosterona se correlacionó de forma negativa con la edad de los ratones, tanto controles como derrotados, durante la transición de adolescencia temprana a la edad adulta. En ambos casos, los ratones de mayor edad presentaron las concentraciones séricas de corticosterona más bajas. Este resultado nos indica que independientemente de la DSC, se presentó una reducción en la actividad del eje HHA de los ratones (control y derrotados) durante la transición de adolescencia a edad adulta. Sin embargo, en los ratones derrotados encontramos una elevación significativa en la concentración sérica de corticosterona durante la adolescencia media (DPN35 y 40), la cual creemos que podría explicar la reducción en la concentración sérica de testosterona observada durante la adolescencia media y tardía (DPN40, 45 y 50) en estos mismos ratones. Trabajos previos han demostrado que, el hecho de experimentar

una derrota (perder una competencia entre humanos y/o perder una confrontación física entre roedores) provocó una reducción significativa en los niveles de testosterona (Schuurman, 1980; Blanchard et al., 1993; Maner et al., 2008). Además, se ha reportado que los roedores macho expuestos a la DSC durante la adolescencia temprana o la edad adulta presentan una reducción significativa en los niveles plasmáticos de testosterona al ser evaluados en la adolescencia media (Wommack et al., 2004) o en la edad adulta (Huhman et al., 1991; Rygula et al., 2006; Buwalda et al., 2010), respectivamente comparados con su respectivo grupo control. Por último, en ratas macho adultas el estrés crónico moderado impredecible provocó un incremento significativo en los niveles séricos de corticosterona y al mismo tiempo una disminución significativa en los niveles séricos de testosterona, así como disfunción testicular (Lu et al., 2015; Sakr et al., 2015).

Respecto al mecanismo a través del cual la corticosterona podría reducir los niveles de testosterona, se sabe que los estresores (físicos y psicológicos) pueden interrumpir temporalmente la actividad del generador de pulsos de GnRH (Zavala et al., 2020) y, en este contexto, las neuronas GnIH son un importante integrador de la supresión de la actividad del eje HHG. Primero, en ratas macho el estrés por inmovilización (agudo y crónico) incrementó la expresión del mRNA de la GnIH en el DMN, suprimiendo la actividad del eje HHG en estos animales, además, el incremento del mRNA de la GnIH se correlacionó negativamente con los niveles plasmáticos de la LH (Kirby et al., 2009). Segundo, se ha reportado que hasta la mitad de las neuronas GnIH expresan GR's cuya activación induce un incremento en la expresión de la GnIH y esta última regula a la baja de la actividad del eje HHG (Iwasa et al., 2018; Tsutsui and Ubuka, 2020). Tercero, se sabe que tanto el estrés crónico como los glucocorticoides son capaces de inhibir la síntesis testicular de testosterona mediante la inducción de apoptosis de las células de Leydig (Hardy et al., 2005; Toufexis et al., 2014). Por último, diferentes tipos de estrés y/o las hormonas del estrés son capaces de disminuir tanto el mRNA de la kisspeptina como la actividad de las neuronas kisspeptinérgicas en el hipotálamo (Acevedo-Rodriguez et al., 2018; Iwasa et al., 2018), lo que se traduciría en una menor activación de la neuronas GnRH hipotalámicas y, en consecuencia, una menor actividad del eje HHG. De forma interesante, la afectación de la actividad de las

neuronas kisspeptinérgicas sólo se presentó bajo situaciones de estrés crónico y/o severo (Iwasa et al., 2018). En conjunto, estas evidencias sugieren que el estrés y/o las hormonas del estrés son capaces de regular a la baja y a diferentes niveles la actividad del eje HHG (Fig. 35).

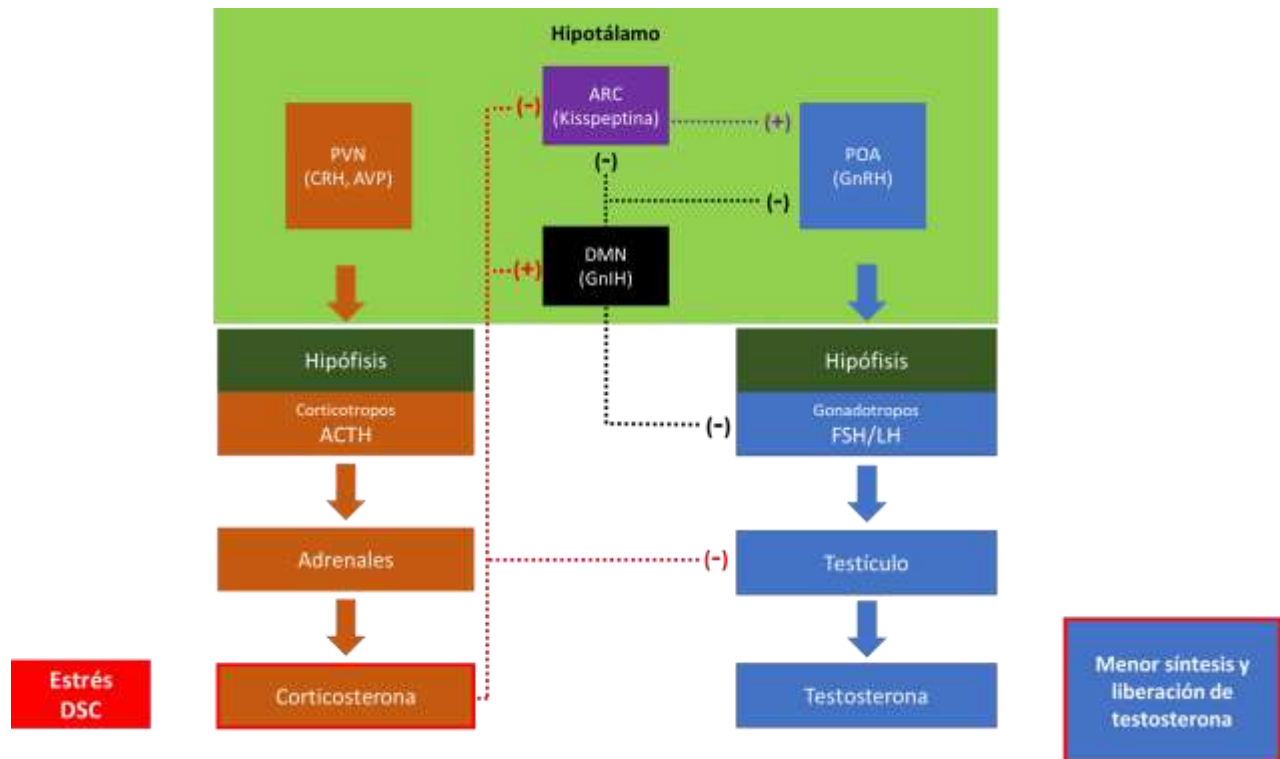


Fig. 35. Esquema que muestra la inhibición central y periférica inducida por la corticosterona (línea punteada roja) sobre la actividad del eje HHG. A nivel central la corticosterona actúa sobre los núcleos ARC y DMN del hipotálamo, en el primero disminuye la actividad de las neuronas kisspeptina y el mRNA de la kisspeptina y en el segundo incrementa la liberación de la GnIH, estas acciones provocan la pérdida del efecto estimulante de las neuronas kisspeptina y su neuropéptido sobre las neuronas GnRH (línea punteada morada) y un incremento del efecto inhibitorio de la GnIH a tres niveles del eje HHG (línea punteada negra): en las neuronas kisspeptina (ARC), en las neuronas GnRH (POA) y en los gonadotropos en la hipofisis anterior. A nivel periférico la corticosterona es capaz de inducir apoptosis de las células de Leydig en el testículo induciendo una menor síntesis de testosterona.

Por lo tanto, creemos que el incremento de corticosterona observado durante la adolescencia media en los ratones derrotados podría regular a la baja la actividad del eje HHG, tanto a nivel central como periférico, ya sea a través de sus acciones sobre las neuronas GnIH/kisspeptina del hipotálamo y/o sobre las células de Leydig en el testículo, respectivamente. En conjunto, estos efectos podrían explicar la reducción en la concentración sérica de testosterona encontrada durante la adolescencia media y tardía en los ratones derrotados.

Por otro lado, se ha reportado que los niveles bajos de testosterona están relacionados con el desarrollo de sintomatología depresiva (Seidman and Walsh, 1999; Carnahan and Perry, 2004; McHenry et al., 2014; Dwyer et al., 2020; Zitzmann, 2020) y conductas tipo depresión (Rygula et al., 2006; McHenry et al., 2014) en humanos y roedores, respectivamente, y con la disminución en la densidad del SERT en los núcleos ARC y medial del rafe en ratas macho castradas (McQueen et al., 1999). Contrario al incremento dependiente de la edad que encontramos en la densidad del SERT de los ratones macho durante la transición de adolescencia a edad adulta, se ha reportado una reducción dependiente de la edad en la expresión del SERT en distintas áreas del SNC de ratas macho durante la transición de edad adulta a vejez, que es parcialmente contrarrestada por el tratamiento con testosterona (Herrera-Pérez et al., 2013). Por lo tanto, creemos que los niveles bajos de testosterona observados durante la adolescencia media y tardía en los ratones derrotados podrían estar relacionados con la persistencia de las conductas tipo depresión y con la menor densidad hipocampal del SERT encontradas en estos mismos ratones durante la edad adulta. Si bien, los estudios que evalúan la interacción entre la testosterona y el SERT son escasos, en conjunto, los resultados indican que existe una asociación entre los niveles bajos de testosterona y una menor densidad del SERT dentro del SNC. Por lo tanto, futuros trabajos deberían evaluar la interacción entre la testosterona, el SERT y las conductas tipo depresión, ya que sus resultados podrían arrojar nuevas áreas de oportunidad para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos.

Finalmente, se ha demostrado que en condiciones basales y en respuesta a un estresor los roedores macho adultos presentan niveles de ACTH y corticosterona más bajos que los presentados por roedores hembra adultos. Se ha propuesto que esta diferencia en la respuesta al estrés entre sexos se debe al efecto inhibitorio que la testosterona ejerce sobre la actividad del eje HHA (Viau, 2002). Sin embargo, el mecanismo a través del cual la testosterona puede actuar para influenciar la actividad del eje HHA no es del todo claro (Handa and Weiser, 2014). Se sabe que los andrógenos, testosterona y dihidrotestosterona (DHT; el metabolito no aromatizable y más potente que resulta de la reducción de testosterona por la por la enzima 5 α -reductasa), inhiben la actividad del eje HHA al disminuir la actividad de las neuronas

CRH del PVN, y previenen la elevación del mRNA de CRH y de AVP inducida por distintos estresores (Heck and Handa, 2019). Sin embargo, es poco probable que los andrógenos actúen directamente sobre las neuronas CRH del PVN, ya que estas neuronas no expresan o contienen muy pocos receptores de andrógenos (AR). Por el contrario, las neuronas del POA y del BST (núcleos encargados de regular la actividad del eje HHA a través de proyecciones GABAérgicas hacia el PVN) sí expresan una gran cantidad de AR (Handa and Weiser, 2014; McHenry et al., 2014; Green and McCormick, 2016; Heck and Handa, 2019). Se ha demostrado que la administración de andrógenos en estas dos áreas (POA y BST) reduce el mRNA de la AVP en el PVN y la liberación sistémica de corticosterona en respuesta a un estresor (Handa and Weiser, 2014; Green and McCormick, 2016). De forma interesante, se ha demostrado que la reducción de testosterona a DHT es necesaria para observar la reducción de la liberación de corticosterona después de un estresor (Heck and Handa, 2019). Es importante resaltar que el efecto inhibitorio de los andrógenos sobre la actividad del eje HHA también podría darse a nivel de la PFC y el hipocampo que son áreas implicadas en el mecanismo de retroalimentación negativa del eje HHA, y que expresan una gran cantidad de AR y envían proyecciones glutamatérgicas hacia el BST y el peri-PVN (Heck and Handa, 2019). Por lo tanto, se ha propuesto que los andrógenos podrían actuar a través de AR para regular la expresión y secreción de neuropéptidos desde el PVN a través de un mecanismo transináptico (Handa and Weiser, 2014) que involucra la participación de áreas como el POA, el BST, la PFC y el hipocampo, así como posibles efectos genómicos y no genómicos mediados por los AR, aunque esto último no es del todo claro. Aunado a esto, la DHT puede ser metabolizada a 17β -diol (3β -diol) el cual se une y activa al receptor a estrógenos β ($ER\beta$) y, al igual que la DHT y los agonistas del $ER\beta$, el 3β -diol inhibe la respuesta al estrés del eje HHA (Heck and Handa, 2019). De forma interesante, el $ER\beta$ se expresa abundantemente en el PVN (Handa and Weiser, 2014) y se ha demostrado que la administración de DHT o 3β -diol en el PVN disminuye la liberación de ACTH y corticosterona en respuesta a un estresor, por lo tanto, se ha propuesto que DHT a través de su metabolito 3β -diol actúa sobre $ER\beta$ localizados en las neuronas del PVN para ejercer estos efectos (Heck and Handa, 2019). Por otro lado, se ha demostrado que en la hipófisis los andrógenos

reducen el mRNA de la proopiomelanocortina (POMC; precursor de la ACTH) y el contenido hipofisario ACTH (Heck and Handa, 2019), aunque este mecanismo no es del todo claro. Finalmente, la zona fasciculada de la corteza adrenal (responsable de la síntesis y liberación de glucocorticoides) disminuye su tasa de crecimiento en los machos como resultado directo de la producción de testosterona durante la adolescencia (Bale and Epperson, 2015). En resumen, los andrógenos son capaces de actuar a distintos niveles del eje HHA para regular a la baja su actividad (Fig. 36).

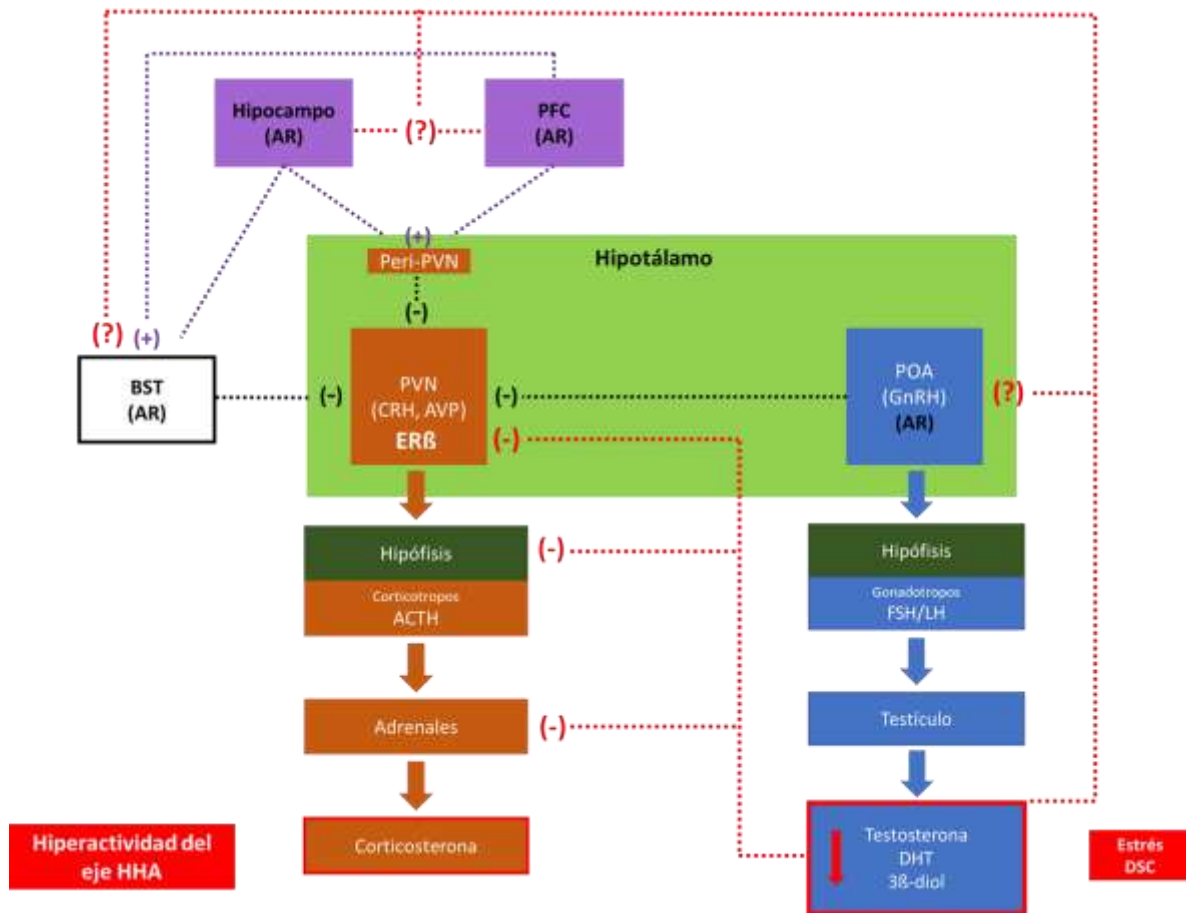


Fig. 36. Esquema que muestra la inhibición central y periférica inducida por la testosterona (línea punteada roja) sobre la actividad del eje HHA, proponemos que el deterioro de estos mecanismos inhibitorios (secundario a la reducción de los niveles séricos de testosterona) podría explicar la hiperactividad del eje HHA encontrada durante la edad adulta en los ratones derrotados. A nivel central los andrógenos actúan sobre AR localizados en áreas como el POA, el BST, la PFC y el hipocampo para regular la expresión y la secreción de neuropéptidos desde el PVN, a través de un mecanismo transináptico que posiblemente involucren efectos genómicos y no genómicos de los AR (?); en el PVN la DHT (a través de su metabolito 3β-diol) actúa sobre ERβ localizados en las neuronas CRH para la liberación de ACTH y corticosterona; y en la hipófisis los andrógenos reducen el contenido de ACTH. A nivel periférico los andrógenos disminuyen la tasa de crecimiento de la zona fasciculada de la glándula adrenal. Proyecciones GABAérgicas (línea punteada negra). Proyecciones glutamatérgicas (línea punteada morada).

Por lo tanto, creemos que los niveles bajos de testosterona observados durante la adolescencia media y tardía en los ratones derrotados generaría la pérdida del efecto antiestrés de esta hormona durante la adolescencia (la correlación negativa encontrada entre los niveles séricos de testosterona y de corticosterona durante la transición de adolescencia a edad adulta en los ratones control), lo que podría estar relacionados con la hiperactividad del eje HHA encontrada en estos mismos ratones durante la edad adulta (la falta de correlación entre los niveles séricos de testosterona y de corticosterona durante la transición de adolescencia a edad adulta en los ratones derrotados). En conjunto, nuestros resultados demuestran la compleja interacción entre los ejes HHA e HHG durante la transición de adolescencia a edad adulta y resaltan las consecuencias neuroendocrinas y conductuales derivadas de una inadecuada interacción ocasionada por la exposición crónica al estrés durante la adolescencia temprana.

10. Conclusiones

En ratones de la cepa SW, la conducta de aislamiento social resultante de la exposición crónica a estrés durante la adolescencia temprana es un comportamiento generalizado y de larga duración que no depende de las características fenotípicas del ratón desconocido, tales como la cepa, la conducta agresiva y la edad. Además, en este trabajo demostramos que la cepa de ratones SW y la exposición a la DSC durante la adolescencia temprana son dos factores relevantes para la persistencia de las conductas tipo depresión a lo largo del tiempo.

Las evidencias sugieren que tanto en los hombres como en los roedores macho se presenta un incremento dependiente de la edad en la densidad del SERT en áreas de proyección serotoninérgica como la PFC, el hipocampo y la amígdala, este desarrollo del SERT podría ir de la mano del refinamiento de la respuesta al estrés en estos individuos. En nuestro trabajo, la activación del eje HHA y el incremento en la actividad del sistema serotoninérgico (inducidos por la DSC durante la adolescencia temprana) podrían anticipar el desarrollo normal del SERT y ser responsables del aumento en la densidad del SERT encontrado en el hipocampo de los ratones adolescentes derrotados. Mientras que la menor densidad del SERT encontrada en el hipocampo de

los ratones adultos derrotados podría interpretarse como un desarrollo prematuro que no alcanzó el desarrollo normal observado en los ratones adultos control. Además, el incremento y la disminución del SERT encontrados en los ratones derrotados adolescentes y adultos, respectivamente, están relacionados con el desarrollo y la persistencia de las conductas tipo depresión de aislamiento social y desesperanza, lo cual es similar a lo observado en adolescentes y adultos con depresión.

La DSC tuvo efectos contradictorios sobre los procesos de aprendizaje y de memoria visuoespacial durante la adolescencia media. Creemos que la edad afecta el desempeño de los ratones en el laberinto de Barnes lo cual podría explicar estos resultados. Por el contrario, la DSC tiene efectos deletéreos y de larga duración sobre los procesos de aprendizaje y de memoria visuoespacial, que son evidentes durante la edad adulta. Estos déficits cognitivos podrían estar relacionados con niveles elevados de corticosterona ya que, los déficits fueron precedidos por niveles elevados de corticosterona en ambos casos (por la respuesta al estrés en la adolescencia media; por la hiperactividad del eje HHA en la edad adulta). Por otro lado, el análisis de las estrategias de afrontamiento durante el laberinto de Barnes podría ser interesante en el estudio del afrontamiento al estrés.

El incremento de corticosterona observado durante la adolescencia media en los ratones derrotados regula a la baja la actividad del eje HHG lo que se traduce en la reducción en la concentración sérica de testosterona encontrada durante la adolescencia media y tardía en estos ratones. Además, estos niveles bajos de testosterona estarían relacionados con la persistencia de las conductas tipo depresión y con la menor densidad del SERT encontrada en el hipocampo de los ratones derrotados, en ambos casos durante la edad adulta. A su vez, los niveles bajos de testosterona observados durante la adolescencia media y tardía en los ratones derrotados generarían la pérdida del efecto antiestrés de esta hormona y, en consecuencia, la hiperactividad del eje HHA encontrada en estos mismos ratones durante la edad adulta. Esto evidencia la compleja interacción entre los ejes HHA e HHG durante la transición de adolescencia a edad adulta y resalta las consecuencias

neuroendocrinas y conductuales derivadas de una inadecuada interacción ocasionada por la exposición crónica al estrés durante la adolescencia temprana.

En conjunto, nuestro trabajo demuestra que la DSC durante la adolescencia temprana induce conductas tipo depresión y déficits cognitivos de larga duración. Además, revela el rol crítico del SERT en el desarrollo normal del SNC durante la transición de adolescencia a edad adulta, así como en el desarrollo patológico de conductas tipo depresión. Nuestro trabajo también resalta la vulnerabilidad de la interacción entre los ejes HHA e HHG durante esta etapa de transición, así como las complicaciones neuroendocrinas y conductuales derivadas de una inadecuada interacción entre ambos ejes. Finalmente, todas las alteraciones conductuales, cognitivas, del SERT y neuroendocrinas observadas en los ratones derrotados se presentaron de forma análoga a lo reportado en humanos con depresión. Por lo tanto, nuestro trabajo le añade mayor validez de constructo y de apariencia al modelo de DSC en ratones macho adolescentes. Convirtiéndolo en una excelente herramienta para el estudio de los procesos neurobiológicos que subyacen a la depresión inducida por la exposición crónica al estrés en etapas tempranas de la vida como la adolescencia, así como para la evaluación de nuevos compuestos útiles en el tratamiento de la depresión en este grupo de edad.

11. Perspectivas

Evaluar el desarrollo de la conducta de aislamiento social hacia ratones hembra, para determinar si la DSC es capaz de abolir este tipo de interacción instintiva.

Dado que diversos estudios han demostrado la importancia de la oxitocina en el desarrollo de la conducta de interacción social, sería interesante evaluar el rol de este neurotransmisor en el desarrollo de la conducta de aislamiento social inducida por la DSC durante la adolescencia temprana.

Evaluar la existencia de conductas tipo ansiedad en nuestros ratones derrotados y determinar la duración real de estas alteraciones conductuales, así como su respuesta a los antidepresivos para agregar mayor validez de apariencia y predictiva al modelo.

Explorar la ontogenia del SERT en diferentes puntos del tiempo durante la transición de adolescencia a edad adulta, para comprobar nuestra hipótesis sobre el incremento prematuro en la densidad del SERT en el hipocampo inducido por la DSC, así como los cambios en la densidad del SERT dependientes de la edad. De igual forma, sería interesante evaluar la morfología de las neuronas hipocampales que expresen el SERT en su superficie.

Estudiar el desempeño de ratones naive (adolescentes y adultos) durante la fase de adquisición del laberinto de Barnes, para determinar si las diferencias en el desempeño eficiente encontradas en nuestros ratones control, adolescentes y adultos, persisten en esta condición y determinar si el desempeño de los ratones en el laberinto de Barnes se ve influenciado por la edad de estos. También, es necesario analizar en un mayor número de ratones las estrategias de afrontamiento al estrés propuestas en nuestro trabajo.

Determinar si la manipulación farmacológica del eje HHG, mediante el tratamiento con testosterona y/o el tratamiento con un antagonista de los receptores de la GnIH, durante los días de exposición a la DCS en la adolescencia temprana es capaz de revertir las alteraciones conductuales, cognitivas y neuroendocrinas, así como las modificaciones en la densidad del SERT observadas en los ratones derrotados.

Determinar si la administración de la GnIH durante la adolescencia temprana es capaz de mimetizar los efectos conductuales inducidos por la DSC.

Determinar si la manipulación farmacológica del eje HHA, mediante el tratamiento un antagonista de los GR y MR y/o el tratamiento con un antagonista de los receptores de la CRH, durante los días de exposición a la DCS en la adolescencia temprana es capaz de revertir las alteraciones conductuales, cognitivas y neuroendocrinas, así como las modificaciones en la densidad del SERT observadas en los ratones derrotados.

Evaluar el efecto de fármacos con actividad antidepresiva y pro cognitiva, como los agonistas inversos del receptor 3 de histamina (H_3R), sobre las alteraciones conductuales y cognitivas inducidas por la DSC durante la adolescencia temprana.

12. Referencias.

- Acevedo-Rodriguez, A., Kauffman, A. S., Cherrington, B. D., Borges, C. S., Roepke, T. A., and Laconi, M. (2018). Emerging insights into hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation and interaction with stress signalling. *Journal of Neuroendocrinology* 30, 0–3. doi:10.1111/jne.12590.
- Amat, J., Alekseev, R. M., Paul, E., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2010). Behavioral control over shock blocks behavioral and neurochemical effects of later social defeat. *Neuroscience* 165, 1031–1038. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.11.005.
- American Psychiatric Association (2013). *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed.
- Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development : point of vulnerability or window of opportunity ? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27, 3–18. doi:10.1016/S0149-7634(03)00005-8.
- Bale, T. L., and Epperson, C. N. (2015). Sex differences and stress across the lifespan. *Nature Neuroscience* 18, 1413–1420. doi:10.1038/nn.4112.
- Bell, M. R. (2018). Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. *Endocrinology* 159, 2596–2613. doi:10.1210/en.2018-00220.
- Berton, O., Mcclung, C. A., Dileone, R. J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S. J., et al. (2006). Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. *Science* 311, 864–868.
- Birmaher, B., and Brent, D. A. (2007). Practice Parameter for the Assessment and Treatment of Children and Adolescents With Depressive Disorders. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 46, 1503–1526. doi:10.1097/chi.0b013e318145ae1c.
- Blanchard, D. C., Sakai, R. R., McEwen, B., Weiss, S. M., and Blanchard, R. J. (1993). Subordination stress: Behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. *Behavioural Brain Research* 58, 113–121. doi:10.1016/0166-4328(93)90096-9.

- Bogdanova, O. V., Kanekar, S., D'Anci, K. E., and Renshaw, P. F. (2013). Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiology & Behavior* 118, 227–239. doi:10.1016/j.physbeh.2013.05.012.
- Bouet, V., Klomp, A., Freret, T., Wylezinska-Arridge, M., Lopez-Tremoleda, J., Dauphin, F., et al. (2012). Age-dependent effects of chronic fluoxetine treatment on the serotonergic system one week following treatment. *Psychopharmacology* 221, 329–339. doi:10.1007/s00213-011-2580-1.
- Bourke, C., Porter, R. J., Carter, J. D., McIntosh, V. V., Jordan, J., Bell, C., et al. (2012). Comparison of neuropsychological functioning and emotional processing in major depression and social anxiety disorder subjects, and matched healthy controls. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 46, 972–981. doi:10.1177/0004867412451502.
- Boyarskikh, U. A., Bondar, N. P., Filipenko, M. L., and Kudryavtseva, N. N. (2013). Downregulation of serotonergic gene expression in the raphe nuclei of the midbrain under chronic social defeat stress in male mice. *Molecular Neurobiology* 48, 13–21. doi:10.1007/s12035-013-8413-y.
- Bremner, J. D., Narayan, M., Anderson, E. R., Staib, L. H., Ph, D., Miller, H. L., et al. (2000). Hippocampal Volume Reduction in Major Depression. *Am J Psychiatry* 157, 115–117.
- Brivio, E., Lopez, J. P., and Chen, A. (2020). Sex differences: Transcriptional signatures of stress exposure in male and female brains. *Genes, Brain and Behavior* 19, 1–22. doi:10.1111/gbb.12643.
- Buwalda, B., Geerdink, M., Vidal, J., and Koolhaas, J. M. (2011). Social behavior and social stress in adolescence: A focus on animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35, 1713–1721. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.10.004.
- Buwalda, B., van der Borght, K., Koolhaas, J. M., and McEwen, B. S. (2010). Testosterone decrease does not play a major role in the suppression of hippocampal cell proliferation following social defeat stress in rats. *Physiology and*

- Behavior* 101, 719–725. doi:10.1016/j.physbeh.2010.08.010.
- Carnahan, R. M., and Perry, P. J. (2004). Depression in Aging Men. *Drugs & Aging* 21, 361–376. doi:10.2165/00002512-200421060-00002.
- Chaouloff, F. (2013). Social stress models in depression research: what do they tell us ? *Cell Tissue Research*. doi:10.1007/s00441-013-1606-x.
- Cooper, M. A., Grober, M. S., Nicholas, C. R., and Huhman, K. L. (2009). Aggressive encounters alter the activation of serotonergic neurons and the expression of 5-HT1A mRNA in the hamster dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 161, 680–690. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.03.084.
- Costello, E. J., Erkanli, A., and Angold, A. (2006). Is there an epidemic of child or adolescent depression ? *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 12, 1263–1271. doi:10.1111/j.1469-7610.2006.01682.x.
- Cryan, J. F., Valentino, R. J., and Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29, 547–569. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.008.
- Cullen, K., Klimes-dougan, B., Kumra, S., and Schulz, S. C. (2009). Paediatric major depressive disorder: neurobiology and implications for early intervention. *Early Intervention in Psychiatry* 3, 178–188. doi:10.1111/j.1751-7893.2009.00131.x.
- Dahlström, M., Ahonen, A., Ebeling, H., Torniainen, P., Heikkila, J., and Moilanen, I. (2000). Elevated hypothalamic / midbrain serotonin (monoamine) transporter availability in depressive drug-naive children. *Molecular Psychiatry*, 514–522.
- Darcet, F., Mendez-David, I., Tritschler, L., Gardier, A. M., Guilloux, J. P., and David, D. J. (2014). Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8, 1–13. doi:10.3389/fnbeh.2014.00136.
- Daws, L. C., and Gould, G. G. (2011). Ontogeny and regulation of the serotonin transporter: Providing insights into human disorders. *Pharmacology and*

- Therapeutics* 131, 61–79. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.03.013.
- Dayas, C. V., Buller, K. M., Crane, J. W., Xu, Y., and Day, T. a (2001). Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *European Journal of Neuroscience* 14, 1143–1152. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01733.x.
- De Kloet, E. R., Joëls, M., and Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews* 6, 463–475. doi:10.1038/nrn1683.
- De Kloet, E. R., and Sarabdjitsingh, R. A. (2008). Everything Has Rhythm: Focus on Glucocorticoid Pulsatility. *Endocrinology* 149, 3241–3243. doi:10.1210/en.2008-0471.
- Detke, M. J., and Lucki, I. (1996). Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behavioural Brain Research* 73, 43–46.
- Detke, M. J., Rickels, M., and Lucki, I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 121, 66–72.
- Duman, R. S. (2002). Pathophysiology of depression: The concept of synaptic plasticity. *European Psychiatry* 17, 306–310. doi:10.1016/S0924-9338(02)00654-5.
- Duman, R. S. (2014). Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: Remodeling synaptic connections. *Depression and Anxiety* 31, 291–296. doi:10.1002/da.22227.
- Dwyer, J. B., Aftab, A., Widge, A., Rodriguez, C. I., Carpenter, L. L., Nemeroff, C. B., et al. (2020). Hormonal treatments for major depressive disorder: State of the art. *American Journal of Psychiatry* 177, 686–705. doi:10.1176/appi.ajp.2020.19080848.
- Eiland, L., and Romeo, R. D. (2013). Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience* 249, 162–171. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.10.048.

- Fanselow, M. S., and Dong, H. W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron* 65, 7–19.
doi:10.1016/j.neuron.2009.11.031.
- Ferrari, F., and Villa, R. F. (2016). The Neurobiology of Depression : an Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence. *Molecular Neurobiology*.
doi:10.1007/s12035-016-0032-y.
- Filipenko, M. L., Beilina, A. G., Alekseyenko, O. V., Dolgov, V. V., and Kudryavtseva, N. N. (2002). Repeated experience of social defeats increases serotonin transporter and monoamine oxidase A mRNA levels in raphe nuclei of male mice. *Neuroscience Letters* 321, 25–28. doi:10.1016/S0304-3940(01)02495-8.
- Gardner, K. L., Thirivikraman, K. V., Lightman, S. L., Plotsky, P. M., and Lowry, C. A. (2005). Early life experience alters behavior during social defeat: Focus on serotonergic systems. *Neuroscience* 136, 181–191.
doi:10.1016/j.neuroscience.2005.07.042.
- Giannaccini, G., Betti, L., Palego, L., Pirone, A., Schmid, L., Lanza, M., et al. (2011). Serotonin transporter (SERT) and translocator protein (TSPO) expression in the obese ob/ob mouse. *BMC Neuroscience* 12, 1–9. doi:10.1186/1471-2202-12-18.
- Goddings, A. L., Mills, K. L., Clasen, L. S., Giedd, J. N., Viner, R. M., and Blakemore, S. J. (2014). The influence of puberty on subcortical brain development. *NeuroImage* 88, 242–251. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.09.073.
- Godoy, L. D., Rossignoli, M. T., Delfino-Pereira, P., Garcia-Cairasco, N., and de Lima Umeoka, E. H. (2018). A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12, 1–23.
doi:10.3389/fnbeh.2018.00127.
- Golden, S. A., Covington 3rd, H. E., Berton, O., and Russo, S. J. (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc* 6, 1183–1191. doi:10.1038/nprot.2011.361.
- Goncharova, N., Chigarova, O., Rudenko, N., and Oganyan, T. (2019). Glucocorticoid

Negative Feedback in Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Rhesus Monkeys With Various Types of Adaptive Behavior: Individual and Age-Related Differences. *Frontiers in Endocrinology* 10, 1–14.
doi:10.3389/fendo.2019.00024.

Goyens, J., and Notrot, E. (1975). Effects of Cohabitation with Females on Aggressive Behavior Between Male Mice. *Developmental Psychobiology* 8, 79–84.

Green, M. R., and McCormick, C. M. (2016). Sex and stress steroids in adolescence: Gonadal regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. *General and Comparative Endocrinology* 234, 110–116. doi:10.1016/j.ygcen.2016.02.004.

Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R., and Joëls, M. (2012). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 350, 299–309.
doi:10.1016/j.mce.2011.06.020.

Gunn, B. G., Cunningham, L., Mitchell, S. G., Swinny, J. D., Lambert, J. J., and Belelli, D. (2015). GABAA receptor-acting neurosteroids: A role in the development and regulation of the stress response. *Frontiers in Neuroendocrinology* 36, 28–48.
doi:10.1016/j.yfrne.2014.06.001.

Hammels, C., Pishva, E., Vry, J. De, Hove, D. L. A. Van Den, Prickaerts, J., Winkel, R. Van, et al. (2015). Defeat stress in rodents : From behavior to molecules. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 59, 111–140.

Handa, R. J., and Weiser, M. J. (2014). Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35, 197–220.
doi:10.1016/j.yfrne.2013.11.001.

Hardy, M. P., Gao, H. B., Dong, Q., Ge, R., Wang, Q., Chai, W. R., et al. (2005). Stress hormone and male reproductive function. *Cell and Tissue Research* 322, 147–153.
doi:10.1007/s00441-005-0006-2.

Hasegawa, S., Yoshimi, A., Mouri, A., Uchida, Y., Hida, H., Mishina, M., et al. (2019). Acute administration of ketamine attenuates the impairment of social behaviors

- induced by social defeat stress exposure as juveniles via activation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. *Neuropharmacology* 148, 107–116. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.12.020.
- Heck, A. L., and Handa, R. J. (2019). Sex differences in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis' response to stress: an important role for gonadal hormones. *Neuropsychopharmacology* 44, 45–58. doi:10.1038/s41386-018-0167-9.
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., et al. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in neuroendocrinology* 24, 151–80. doi:10.1016/j.yfrne.2003.07.001.
- Herrera-Pérez, J. J., Fernández-Guasti, A., and Martínez-Mota, L. (2013). Brain SERT Expression of Male Rats Is Reduced by Aging and Increased by Testosterone Restitution. *Neuroscience Journal* 2013, 1–8. doi:10.1155/2013/201909.
- Holder, M. K., and Blaustein, J. D. (2014). Puberty and adolescence as a time of vulnerability to stressors that alter neurobehavioral processes. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35, 89–110. doi:10.1016/j.yfrne.2013.10.004.
- Hollis, F., and Kabbaj, M. (2014). Social Defeat as an Animal Model for Depression. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 55, 221–232. doi:10.1093/ilar/ilu002.
- Huang, G.-B., Zhao, T., and Muna, S. S. (2013). Effects of chronic social defeat stress on behaviour, endoplasmic reticulum proteins and choline acetyltransferase in adolescent mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 16, 1635–1647. doi:10.1017/S1461145713000060.
- Huhman, K. L., Moore, T. O., Ferris, C. F., Mougey, E. H., and Meyerhoff, J. L. (1991). Acute and repeated exposure to social conflict in male golden hamsters: Increases in plasma POMC-peptides and cortisol and decreases in plasma testosterone. *Hormones and Behavior* 25, 206–216. doi:10.1016/0018-506X(91)90051-I.
- Hurtubise, J. L., and Howland, J. G. (2017). Effects of stress on behavioral flexibility in

- rodents. *Neuroscience* 345, 176–192. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.04.007.
- Iñiguez, S. D., Aubry, A., Riggs, L. M., Alipio, J. B., Zanca, R. M., Flores-Ramirez, F. J., et al. (2016). Social defeat stress induces depression-like behavior and alters spine morphology in the hippocampus of adolescent male C57BL/6 mice. *Neurobiology of Stress* 5, 54–64. doi:10.1016/j.ynstr.2016.07.001.
- Iñiguez, S. D., Riggs, L. M., Nieto, S. J., Dayrit, G., Zamora, N. N., Shawhan, K. L., et al. (2014). Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress* 3890, 247–255. doi:10.3109/10253890.2014.910650.
- Isgor, C., Kabbaj, M., Akil, H., and Watson, S. J. (2004). Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus* 14, 636–648. doi:10.1002/hipo.10207.
- Iwasa, T., Matsuzaki, T., Yano, K., Mayila, Y., and Irahara, M. (2018). The roles of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in stress-induced reproductive disorders. *Endocrine Journal* 65, 133–140. doi:10.1507/endocrj.EJ18-0026.
- Jacobs, B. L., and Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews* 72, 165–230. doi:10.1152/physrev.1992.72.1.165.
- Jeon, S. W., and Kim, Y. (2016). Molecular Neurobiology and Promising New Treatment in Depression. *International Journal of Molecular Sciences* 17. doi:10.3390/ijms17030381.
- Jett, J. D., Boley, A. M., Girotti, M., Shah, A., Lodge, D. J., and Morilak, D. A. (2015). Antidepressant-like cognitive and behavioral effects of acute ketamine administration associated with plasticity in the ventral hippocampus to medial prefrontal cortex pathway. *Psychopharmacology* 232, 3123–3133. doi:10.1007/s00213-015-3957-3.
- Jett, J. D., Bulin, S. E., Hatherall, L. C., McCartney, C. M., and Morilak, D. A. (2017). Deficits in cognitive flexibility induced by chronic unpredictable stress are associated with impaired glutamate neurotransmission in the rat medial prefrontal

- cortex. *Neuroscience* 346, 284–297. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.01.017.
- Jiang, X., Wang, J., Luo, T., and Li, Q. (2009). Impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its feedback regulation in serotonin transporter knockout mice. *Psychoneuroendocrinology* 34, 317–331. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.09.011.
- Jianhua, F., Wei, W., Xiaomei, L., and Shao-hui, W. (2017). Chronic social defeat stress leads to changes of behaviour and memory-associated proteins of young mice. *Behavioural Brain Research* 316, 136–144. doi:10.1016/j.bbr.2016.09.011.
- Joëls, M., and Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 459–466. doi:10.1016/j.solmat.2008.09.015.
- Joels, M., Sarabdjitsingh, R. A., and Karst, H. (2012). Unraveling the Time Domains of Corticosteroid Hormone Influences on Brain Activity: Rapid, Slow, and Chronic Modes. *Pharmacological Reviews* 64, 901–938. doi:10.1124/pr.112.005892.
- Joensuu, M., Tolmunen, T., Saarinen, P. I., Tiihonen, J., Kuikka, J., Ahola, P., et al. (2007). Reduced midbrain serotonin transporter availability in drug-naïve patients with depression measured by SERT-specific [¹²³I] nor-β-CIT SPECT imaging. *Psychiatry Research - Neuroimaging* 154, 125–131. doi:10.1016/j.psychoresns.2006.08.001.
- Keeney, A., Jessop, D. S., Harbuz, M. S., Marsden, C. A., Hogg, S., and Blackburn-Munro, R. E. (2006). Differential Effects of Acute and Chronic Social Defeat Stress on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function and Hippocampal Serotonin Release in Mice. *Journal of Neuroendocrinology* 18, 330–338. doi:10.1111/j.1365-2826.2006.01422.x.
- Kessler, R. C., and Bromet, E. J. (2013). The Epidemiology of Depression Across Cultures. *The Annual Review of Public Health* 34. doi:10.1146/annurev-publhealth-031912-114409.
- Kim, D. J., St. Louis, N., Molaro, R. A., Hudson, G. T., Chorley, R. C., and Anderson, B. J. (2017). Repeated unpredictable threats without harm impair spatial working memory in the Barnes maze. *Neurobiology of Learning and Memory* 137, 92–100.

doi:10.1016/j.nlm.2016.11.014.

- Kinsey, S. G., Bailey, M. T., Sheridan, J. F., Padgett, D. A., and Avitsur, R. (2007). Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL / 6 and CD-1 mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 21, 458–466. doi:10.1016/j.bbi.2006.11.001.
- Kirby, E. D., Geraghty, A. C., Ubuka, T., Bentley, G. E., and Kaufer, D. (2009). Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 11324–11329. doi:10.1073/pnas.0901176106.
- Kitchener, P., Di Blasi, F., Borrelli, E., and Piazza, P. V. (2004). Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and the circadian cycle. *European Journal of Neuroscience* 19, 1837–1846. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03267.x.
- Krishnan, V., Han, M., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., et al. (2007). Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell* 131, 391–404. doi:10.1016/j.cell.2007.09.018.
- Lehmann, M. L., Brachman, R. A., Martinowich, K., Schloesser, R. J., and Herkenham, M. (2013). Glucocorticoids orchestrate divergent effects on mood through adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience* 33, 2961–2972. doi:10.1523/JNEUROSCI.3878-12.2013.
- Lewinsohn, P. M., Rohde, P., Rohde, P., Seeley, J. R., Klein, D. N., et al. (2000). Natural Course of Adolescent Major Depressive Disorder in a Community Sample : Predictors of Recurrence in Young Adults. *American Journal of Psychiatry* 157, 1584–1591.
- Lu, J., Wu, X. Y., Zhu, Q. Bin, Li, J., Shi, L. G., Wu, J. L., et al. (2015). Sex differences in the stress response in SD rats. *Behavioural Brain Research* 284, 231–237. doi:10.1016/j.bbr.2015.02.009.

- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., and Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews* 10, 434–445. doi:10.1038/nrn2639.
- Malison, R. T., Price, L. H., Berman, R., Van Dyck, C. H., Pelton, G. H., Carpenter, L., et al. (1998). Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [¹²³I]-2 β -carbomethoxy-3 β -(4-iodophenyl)tropine and single photon emission computed tomography. *Biological Psychiatry* 44, 1090–1098. doi:10.1016/S0006-3223(98)00272-8.
- Mancha-Gutiérrez, H. M., and López-Rubalcava, C. (2017). Análisis del efecto tipo antidepressivo de un agonista inverso del H3R, en ratones adolescentes macho: Interacción entre histamina y los sistemas monoaminérgicos. *Tesis de Maestría*.
- Maner, J. K., Miller, S. L., Schmidt, N. B., and Eckel, L. A. (2008). Submitting to Defeat. *Psychological Science* 19, 764–768. doi:10.1111/j.1467-9280.2008.02154.x.
- Martin, V., Allaili, N., Euvrard, M., Marday, T., Riffaud, A., Franc, B., et al. (2017). Effect of agomelatine on memory deficits and hippocampal gene expression induced by chronic social defeat stress in mice. *Scientific Reports*, 1–11. doi:10.1038/srep45907.
- McCormick, C. M., and Green, M. R. (2013). REVIEW FROM THE STRESSED ADOLESCENT TO THE ANXIOUS AND DEPRESSED ADULT : INVESTIGATIONS IN RODENT MODELS. *Neuroscience* 249, 242–257. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.08.063.
- McCormick, C. M., and Green, M. R. (2013). From the stressed adolescent to the anxious and depressed adult: Investigations in rodent models. *Neuroscience* 249, 242–257. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.08.063.
- McCosh, R. B., Breen, K. M., and Kauffman, A. S. (2019). Neural and endocrine mechanisms underlying stress-induced suppression of pulsatile LH secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology* 498. doi:10.1016/j.mce.2019.110579.
- McEwen, B. S. (2011). The Ever-Changing Brain : Cellular and Molecular Mechanisms

- for the Effects of Stressful Experiences. *Developmental Neurobiology*, 878–890. doi:10.1002/dneu.20968.
- McHenry, J., Carrier, N., Hull, E., and Kabbaj, M. (2014). Sex differences in anxiety and depression: Role of testosterone. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35, 42–57. doi:10.1016/j.yfrne.2013.09.001.
- McKittrick, C. R., Magariños, A. M., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., McEwen, B. S., and Sakai, R. R. (2000). Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. *Synapse* 36, 85–94. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(200005)36:2<85::AID-SYN1>3.0.CO;2-Y.
- McLay, R. N., Freeman, S. M., and Zadina, J. E. (1998). Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes maze. *Physiology and Behavior* 63, 933–937. doi:10.1016/S0031-9384(97)00529-5.
- McQueen, J. K., Wilson, H., Sumner, B. E. H., and Fink, G. (1999). Serotonin transporter (SERT) mRNA and binding site densities in male rat brain affected by sex steroids. *Molecular Brain Research* 63, 241–247. doi:10.1016/S0169-328X(98)00281-2.
- Merkulov, V. M., Merkulova, T. I., and Bondar, N. P. (2017). Mechanisms of brain glucocorticoid resistance in stress-induced psychopathologies. *Biochemistry (Moscow)* 82, 351–365. doi:10.1134/S0006297917030142.
- Miskowiak, K. W., Ott, C. V., Petersen, J. Z., and Kessing, L. V. (2016). Systematic review of randomized controlled trials of candidate treatments for cognitive impairment in depression and methodological challenges in the field. *European Neuropsychopharmacology* 26, 1845–1867. doi:10.1016/j.euroneuro.2016.09.641.
- Mitchell, N. C., Gould, G. G., Koek, W., and Daws, L. C. (2016). Ontogeny of SERT expression and antidepressant-like response to escitalopram in wild-type and SERT mutant mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 358, 271–281. doi:10.1124/jpet.116.233338.
- Moll, G. H., Mehnert, C., Wicker, M., Bock, N., Rothenberger, A., Rüter, E., et al.

- (2000). Age-associated changes in the densities of presynaptic monoamine transporters in different regions of the rat brain from early juvenile life to late adulthood. *Developmental Brain Research* 119, 251–257. doi:10.1016/S0165-3806(99)00182-0.
- Mouri, A., Ukai, M., Uchida, M., Hasegawa, S., Taniguchi, M., Ito, T., et al. (2018). Juvenile social defeat stress exposure persistently impairs social behaviors and neurogenesis. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.01.016.
- Myers, B., Mcklveen, J. M., and Herman, J. P. (2012). Neural regulation of the stress response: The many faces of feedback. *Cell Mol Neurobiol.* 32, 683–694. doi:10.1007/s10571-012-9801-y.
- Nemeroff, C. B., and Vale, W. W. (2005). The Neurobiology of Depression : Inroads to Treatment and New Drug Discovery. 30322, 5–13.
- Newberg, A. B., Amsterdam, J. D., Wintering, N., and Shults, J. (2012). Low brain serotonin transporter binding in major depressive disorder. *Psychiatry Research - Neuroimaging* 202, 161–167. doi:10.1016/j.psychresns.2011.12.015.
- Oyola, M. G., and Handa, R. J. (2017). Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress* 20, 476–494. doi:10.1080/10253890.2017.1369523.
- Páez-Martínez, N., Pellicer, F., González-Trujano, M. E., and Cruz-López, B. (2020). Environmental enrichment reduces behavioural sensitization in mice previously exposed to toluene: The role of D1 receptors. *Behavioural Brain Research* 390, 112624. doi:10.1016/j.bbr.2020.112624.
- Papp, M., Gruca, P., Lason-Tyburkiewicz, M., Litwa, E., Niemczyk, M., Tota-Glowczyk, K., et al. (2017). Dopaminergic mechanisms in memory consolidation and antidepressant reversal of a chronic mild stress-induced cognitive impairment`. *Psychopharmacology* 234, 2571–2585. doi:10.1007/s00213-017-4651-4.
- Parsey, R. V., Hastings, R. S., Oquendo, M. A., Huang, Y. Y., Simpson, N., Arcement, J., et al. (2006). Lower serotonin transporter binding potential in the human brain

- during major depressive episodes. *American Journal of Psychiatry* 163, 52–58. doi:10.1176/appi.ajp.163.1.52.
- Paul, C. M., Magda, G., and Abel, S. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research* 203, 151–164. doi:10.1016/j.bbr.2009.05.022.
- Paus, T., Keshavan, M., and Giedd, J. N. (2008). Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nature Reviews* 9, 947–957.
- Paxinos, G., and Frankiln, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second Edi. San Diego, CA.
- Porsolt, R. D., Brossard, G., Hautbois, C., and Roux, S. (2001). Rodent Models of Depression : Forced Swimming and Tail Suspension Behavioral. *Current Protocols in Neuroscience*.
- Puglisi-Allegra, S., and Andolina, D. (2015). Serotonin and stress coping. *Behavioural Brain Research* 277, 58–67. doi:10.1016/j.bbr.2014.07.052.
- Razzoli, M., Carboni, L., Andreoli, M., Michielin, F., Ballottari, A., and Arban, R. (2011). Strain-specific outcomes of repeated social defeat and chronic fluoxetine treatment in the mouse. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 97, 566–576. doi:10.1016/j.pbb.2010.09.010.
- Reisinger, S. N., Wanek, T., Langer, O., and Pollak, D. D. (2019). PET imaging of the mouse brain reveals a dynamic regulation of SERT density in a chronic stress model. *Translational Psychiatry* 9. doi:10.1038/s41398-019-0416-7.
- Resende, L. S., Amaral, C. E., Soares, R. B. S., Alves, A. S., Alves-Dos-Santos, L., Britto, L. R. G., et al. (2016). Social stress in adolescents induces depression and brain-region-specific modulation of the transcription factor MAX. *Translational psychiatry* 6, e914. doi:10.1038/tp.2016.202.
- Reul, J. M. H. M., and De Kloet, E. R. (1985). Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain: Microdistribution and Differential Occupation. *Endocrinology* 117, 2505–2511. doi:https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2505.

- Reul, J. M. H. M., and De Kloet, E. R. (1986). Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. *Journal of Steroid Biochemistry* 24, 269–272. doi:10.1016/0022-4731(86)90063-4.
- Richardson, L. P., and Katzenellenbogen, R. (2005). Childhood and Adolescent Depression: The Role of Primary Care Providers in Diagnosis and Treatment. 6–24. doi:10.1016/j.cppeds.2004.09.001.
- Riedel, G., Robinson, L., and Crouch, B. (2018). Spatial learning and flexibility in 129S2/SvHsd and C57BL/6J mouse strains using different variants of the Barnes maze. *Behavioural Pharmacology* 29, 688–700. doi:10.1097/FBP.0000000000000433.
- Romeo, R. D. (2010). Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31, 232–240. doi:10.1016/j.yfrne.2010.02.004.
- Romeo, R. D. (2016). The Impact of Stress on the Structure of the Adolescent Brain: Implications for Adolescent Mental Health. *Brain research*. doi:10.1016/j.brainres.2016.03.021.
- Rygula, R., Abumaria, N., Domenici, E., Hiemke, C., and Fuchs, E. (2006). Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. *Behavioural Brain Research* 174, 188–192. doi:10.1016/j.bbr.2006.07.017.
- Sakr, H. F., Abbas, A. M., Elsamanoudy, A. Z., and Ghoneim, F. M. (2015). Effect of fluoxetine and resveratrol on testicular functions and oxidative stress in a rat model of chronic mild stress-induced depression. *Journal of Physiology and Pharmacology* 66, 515–527.
- Sawchenko, P. E., Brown, E. R., Chan, R. K. W., Ericsson, A., Li, H.-Y., Roland, B. L., et al. (1996). “The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress,” in *Progress in Brain Research*, 201–222. doi:10.1016/s0079-6123(08)61866-x.

- Schneider, M. (2013). Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Research* 354, 99–106. doi:10.1007/s00441-013-1581-2.
- Schuurman, T. (1980). Hormonal Correlates of Agonistic Behavior in Adult Male Rats. *Progress in Brain Research* 53, 415–420. doi:10.1016/S0079-6123(08)60079-5.
- Seidman, S. N., and Walsh, B. T. (1999). Testosterone and depression in aging men. *American Journal of Geriatric Psychiatry* 7, 18–33. doi:10.1097/00019442-199902000-00004.
- Selvaraj, S., Venkatesha Murthy, N., Bhagwagar, Z., Bose, S. K., Hinz, R., Grasby, P. M., et al. (2011). Diminished brain 5-HT transporter binding in major depression: A positron emission tomography study with [¹¹C]DASB. *Psychopharmacology* 213, 555–562. doi:10.1007/s00213-009-1660-y.
- Sharma, S., Rakoczy, S., and Brown-Borg, H. (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences* 87, 521–536. doi:10.1016/j.lfs.2010.09.004.
- Sheline, Y. I., Gado, M. H., and Kraemer, H. C. (2003). Untreated Depression and Hippocampal Volume Loss. *Am J Psychiatry* 160, 1516–1518.
- Shimizu, T., Ishida, A., Hagiwara, M., Ueda, Y., Hattori, A., Tajiri, N., et al. (2020). Social Defeat Stress in Adolescent Mice Induces Depressive-like Behaviors with Reduced Oligodendrogenesis. *Neuroscience* 443, 218–232. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.07.002.
- Shu, Y., and Xu, T. (2017). Chronic Social Defeat Stress Modulates Dendritic Spines Structural Plasticity in Adult Mouse Frontal Association Cortex. *Neural Plasticity*, 1–13. doi:10.1155/2017/6207873.
- Sisk, C. L., and Foster, D. L. (2004). The neural basis of puberty and adolescence. *Nature Neuroscience* 7, 1040–1047. doi:10.1038/nn1326.
- Smith, M. A., Makino, S., Kvetnansky, R., and Post, R. M. (1995). Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 15, 1768–1777. doi:20024066.

- Solich, J., Faron-Gorecka, A., Kusmider, M., Palach, P., Gaska, M., and Dziejdzicka-Wasylewska, M. (2011). Norepinephrine transporter (NET) knock-out upregulates dopamine and serotonin transporters in the mouse brain. *Neurochemistry International* 59, 185–191. doi:10.1016/j.neuint.2011.04.012.
- Stamper, C. E., Hassell, J. E., Kapitz, A. J., Renner, K. J., Orchinik, M., and Lowry, C. A. (2017). Activation of 5-HT_{1A} receptors in the rat dorsomedial hypothalamus inhibits stress-induced activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Stress* 20, 223–230. doi:10.1080/10253890.2017.1301426.
- Steckler, T. (2005). “The neuropsychology of stress,” in *Handbook of Stress and the Brain* (Elsevier Masson SAS), 25–42. doi:10.1016/S0921-0709(05)80005-7.
- Sunyer, B., Patil, S., Höger, H., and Luber, G. (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Protocol Exchange*, 1–20. doi:10.1038/nprot.2007.390.
- Tang, M., He, T., Sun, X., Meng, Q. Y., Diao, Y., Lei, J. Y., et al. (2014). Subregion-specific decreases in hippocampal serotonin transporter protein expression and function associated with endophenotypes of depression. *Hippocampus* 24, 493–501. doi:10.1002/hipo.22242.
- Tang, M., Lei, J., Sun, X., Liu, G., and Zhao, S. (2013). Stress-induced anhedonia correlates with lower hippocampal serotonin transporter protein expression. *Brain Research* 1513, 127–134. doi:10.1016/j.brainres.2013.03.042.
- Tanner, J. M. (1986). Normal growth and techniques of growth assessment. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 15, 411–451. doi:10.1016/S0300-595X(86)80005-6.
- Thapar, A., Collishaw, S., Pine, D. S., and Thapar, A. K. (2012). Depression in Adolescence. *Lancet* 379, 1056–1067. doi:10.1016/S0140-6736(11)60871-4. Depression.
- Toufexis, D., Rivarola, M. A., Lara, H., and Viau, V. (2014). Stress and the reproductive axis. *Journal of Neuroendocrinology* 26, 573–586. doi:10.1111/jne.12179.
- Trofimiuk, E., Wielgat, P., Braszko, J. J., and Car, H. (2019). Stress and Ketamine,

Bimodal Influence on Cognitive Functions. *Behavioural Brain Research* 360, 354–364. doi:10.1016/j.bbr.2018.12.030.

Tsankova, N. M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R. L., and Nestler, E. J. (2006). Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nature Neuroscience* 9, 519–526. doi:10.1038/nn1659.

Tsigos, C., and Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53, 865–871. doi:10.1016/S0022-3999(02)00429-4.

Tsutsui, K., and Ubuka, T. (2020). Discovery of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), progress in GnIH research on reproductive physiology and behavior and perspective of GnIH research on neuroendocrine regulation of reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 514, 110914. doi:10.1016/j.mce.2020.110914.

Ulrich-Lai, Y. M., and Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 397–409. doi:10.1038/nrn2647.

Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., and Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-Residue Ovine Hypothalamic Peptide That Stimulates Secretion of Corticotropin and p3-Endorphin. *Science* 213, 1394–1397. Available at: https://www.jstor.org/stable/1686482?casa_token=-rvX6OQh7UEAAAAA:sKFy7z2RHCRSPngd3VjT_CYEzbnCwvpQrhJUa9GBSXqZWCHJ_SGAZlzlIMJ9e1-StgSYHRj1UPYa4Z7rz_Z_A1Y3yLBs5GI8sYDYtiJ3NHFYfETuA&seq=1#metadata_a_info_tab_contents.

Venzala, E., García-García, A. L., Elizalde, N., and Tordera, R. M. (2013). Social vs Environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. *European Neuropsychopharmacology* 23, 697–708. doi:10.1016/j.euroneuro.2012.05.010.

- Viau, V. (2002). Functional Cross-Talk Between the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal and -Adrenal Axes. *Journal of Neuroendocrinology* 14, 506–513. Available at: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxy-ub.rug.nl/doi/pdf/10.1046/j.1365-2826.2002.00798.x>.
- Wang, W., Liu, L., Yang, X., Gao, H., Tang, Q. K., Yin, L. Y., et al. (2019). Ketamine improved depressive-like behaviors via hippocampal glucocorticoid receptor in chronic stress induced- susceptible mice. *Behavioural Brain Research* 364, 75–84. doi:10.1016/j.bbr.2019.01.057.
- Willner, P., Scheel-Krüger, J., and Belzung, C. (2013). The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 37, 2331–2371. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.12.007.
- Wommack, J. C., Salinas, A., Melloni, R. H., and Delville, Y. (2004). Behavioural and neuroendocrine adaptations to repeated stress during puberty in male golden hamsters. *Journal of Neuroendocrinology* 16, 767–775. doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01233.x.
- Xu, H., Zhang, Y., Zhang, F., Yuan, S., and Shao, F. (2016). Effects of Duloxetine Treatment on Cognitive Flexibility and BDNF Expression in the mPFC of Adult Male Mice Exposed to Social Stress during Adolescence. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9, 1–12. doi:10.3389/fnmol.2016.00095.
- Yu, T., Guo, M., Garza, J., Rendon, S., Sun, X., and Zhang, W. (2011). Cognitive and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice : an animal model of depression with cognitive dysfunction. 303–317. doi:10.1017/S1461145710000945.
- Zavala, E., Voliotis, M., Zerenner, T., Tabak, J., Walker, J. J., Li, X. F., et al. (2020). Dynamic Hormone Control of Stress and Fertility. *Frontiers in Physiology* 11, 1–11. doi:10.3389/fphys.2020.598845.
- Zhang, F., Yuan, S., Shao, F., and Wang, W. (2016). Adolescent Social Defeat Induced Alterations in Social Behavior and Cognitive Flexibility in Adult Mice: Effects of

Developmental Stage and Social Condition. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 10. doi:10.3389/fnbeh.2016.00149.

Zhang, J., Fan, Y., Li, Y., Zhu, H., Wang, L., and Zhu, M. Y. (2012). Chronic social defeat up-regulates expression of the serotonin transporter in rat dorsal raphe nucleus and projection regions in a glucocorticoid-dependent manner. *Journal of Neurochemistry* 123, 1054–1068. doi:10.1111/jnc.12055.

Zhang, J., Fan, Y., Raza, M. U., Zhan, Y., Du, X. D., Patel, P. D., et al. (2017). The regulation of corticosteroid receptors in response to chronic social defeat. *Neurochemistry International* 108, 397–409. doi:10.1016/j.neuint.2017.05.021.

Zitzmann, M. (2020). Testosterone, mood, behaviour and quality of life. *Andrology* 8, 1598–1605. doi:10.1111/andr.12867.

ANEXO I

SELECCIÓN DE RATONES AGRESORES DEL PROTOCOLO DE DERROTA SOCIAL CRÓNICA

1. Como posibles ratones agresores utilizamos ratones Swiss Webster adultos (12-14 semanas de edad). Los cuales fueron alojados de forma individual, con comida y agua ad libitum, durante 3 días previos a la selección.
2. Para probar la conducta de los posibles ratones agresores utilizamos ratones Swiss Webster de menor edad que los agresores (6-10 semanas de edad). Estos ratones de prueba fueron alojados en grupo y solo fueron utilizados para este y/o futuros procesos de selección de ratones agresores.
3. El proceso de selección se realizó en la caja hogar del posible ratón agresor. Brevemente, en cada sesión se colocó al ratón de prueba directamente dentro de la caja hogar del posible ratón agresor, con el posible agresor presente, durante 180 segundos. Pasado este tiempo se concluyó la sesión y el ratón de prueba fue retirado de la caja hogar.
4. Durante cada sesión registramos la latencia de ataque y el número de ataques. La latencia de ataque fue definida como el tiempo transcurrido entre el inicio de la selección y el primer ataque del posible ratón agresor hacia el ratón de prueba.
5. Se realizó una sesión de selección por día durante tres días consecutivos. En cada sesión se utilizó un ratón de prueba diferente para cada posible ratón agresor, de tal manera que el posible ratón agresor no atacara al mismo ratón dos veces. El posible ratón agresor nunca fue cambiado de su caja hogar durante los tres días que dura el proceso de selección.
6. Los posibles ratones agresores que cumplieron con los siguientes criterios fueron seleccionados como ratones agresores:
 - a. Ratones que atacaron en dos sesiones consecutivas.
 - b. Ratones con una latencia de ataque menor de 60 segundos.

7. Los posibles ratones agresores que no cumplieron con estos criterios fueron excluidos del protocolo de derrota social crónica.
8. Al terminar la selección, los ratones agresores seleccionados fueron alojados de forma individual con libre acceso a comida y agua. Con base en lo descrito en la literatura estos ratones agresores pueden ser utilizados hasta por tres meses después de haber sido seleccionados como agresores.