

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**FASUDIL, UN INHIBIDOR DE ROCK, PREVIENE LAS  
ALTERACIONES CONDUCTUALES PRODUCIDAS POR ESTRÉS  
DE RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO EN UN MODELO ANIMAL DE  
DEPRESIÓN.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Natalia Andrea Vilches Peñaloza**

***Directora y Patrocinante***

**Dra. Jenny Fiedler Temer**

Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética

Depto. De Bioquímica y Biología Molecular

Lugar de Realización  
**Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética**  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica  
Universidad de Chile

**Santiago de Chile**  
**2011**

Esta memoria de título fue financiada por el proyecto FONDECYT 1080489 y ha dado origen a las siguientes comunicaciones:

**Presentación en congreso científico**

**Vilches, N.**, Díaz-Véliz, G., Mora, S., Fiedler, J.L.

Fasudil, un inhibidor de ROCK, previene las alteraciones conductuales en modelos de depresión animal. XXXII Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile. Valdivia, Chile, 2010.

Fiedler, J.L., **Vilches, N.**, Arancibia, D., Díaz-Véliz, G., Mora, S.

Fasudil, a ROCK inhibitor, prevents behavioural alterations promoted by restraint stress in rats. Congreso IBRO. Florencia, Italia, 2011.

**Vilches, N.**, Arancibia, D., Díaz-Véliz, G., Mora, S., Fiedler, J.L.

Fasudil, a ROCK inhibitor, prevents behavioural alterations promoted by restraint-stress, which is not associated with regulation of Rho/ROCK/LIMK/cofilin pathway. VII Congreso de la Sociedad Chilena de Neurociencias. Santa Cruz, Chile, 2011.

*Dedicado con mucho amor a Dios,  
mi familia, mis amistades y en  
forma especial a Juan Pablo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer el apoyo incondicional de Dios desde que lo conocí, marcando un antes y un después en mi vida. Quitando el velo que me impedía ver quién soy y en que está fundamentado mi valor como persona. Esta tesis es una manifestación más de su gloria en mi vida.

Quiero agradecer también todo el amor, apoyo y especialmente la comprensión de mi familia durante este arduo proceso que ya finaliza. Nunca olvidaré el esfuerzo de mi papá de venir a dejarme los fines de semana temprano a la facultad y cuando me venía a buscar a la hora que fuese para cuidarme y esos días de traspornoche en mi casa escribiendo.

David, Sergio, Pauli, Vale, Damarita, Aníbal, Cami, Mauricio, Yamil y señora Rafa, muchas gracias por todo su apoyo, especialmente, en los momentos más difíciles. Con ustedes he aprendido mucho, en todo aspecto y me alegran la vida con su compañía, temas de conversación, chistes y performances improvisadas. ¡Los quiero mucho!

Juan Pablo, muchas gracias por tu compañía y ayuda en el laboratorio, por acompañarme en los traspornoche y ayudarme a avanzar más rápido.

¡Profesora Jenny, la quiero mucho!. Estoy muy agradecida y llena de regocijo de que me haya dado la oportunidad y el honor de trabajar con Ud., tanto por su calidad humana como su calidad como investigadora y docente. Gracias por toda su ayuda y comprensión cuando más las necesité.

| Índice general  | Páginas   |
|---|-----------|
| Índice general.....   | i         |
| Índice de figuras .....   | ii        |
| Índice de tablas .....  | iii       |
| Abreviaturas .....  | iv        |
| Resumen .....   | v         |
| Summary.....  | vi        |
| <b>1. Introducción</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. Hipótesis</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>3. Objetivos</b> .....   | <b>7</b>  |
| 3.1 Objetivo general .....  | 7         |
| 3.2 Objetivos específicos .....   | 7         |
| <b>4. Materiales y métodos</b> .....  | <b>8</b>  |
| 4.1. Animales.....  | 8         |
| 4.2. Tratamientos de los animales .....   | 8         |
| 4.3. Estrés por restricción de movimiento .....   | 9         |
| 4.4. Pruebas fisiológicas .....   | 9         |
| 4.4.1. Ganancia de peso corporal.....   | 9         |
| 4.4.2. Masa de glándulas adrenales.....   | 10        |
| 4.4.3. Producción de heces .....  | 10        |
| 4.5. Pruebas conductuales.....  | 10        |
| 4.5.1. Prueba de natación forzada.....  | 10        |
| 4.5.2. Prueba de condicionamiento por evitación activa.....   | 11        |
| 4.5.3. Prueba del laberinto elevado en cruz .....   | 12        |
| 4.6. Análisis de inmuno western blot.....   | 13        |
| 4.7. Análisis estadístico.....  | 14        |
| <b>5. Resultados</b> .....  | <b>16</b> |
| 5.1. Indicadores fisiológicos .....   | 16        |
| 5.1.1. El estrés por restricción de movimiento disminuye la ganancia de peso corporal, efecto no prevenido por la administración crónica de fasudil. ....                     | 16        |
| 5.1.2. Fasudil no afecta la producción diaria y promedio de heces.....  | 17        |
| 5.1.3. El estrés y fasudil no alteran la masa de las glándulas adrenales. ....  | 18        |
| 5.2 Pruebas conductuales .....  | 18        |
| 5.2.1 El estrés por restricción de movimiento aumenta el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada , efecto prevenido por la administración crónica de fasudil.... | 18        |

|  |    |
|--|----|
| 5.2.2 El estrés por restricción de movimiento disminuye %ARC e incrementa %FE en el test de evitación condicionada, lo que fue prevenido por la administración crónica de fasudil..... | 19 |
| 5.2.3 El estrés por restricción de movimiento, aumenta %TAT para las entradas, para el tiempo y para las entradas totales, pero fasudil no previene estos efectos.....                 | 21 |
| 5.3 Análisis de inmuno western blot.....   | 23 |
| 5.3.1 Efecto del estrés y fasudil sobre los niveles de RhoA y LIMK. .... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>  |    |
| <b>6. Discusión</b> .....  | 25 |
| 6.2. Análisis de la evaluación de la prevención de síntomas.....   | 27 |
| 6.3. Interpretación de resultados de pruebas conductuales.....   | 28 |
| 6.3.1 El test de natación forzada.....   | 28 |
| 6.3.2. El test de condicionamiento por evitación activa.....   | 30 |
| 6.3.3. El test del laberinto elevado en cruz.....  | 30 |
| 6.3.4. Potenciales propiedades antidepressivas de fasudil.....   | 31 |
| 6.4 Interpretación de los análisis de inmuno western blot.....   | 31 |
| <b>7. Conclusiones</b> .....   | 35 |
| <b>8. Proyecciones</b> .....   | 36 |
| <b>9. Bibliografía</b> .....   | 37 |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Regulación del eje hipófisis- hipotálamo-glándulas adrenales.....   | 2  |
| <b>Figura 2.</b> Estructura química de fasudil.....  | 4  |
| <b>Figura 3.</b> Vías de interés en la regulación del citoesqueleto de actina:<br>RhoA/ROCK/MLC; MLCP y cofilina.....  | 6  |
| <b>Figura 4.</b> Esquema de los tratamientos de estrés y administración de fármacos.....   | 13 |
| <b>Figura 5.</b> El estrés por restricción de movimiento disminuye la ganancia de peso corporal, efecto que no es prevenido por la administración crónica de fasudil...                        | 16 |
| <b>Figura 6.</b> Fasudil no afecta la producción diaria y promedio de heces.....   | 17 |
| <b>Figura 7.</b> El estrés y fasudil no alteran la masa de las glándulas adrenales.....  | 18 |
| <b>Figura 8.</b> El estrés por restricción incrementa el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada, efecto prevenido por la administración crónica de fasudil.....                  | 19 |
| <b>Figura 9.</b> La restricción crónica reduce %ARC e incrementa las %FE en el test de evitación condicionada, efecto que fue prevenido por la administración crónica de fasudil.....          | 20 |
| <b>Figura 10.</b> El estrés por restricción crónica aumenta el %TAT para las entradas, para el tiempo y las entradas totales, pero fasudil no pudo prevenir estos efectos.....                 | 22 |
| <b>Figura 11.</b> Fasudil muestra una tendencia a incrementar los niveles de RhoA en ratas sometidas a estrés y de p-LIMK en ratas control, sin afectar a los otros grupos experimentales..... | 24 |

**Índice de tabla**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla N° 1</b> Protocolos de inmuno western blot..... | 15 |
|--|----|

## Abreviaturas

|            |  |
|------------|--|
| ACTH       | : hormona adrenocorticotropa o adrenocorticotropina.   |
| ARC        | : adquisición de respuesta condicionada.   |
| BSA        | : albúmina de suero bovino.  |
| CA1        | : cuerno de Ammon 1 (área del hipocampo).  |
| CA3        | : cuerno de Ammon 3 (área del hipocampo).  |
| CRH        | : hormona liberadora de corticotropina.  |
| Eje HHA    | : eje <u>h</u> ipotálamo- <u>h</u> ipófisis- glándula <u>a</u> drenal.   |
| F-actina   | : actina filamentosa.  |
| FE         | : fallas en el escape.   |
| GAP        | : (del inglés GTP-ase activating protein), proteína de activación de la actividad GTP-asa.   |
| GCs        | : glucocorticoides.  |
| GD         | : giro dentado.  |
| GDI        | : (del inglés <i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i> ), inhibidor de la disociación de nucleótidos guanina.  |
| GEF        | : (del inglés <i>guanine nucleotide exchange factor</i> ), factor de intercambio de nucleótidos guanina.   |
| GR         | : receptor de glucocorticoides.  |
| i.p.       | : intraperitoneal  |
| ISRN       | : inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina.  |
| MHCs       | : (del inglés <i>myosin heavy chains</i> ), cadenas pesadas de miosina.  |
| MLC        | : (del inglés <i>myosin light chain</i> ), cadena ligera de miosina.   |
| MCLP       | : fosfatasa de la cadena ligera de la miosina.   |
| p-cofilina | : cofilina fosforilada.  |
| p-LIMK     | : quinasa de LIM fosforilada. LIM deriva de los 3 genes en los que los dominios LIM fueron descritos por primera vez ( <i>lin-11</i> from <i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Isl1</i> from rat, and <i>mec-3</i> from <i>C. Elegans</i> ). |
| p-MLC      | : cadena ligera de la miosina fosforilada.   |
| PVN        | : núcleo paraventricular.  |
| RhoA       | : (del inglés Ras homolog gene family, member A), familia de genes homólogos a Ras, miembro A.   |
| ROCK       | : (del inglés <i>Rho associated, coiled-coil kinase</i> ), quinasa asociada a la Rho.  |
| TAT        | : tasa o razón entre un parámetro medido en el brazo abierto y el mismo parámetro medido en ambos brazos (abierto + cerrado).  |
| TBS        | : (del inglés <i>tris buffered saline</i> ), salino tamponado con tris.  |

## Resumen

El estrés psicosocial está relacionado con patologías psiquiátricas como la depresión, la cual se caracteriza por el deterioro cognitivo y trastornos morfológicos como el acortamiento de espinas dendríticas y la simplificación de ramificaciones dendríticas. Estos cambios implican probablemente alteraciones en el citoesqueleto, el cual está compuesto principalmente por microtúbulos y actina. La GTPasa pequeña Rho es un importante regulador de la dinámica de actina y uno de sus efectores es la quinasa ROCK (*Rho associated, coiled coil kinase*). La transfección de neuronas piramidales del hipocampo con formas mutantes constitutivamente activas de ROCK produce simplificación de la arborización dendrítica y reducción en la densidad de espinas. Por lo tanto, proponemos que un inhibidor de ROCK, como fasudil, podría prevenir las alteraciones conductuales observadas en modelos animales de depresión, lo que debería correlacionarse con las modificaciones morfológicas propias del estrés.

Ratas macho adultas Sprague-Dawley (240-260 g) fueron divididas en cuatro grupos experimentales: control/solución salina (C/SAL), control/fasudil (C/FAS), estrés/ solución salina (S/SAL) y estrés / fasudil (S/FAS). El tratamiento con fasudil (10 mg/Kg) o solución salina se administró i.p. comenzando cuatro días antes del procedimiento de estrés de restricción, el cual se llevó a cabo por 2,5 horas/día durante 14 días.

Con el fin de observar síntomas asociados a la depresión promovidos por el estrés y su prevención por fasudil, llevamos a cabo la prueba de natación forzada y la de evitación activa. Los animales estresados mostraron un mayor tiempo de inmovilidad que los controles y fasudil previene este efecto al incrementar el tiempo de escalamiento, lo que sugiere un aumento del tono noradrenérgico. Además, los animales estresados mostraron una reducción en la adquisición de respuestas condicionadas con el consiguiente aumento en las fallas en el escape, lo que indica un deterioro del aprendizaje asociativo y de la memoria. Todos estos efectos fueron prevenidos por fasudil. Por otro lado, los animales control tratados con fasudil no mostraron alteraciones de la conducta.

Con el fin de evaluar los efectos bioquímicos producidos por el estrés y el tratamiento con fasudil, nos centramos en las vías RhoA/ROCK/LIMK siendo esta última una

quinasa que fosforila a cofilina promoviendo la polimerización de actina y RhoA/ROCK/MCL; MLCP, que regulan la dinámica de actina. Los resultados indicaron que el estrés no produce alteraciones en los niveles y cuantía de la fosforilación en las proteínas analizadas. En cambio, el tratamiento de los animales sometidos a estrés con fasudil, muestra una tendencia al incremento en los niveles de RhoA sin variación en el estado de fosforilación de LIMK y cofilina. Por otro lado, la administración de fasudil a animales controles promueve una tendencia al aumento en LIMK fosforilada que se correlaciona con un leve incremento en los niveles de cofilina fosforilada en el mismo grupo experimental, sugiriendo una relación de causalidad entre ambas proteínas. Estos resultados sugieren que en los animales controles tratados con fasudil, se observa la activación de señales compensatorias que promueven la activación de la vía LIMK/cofilina. Esto conduciría a la polimerización de actina y probablemente a la aparición de espinas. Por otro lado, queda por determinar si el estrés promueve vías asociadas al acortamiento o desaparición de espinas comandada por la actividad de ROCK/MCL; MLCP, y si estos cambios son prevenidos por el tratamiento con fasudil, en desmedro de la actividad de la otra vía en estudio. Esto explicaría la razón por la cual no hubo alteraciones en los niveles de p-cofilina ni en p-LIMK en ratas sometidas a estrés.

***Fasudil, a ROCK inhibitor, prevents behavioural alterations produced by restraint stress in animal models of depression***

**Summary**

Psychosocial stress is related with psychiatric pathologies like depression, which is characterized by cognitive impairment and morphological disruptions like dendritic spines shortening and dendritic branching simplification. These changes imply alterations on the dendritic cytoskeleton, which is composed principally by microtubules and actin. Rho is an important regulator of actin dynamic, and one of its effectors is ROCK (*Rho associated, coiled coil kinase*). Transfection of hippocampal pyramidal neurons with constitutively active ROCK mutant produces dendritic simplification and reduction in dendritic spines density. Thus, we propose that a ROCK inhibitor, like fasudil, may prevent depressive-like behaviour induced by stress, which should correlate with stress- related morphological alterations.

Adult male Sprague–Dawley rats (240–260 g) were divided in four experimental groups: control/saline (C/SAL), control/fasudil (C/FAS), stress/saline(S/SAL) and stress/fasudil S/FAS). Fasudil treatment (10 mg/Kg) or saline were administrated i.p., starting four days prior restraint stress procedure, which was conducted 2.5 hrs/day during 14 days.

In order to observe depression-like symptoms promoted by stress and their prevention by fasudil, we carried out the forced swimming test and the conditioned avoidance test. Stressed animals showed a higher time spent in immobility than controls. Fasudil prevents this effect by increasing the time spent climbing, suggesting an increase in noradrenergic tone. In addition, stressed animals showed a reduction of conditioned avoidance responses, with a concomitant increase in escape failures, indicating an impairment of associative learning and memory. All these effects were prevented by fasudil. On the other hand, control animals treated with fasudil did not show any behavioral alterations.

In order to evaluate biochemical effects produced by stress and fasudil treatment, we focused on the RhoA/ROCK/LIMK pathway, which last kinase (LIMK) phosphorylates to cofilin, promoting actin polymerization and RhoA/ROCK/MCL; MLCP, which regulates

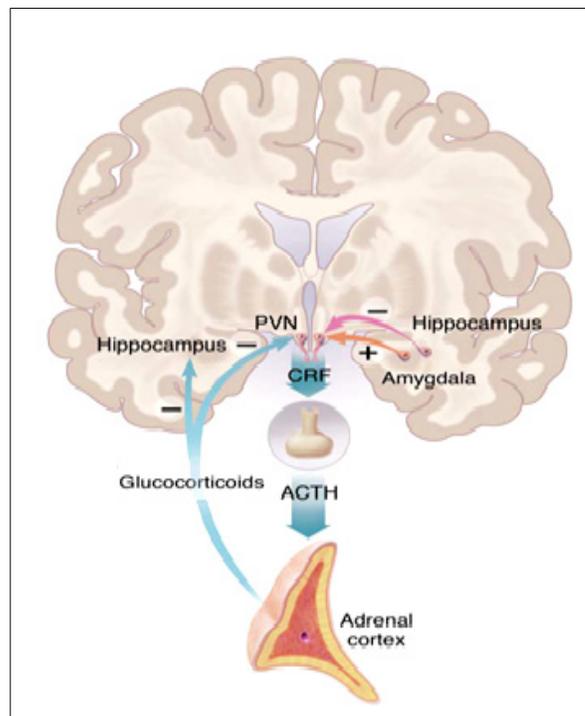
actin-myosin contraction. The results indicated that stress does not produce changes in levels of phosphorylation of analysed proteins. However, stressed animals which received fasudil treatment, show a trend to increase RhoA levels, without changes in phosphorylation state of LIMK and cofilin. On the other hand, fasudil administration to control animals promotes a trend to increase p-LIMK, which is correlated with a small increase in p-cofilin levels in the same experimental group, suggesting a causality relationship between them. These results suggest that control animals treated with fasudil show adaptative signals, which promote activation of LIMK/cofilin pathway. It is probable that the activation of this pathway conducts to actin polymerization, hence promoting spines formation. On the other hand, it remains to be determined whether or not stress triggers the activation of pathways associated with the shortening or disappearance of spines through the ROCK/MLC; MLCP pathway. Furthermore, it could be important to determine whether these changes are prevented by fasudil, decreasing the activity of the ROCK/LIMK/cofilin pathway. This could explain why no alterations were found on p-cofilin and p-LIMK levels in stressed rats.

## 1. Introducción

La depresión es la principal causa de discapacidad, medida por los años vividos con discapacidad (YLDs). Hoy en día, la depresión es la segunda causa de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs) en la categoría de edad de 15-44 años para ambos sexos combinados. (WHO 2011). En la etiología de este trastorno psiquiátrico parecen confluír factores genéticos (Lesch y Gutknecht 2005) y factores ambientales, tales como los acontecimientos vitales estresantes, los que pueden aumentar la susceptibilidad a desarrollar este trastorno (Caspi y cols. 2003; Nestler y cols. 2006). El estrés crónico involucra un aumento del tono nervioso simpático y la respuesta neuroendocrina del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA), lo que aumenta la secreción de glucocorticoides (GCs) suprarrenales (Brown y cols. 1999). Pruebas preclínicas y evidencias clínicas muestran que niveles altos de corticoides promueven el deterioro cognitivo y son parte de los factores fisiopatológicos que contribuyen a la depresión (Manji y Duman 2001; Fiedler y cols. 2007; Pittenger y Duman 2008). De hecho, el 50% de los pacientes con depresión presenta una mayor secreción de glucocorticoides (Linthorst y cols. 2000), presentando una elevada expresión de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y vasopresina en los núcleos paraventriculares (PVN) del hipotálamo (Linthorst y cols. 2000), y una mayor frecuencia de secreción episódica de cortisol (Deuschle y cols. 2003). De acuerdo a esto, diversos estudios han evaluado los mecanismos que se asocian a una mayor secreción de GCs, cuyos altos niveles provocarían efectos nocivos. De hecho, nuestro laboratorio ha demostrado que animales inyectados crónicamente con altas dosis de corticosterona inducen alteraciones cognitivas y sintomatología tipo depresiva (Ulloa y cols. 2010) (Ulloa y cols, 2010), lo que sugiere que los niveles altos de glucocorticoides podrían ser causa de parte de la sintomatología depresiva.

Entre los hallazgos importantes, se encuentra que el hipocampo regula negativamente la actividad del eje HHA a nivel del PVN del hipotalámico (**figura 1**). Esta acción es realizada mediante los receptores de glucocorticoides (GR), puesto que el hipocampo presenta una alta densidad de dichos receptores. En consecuencia, al activarse estos receptores, modulan la actividad de los circuitos sinápticos presentes en el PVN y que están relacionados con el aprendizaje, la memoria y función cognitiva (**figura 1**). Es así, que niveles altos de glucocorticoides atenúan la LTP (*long term potentiation*) y empeoran los

procesos asociados a memoria y el aprendizaje. Más aún, el estrés prolongado o niveles elevados de GCs producen una reducción en el volumen hipocampal (Czeh y Lucassen 2007), debido a la reducción de la complejidad del árbol dendrítico de neuronas hipocámpales (McEwen 2005). Además, se ha descrito recientemente que dicho estrés también es capaz de producir una reducción en la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocámpales y corticales. Las espinas corresponden a protrusiones postsinápticas que corresponden a los sitios de las sinapsis excitatorias glutamatérgicas. En síntesis, el incremento en los niveles de GCs podría producirse por alteraciones en la regulación que ejerce el hipocampo sobre el PVN, y, a su vez, los mismos GCs ejercen acciones a nivel del hipocampo, a saber, reducción de la ramificación dendrítica y de la densidad de sus espinas.



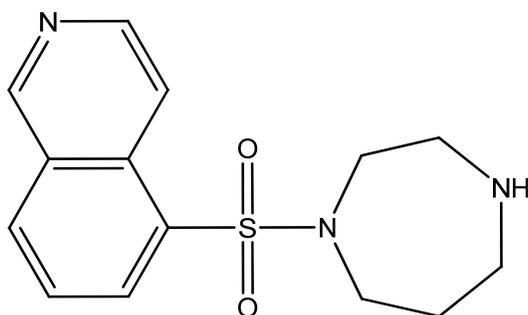
**Figura 1. Regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Corteza Adrenal.** Las neuronas parvocelulares del PVN del hipotálamo sintetizan CRH e integran información relevante para la regulación del estrés. Las vías más importantes incluyen aferencias excitatorias desde la amígdala y aferencias polisinápticas inhibitorias desde el hipocampo. Otra vía importante corresponde a las vías monoaminérgicas ascendentes (no mostradas). La CRH se libera por estas neuronas al sistema portal y actúa en los corticotropos de la adenohipófisis, para que se libere ACTH. La ACTH alcanza a la corteza adrenal a través del torrente sanguíneo, donde estimula la síntesis y por ende la liberación de GCs. Niveles altos de GCs dañan el hipocampo, lo que podría iniciar y mantener un estado de hipercortisolemia relacionado con algunos casos de depresión (Nestler y cols. 2002).

Se ha observado que la aplicación de procedimientos de estrés crónico en animales produce síntomas asociados a la depresión. Específicamente, utilizamos un modelo de estrés crónico por restricción de movimiento, el que genera alteraciones en la conducta que dan cuenta de síntomas propios de dicha patología, como por ejemplo: déficit afectivo y cognitivo, disminución de la memoria y sueño, como también ansiedad.

Es probable que las alteraciones cognitivas asociadas al estrés y al cuadro depresivo, se deban a alteraciones morfológicas en las neuronas, como el acortamiento de espinas dendríticas y la simplificación de las ramificaciones dendríticas (Magarinos y cols. 1999). La morfología neuronal está determinada por el citoesqueleto, el que está compuesto principalmente por actina (monomérica y en filamentos) y tubulina (monomérica y polimerizada formando microtúbulos), los que son capaces de polimerizar y depolimerizar, lo que les faculta para participar en el remodelamiento neuronal. La familia de las Rho GTPasas pequeñas controla el ensamblaje, desensamblaje y los re-arreglos dinámicos del citoesqueleto de actina y de microtúbulos. Esta familia está principalmente compuesta por RhoA, Rac1 y Cdc-42. Hay evidencia que indica que RhoA promueve la retracción de las espinas dendríticas y su posterior eliminación; en cambio, Rac1 promueve el desarrollo de nuevas espinas y participa en mantener la morfología normal de éstas; y, a su vez, Cdc-42 participa en la formación de protrusiones en neuronas, y por lo tanto, promueve la extensión de neuritas y la extensión del axón (Ethell y Pasquale 2005; Govek y cols. 2005). Por lo tanto, una manera de explicar una reducción en la densidad de espinas promovida por el estrés es quizás a través de un aumento de la actividad de RhoA.

Nos enfocaremos específicamente en la vía RhoA/ROCK. Las proteínas LIMK, MLC, y MLCP son reconocidos efectores de la quinasa dependiente de Rho (ROCK, Rho associated coiled coil kinase; **figura 3**). Se ha descrito que ROCK fosforila a LIMK en Thr-508 (Ethell y Pasquale 2005), activándola y promoviendo la fosforilación de cofilina, inactivándola. La cofilina activa promueve el “corte” de los filamentos de actina. Por tanto, la activación de esta vía promueve la estabilización de los filamentos de actina, lo que posiblemente está asociado a la elongación de espinas dendríticas. Por otro lado, ROCK fosforila tanto la MLC (cadena ligera de miosina) como la MLCP (fosfatasa de la cadena ligera de miosina), lo que provoca una estimulación eficiente de la contracción del complejo actina-miosina, produciendo acortamiento de las espinas (Govek y cols. 2005). Se ha encontrado que formas mutantes de ROCK constitutivamente activas producen simplificación dendrítica en neuronas piramidales hipocampales, hallazgos morfológicos

similares a los observados en casos de depresión y estrés (Nakayama y cols. 2000). En cuanto a las evidencias acerca de la influencia de ROCK en la dinámica de las espinas dendríticas, hay algunas discrepancias, puesto que se ha observado que el tratamiento con Y-27632, un inhibidor de ROCK, en cortes de hipocampo de ratas jóvenes, causa una disminución en la densidad de espinas y un incremento en la longitud de éstas. Sin embargo, en otro estudio, Y-27632 no afectó ni la densidad ni la longitud de las espinas de neuronas piramidales CA1 co-transfectadas con un plasmidio de expresión de GFP en cortes hipocampales de rata. Por otra parte, evidencia reciente sugiere que la señalización RhoA/ROCK antagoniza la formación y mantención de espinas (Ethell y Pasquale 2005; Govek y cols. 2005). Por lo tanto, sería interesante evaluar si un inhibidor de ROCK, como fasudil, impide la alteración morfológica promovida por el estrés, con la consiguiente prevención de los síntomas de la depresión.

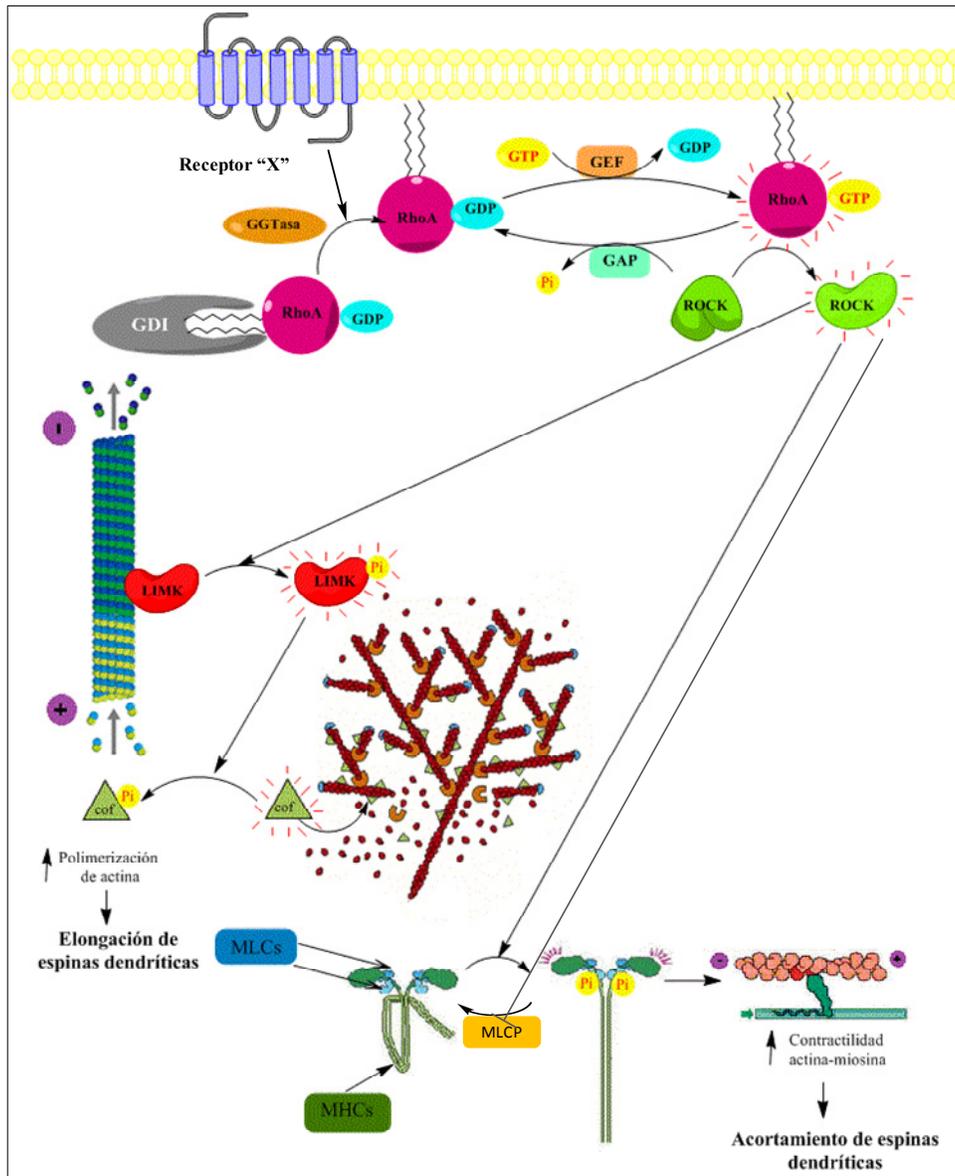


**Figura 2. Estructura química de fasudil.** Fasudil es un inhibidor competitivo del sitio de unión al ATP de la enzima ROCK, perteneciendo específicamente a la familia de las isoquinolinsulfamidas.

Fasudil es un fármaco con actividad antiespástica con buena tolerabilidad en su uso clínico. Se comercializa en países como China y Japón ( Drug Information Online, 2011). Este fármaco pertenece a la familia de las isoquinolinsulfamidas (**figura 2**) e inhibe competitivamente a ROCK al unirse al sitio de unión al ATP. Entre las características farmacocinéticas, se encuentra que fasudil traspasa la barrera hematoencefálica, tiene una vida media de 0,78 horas y da origen a un metabolito cuya actividad es mayor que la del fármaco original. Se trata de hidroxifasudil y tiene una vida media de 4,66 horas (Shibuya y cols. 2005). Actualmente, se han propuesto acciones farmacológicas adicionales, como antiangiogénico y antimetastásico, junto con propiedades neuroprotectoras y antioxidantes (Satoh y cols. 2001; Ying y cols. 2006; Yin y cols. 2007). En cuanto a las propiedades

neuroprotectoras, se ha observado que en experimentos de isquemia-reperfusión cerebral, fasudil previene la reducción de la función neurológica inherente a este tipo de accidentes vasculares (Satoh y cols. 2001). En estas alteraciones, se ve una activación de ROCK, quinasa que participa en la contracción del complejo actina-miosina, lo que provoca vasoconstricción. ROCK, al ser inhibida por fasudil, desencadena principalmente un efecto vasodilatador (sin mencionar la supresión de la quimiotaxis de los neutrófilos, inhibición de iNOS, entre otros efectos), disminuyendo así el área comprometida por la reducción de oxígeno y, en consecuencia, el daño neuronal. (Satoh y cols. 2001; Li y cols. 2009).

En conclusión, se esperaría que la administración crónica de fasudil logre inhibir a ROCK, con la consecuente inhibición de efectores río abajo, provocando una prevención de los efectos del estrés sobre la conducta de las ratas, las que mostrarían una mayor capacidad cognitiva, asociativa y de memoria.



**Figura 3. Vías de interés que participan en la regulación del citoesqueleto de actina.** Se muestran los mediadores que participan en las dos vías en que se enfocó esta memoria, a saber, RhoA/ROCK/LIMK/cofilina y RhoA/ROCK/MCL; MLCP. Es importante indicar que cuando LIMK se encuentra defosforilada, está estabilizando los microtúbulos. Además, se aclara que ROCK fosforila a las MLCs activándolas, e inhibe a la MLCP. Abreviaturas: MHCs: cadenas pesadas de miosina; GDI: inhibidor de la disociación de nucleótido guanina; GEF: factor de intercambio de nucleótido guanina; GAP: proteína de activación de la actividad GTP-asa.

## 2. Hipótesis

La inhibición farmacológica de ROCK con fasudil previene alteraciones conductuales y bioquímicas observadas en modelos animales de depresión.

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Determinar si la inhibición farmacológica de ROCK, mediante fasudil, previene la sintomatología depresiva y ansiosa, junto a las alteraciones bioquímicas promovidas por el estrés crónico en ratas.

### 3.2 Objetivos específicos

- ◆ Determinar si la administración crónica de fasudil previene la conducta depresiva y ansiosa promovida por el estrés.

El estrés promueve conductas ansiosas y depresivas observadas en los ensayos conductuales. Diversa evidencia señala que animales estresados crónicamente por restricción de movimiento muestran alteraciones cognitivas, desesperanza aprendida y rasgos ansiosos (Bravo y cols. 2009). Por lo tanto, en esta memoria se determinará, utilizando test conductuales en ratas, si fasudil es capaz de prevenir dichas conductas, ejerciendo acciones similares a un antidepresivo.

- ◆ Determinar cuáles son las alteraciones promovidas por el estrés en proteínas reguladoras de la dinámica del citoesqueleto de actina, y evaluar si fasudil previene dichos cambios.

El citoesqueleto de actina está regulado en gran medida por la vía RhoA/ROCK y sus efectores. En este trabajo, nos enfocamos en determinar mediante inmuno western blot los niveles de RhoA, LIMK y cofilina. Estas proteínas se relacionan según lo que se muestra en la **figura 3**. Se determinará si el estrés crónico produce alguna alteración en los niveles de dichas proteínas y si fasudil puede prevenirlas.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Animales

Ratas macho adultas Sprague-Dawley (240-260g) fueron mantenidas en grupos de cuatro animales por jaula en una sala con control de temperatura (22-23 °C) y humedad (55-65%), con un ciclo estándar de luz/oscuridad (12 horas: 12 horas). El pellet y el agua fueron provistos *ad libitum*, excepto cuando se aplicaba el estrés por restricción. La ingesta de alimentos y agua fue monitoreada por el experimentador, y todas las ratas se pesaron previamente a y durante los tratamientos. Se procuró escoger ratas que tuviesen pesos similares en todos los grupos experimentales. Todas las pruebas de conducta fueron realizadas por observadores ciegos. Estos test se llevaron a cabo de 13:00 a 17:00 horas en una habitación tranquila. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (FONDECYT 108-0489).

### 4.2. Tratamientos de los animales

Se realizaron cinco series experimentales, usando las dos primeras para evaluar la conducta, y una tercera que sólo fue utilizada para determinar proteínas. Sólo en el caso del número de heces (véase punto **4.4.3.**) se usó la tercera serie y dos series más, que se destinaron a la evaluación de la morfología de neuronas hipocampales CA1 (datos en proceso de análisis).

Hay que considerar que una de las series realizadas para estudios de comportamiento se efectuó administrando el fármaco/solución salina paralelamente al tratamiento de restricción; las otras series se realizaron administrándolo 4 días previamente a la inducción de estrés. Debido a la gran similitud entre los resultados obtenidos en las dos series para conducta, decidimos juntar los datos obtenidos de ambas series.

Las ratas se distribuyeron en cuatro grupos (**figura 4**), (i) control sin estrés, inyectadas cada día durante 18 días con una solución salina (0,9% NaCl) (C/SAL); (ii) 14 días de estrés de restricción, inyectadas durante 18 días con solución salina (a partir de 4 días previamente al estrés) (S/SAL); (iii) control no estresados, inyectados todos los días durante 18 días con fasudil 10 mg/kg. (C/FAS); y (iv) 14 días de estrés de restricción, inyectadas durante 18 días con fasudil 10 mg/kg (a partir de 4 días previamente

al estrés) (S/FAS). La dosis de fasudil se escogió en base a estudios que demostraron una acción neuroprotectora de fasudil (Li y cols. 2009). Fasudil (Laboratorios LC, E.E.U.U.) se disolvió en solución salina y se esterilizó mediante filtración (tamaño de poro 0,2  $\mu\text{m}$ ). Todas las inyecciones fueron intraperitoneales y se llevaron a cabo 15 min antes del protocolo de estrés. Se realizó un set de experimentos para medir la conducta (punto final), otro para medir cambios moleculares y uno más para medir morfología dendrítica

Los animales fueron sacrificados por decapitación un día después de la última sesión de estrés, entre las 09:00 - 11:00 horas. Se tuvo especial cuidado para evitar el estrés pre-decapitación, y por ello, los animales se quedaron fuera de la sala y fueron manejados por unos pocos minutos antes de la eutanasia. Los cerebros de las ratas fueron aislados, luego se procedió a disecar en hielo el hipocampo, la corteza y el cuerpo estriado, y rápidamente fueron congelados en nitrógeno líquido a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta su posterior homogenización y análisis de proteínas.

#### 4.3. Estrés por restricción de movimiento

El procedimiento de restricción se hizo en una habitación distinta a la de mantención. En este estudio se utilizó una restricción moderada de movimiento ya validada en nuestro laboratorio (Bravo y cols. 2009). Este procedimiento consistió en introducir a las ratas en tubos de Plexiglas (25x 8 cm), de ancho suficiente para permitir una respiración cómoda, pero restringidos sus movimientos por 2,5 horas al día durante 14 días consecutivos. Cada sesión de estrés se realizó entre las 9:00 - 12:00 horas, para evitar cualquier efecto debido a cambios en los ritmos circadianos. Los animales no estresados fueron inyectados con solución salina o fasudil, y dejados tranquilos en su jaula. Después del procedimiento, los animales estresados y no estresados fueron devueltos a sus respectivas jaulas.

#### 4.4. Pruebas fisiológicas

##### 4.4.1. Ganancia de peso corporal

El estrés afecta los parámetros fisiológicos regulados por la activación del eje HHA (Dhabhar y cols. 1997). Uno de ellos es la ganancia de peso; de hecho, se ha observado que la administración de CRH a ratas produce una reducción en el peso, a

través de la estimulación de la síntesis de glucocorticoides. La determinación de este parámetro será útil como indicador de estrés.

#### 4.4.2. Masa de glándulas adrenales

Se ha observado que las ratas estresadas muestran un aumento en la masa de las glándulas adrenales, lo que es producido por la hiperactivación del eje HHA, la que podría verse reflejada en la hipertrofia de dichas glándulas. Por lo tanto, este parámetro es otro indicador de estrés en ratas.

#### 4.4.3. Producción de heces

Decidimos medir este parámetro como un indicador complementario que muestra la emocionalidad de las ratas (Cryan 2005). Hay evidencia de que la CRH, el nervio vago y el receptor 5-HT<sub>3</sub> podrían ser mediadores importantes en la motilidad intestinal, proceso que, en la mayoría de los casos, está incrementado en ratas estresadas. (Nakade y cols. 2007)

#### 4.5. Pruebas conductuales

##### 4.5.1. Prueba de natación forzada

El test de natación forzada es usado frecuentemente para evaluar la eficacia de potenciales fármacos antidepresivos en ratas. La inmersión de ratas en el agua por un extendido período de tiempo produce una conducta característica de inmovilidad, que refleja la desesperanza aprendida. El tratamiento antidepresivo disminuye la conducta de inmovilidad, cambio acompañado por un aumento en la respuesta de escape (escalar y nadar) (Lucki 1997). Este test fue realizado de acuerdo a lo descrito por Lucki (Lucki 1997), y de acuerdo a lo que se ha descrito en el laboratorio (Bravo y cols. 2009). Un cilindro transparente de plexiglas (50 cm de alto x 20 cm de ancho) se llenó hasta una profundidad de aprox. 30 cm de alto con agua a 24 °C. A esta profundidad, las ratas no pueden tocar la base del cilindro con sus colas o sus patas traseras. El día 14, 4 hrs. después de los tratamientos, todas las ratas fueron expuestas durante 15 minutos, ubicándolas en el cilindro lleno de agua. El día 15 los animales fueron sometidos a 5 minutos de natación forzada y se midieron las conductas activas (escalamiento y natación). El escalamiento consiste en el intento del animal de subir por las paredes del tubo, y la natación corresponde sencillamente a los movimientos a través de la superficie del agua.

La conducta de inmovilidad se calculó como la duración del tiempo en que el animal no presentó conductas activas de escape (diferencia aritmética entre el tiempo total del test y el tiempo que permaneció escalando y nadando). Después del test, las ratas se retiraron del cilindro, se secaron con una toalla y fueron regresadas a su jaula de origen. El agua del cilindro se fue cambiando entre las ratas.

#### 4.5.2. Prueba de condicionamiento por evitación activa

La prueba de condicionamiento por evitación activa mide la capacidad del animal para evitar un evento aversivo y provee una forma de evaluar el aprendizaje asociativo y la memoria. Este test fue realizado tal como está descrito previamente (Mora y cols. 1993), 18-20 hrs después de la natación forzada. El objetivo de esta prueba determina si el estrés por restricción de movimiento es capaz de modificar la capacidad de adquirir una respuesta condicionada (medida como “adquisición de respuestas condicionadas”), y si promueve la condición de desesperanza aprendida (medida como “fallas en el escape”).

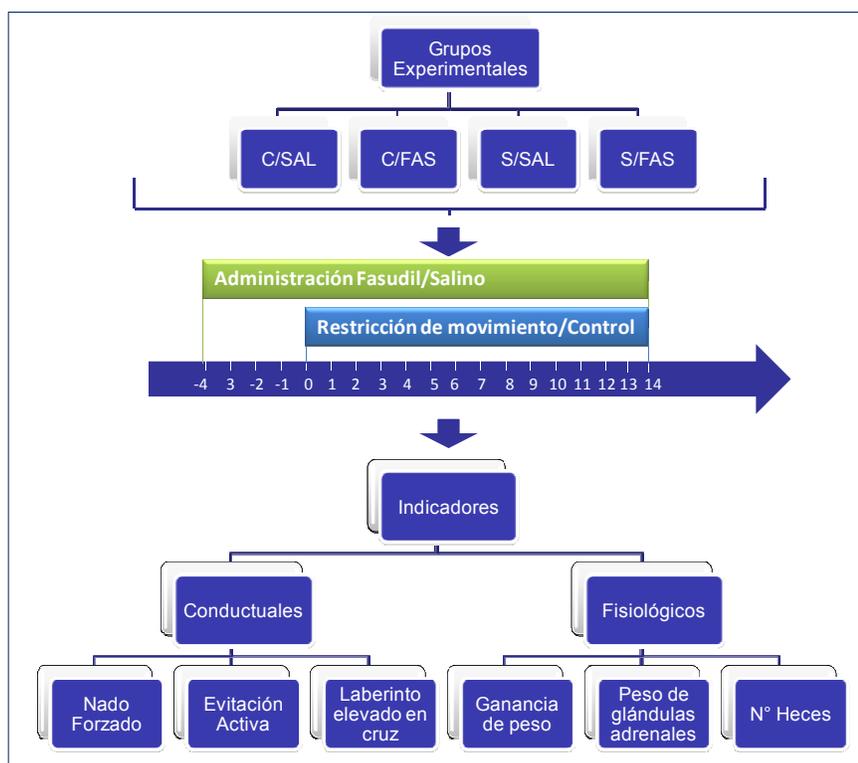
En esta prueba, cada animal fue colocado individualmente en una caja compuesta por dos compartimentos de acero inoxidable, entre las cuales hay una apertura para que el animal pase de un lado a otro (Two-way shuttle box, Lafayette Instrument Co., Lafayette, IN, EE.UU.). Cada compartimento está equipado con una rejilla de 18 barras en el piso, a través de la cual se puede aplicar un choque eléctrico de intensidad variable de forma independiente, dos ampolletas de 28V DC y un generador de tonos audibles (Mallory Sonalert 2.800 Hz, Lafayette Instrument Co., Lafayette, IN, EE.UU.). Los choques eléctricos se administraron con una fuente de poder (Lafayette Instrument Co., Lafayette, IN, EE.UU.).

Antes de cada ensayo hubo 5 minutos de habituación a la caja de condicionamiento, durante los cuales la rata puede explorar ambos compartimentos. Luego se hicieron 50 ensayos, lo que dura en total aproximadamente 30 minutos. Cada ensayo se inició aplicando un estímulo condicionante (tono) durante 5 segundos, a continuación se sobrepuso un choque eléctrico (0,2-0,5 mA) en el piso de la caja, que dura 10 segundos, y posteriormente hubo un descanso de 15 segundos antes de iniciar el siguiente ensayo. Las posibles respuestas de la rata fueron: escape con el tono durante los primeros 5 segundos y antes del choque eléctrico, lo que se denominó adquisición de una respuesta condicionada (ARC); escape con el choque eléctrico; y que no haya escape ni con el tono ni con el choque eléctrico, lo que se denominó falla en el escape (FE) (Mora y cols. 1993).

#### 4.5.3. Prueba del laberinto elevado en cruz

El laberinto elevado en cruz es una prueba conductual ampliamente utilizado para evaluar la ansiedad y los efectos ansiogénicos o ansiolíticos de agentes farmacológicos. (Pellow y cols. 1985; Walf y Frye 2007). Los animales que presentan conductas de tipo ansiosa en el laberinto elevado en cruz, usualmente muestran reducciones tanto en el número de entradas, como en el tiempo que permanecen en los brazos abiertos, con un incremento en la cantidad de tiempo pasada en los brazos cerrados. Este ensayo se realizó un día después del test de natación forzada.

Se inyectaron los animales con fasudil o solución salina, y fueron colocados individualmente en este laberinto. Este aparato consiste de dos brazos abiertos (50x10 cm cada uno), dos brazos cerrados (50x10x20 cm cada uno) y una plataforma central (10x10 cm), dispuestos de manera tal que los brazos del mismo tipo estén opuestos uno al otro. El laberinto está hecho de Plexiglas negro y está a una altura de 100 cm del suelo. Al comienzo de cada ensayo, los animales se ubicaron al centro del laberinto, de cara a un brazo cerrado. Durante un período de 5 minutos, se registró: a) número de entradas en el brazo abierto, b) número de entradas en el brazo cerrado, c) tiempo que pasan en los brazos abiertos y d) tiempo que permanecen en los brazos cerrados. La entrada en un brazo se definió como la ubicación del animal con sus cuatro patas en el brazo. TAT (Tasa de abierto a total) para las entradas en un brazo se calculó como un indicador de la exploración en brazo abierto y se definió como el porcentaje de entradas en los brazos abiertos en relación a las entradas totales (brazo abierto+ brazo cerrado). TAT también se calculó en función del tiempo y se definió como el porcentaje del tiempo pasado en los brazos abiertos relativo al tiempo total (brazo abierto + brazo cerrado). Las entradas totales se analizaron como una medida de cambios no específicos en la actividad locomotora. El laberinto se aseó minuciosamente con etanol 5% después de cada animal.



**Figura 4. Esquema del estudio conductual.** Se muestran los 4 grupos experimentales del estudio: control/salino(C/SAL), control/fasudil (C/FAS), estrés/salino (S/SAL) y estrés/fasudil (S/FAS). Los tratamientos se extendieron por 18 días. Se comenzó la administración de salino/fasudil 4 días antes de iniciar el procedimiento del estrés, que duró 14 días. Una vez realizados los tratamientos, dichos grupos fueron sometidos a la evaluación de los indicadores conductuales y fisiológicos que se muestran en la figura.

#### 4.6. Análisis de inmuno western blot.

Se prepararon homogeneizados de hipocampo como fue descrito previamente (Bravo y cols. 2009). Setenta y cinco  $\mu\text{g}$  de proteína de cada homogeneizado fueron resueltos por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 15% y transferidos en membranas de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$ , o bien en membranas de PVDF de 0,2  $\mu\text{m}$ . Para evaluar la calidad de la transferencia en las membranas de nitrocelulosa, éstas se tiñeron con solución S Ponceau (0.2% de Ponceau S, 3% de ácido tricloroacético y 3% de ácido sulfosalicílico).

Las proteínas mayores a 40 KDa fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa; en cambio, aquellas de P.M. menor a 28 KDa, como cofilina (total y fosforilada) y RhoA, fueron

transferidas a membranas de PVDF. Las membranas de nitrocelulosa también fueron utilizadas para determinar  $\beta$ -actina como control de carga. Las membranas usadas para p-cofilina o p-MLC fueron lavadas en solución Re-Blott Plus Mild 1:10 (Millipore, Temecula, California, USA) por 5 minutos, con el objetivo de retirar los anticuerpos primarios. Luego, las membranas fueron lavadas dos veces con agua y una vez con TBS-Tween 0,1%. Por otra parte, las membranas de nitrocelulosa, usadas para determinar p-LIMK, fueron lavadas con solución S Ponceau por 1 hora (para retirar los anticuerpos primarios) y luego lavadas de la misma forma que las membranas de PVDF.

Finalmente, las membranas fueron incubadas con otro anticuerpo primario, es decir, cofilina total. Las intensidades de las bandas fueron determinadas y analizadas usando el software UN-SCAN-IT. Los resultados fueron expresados como la razón de RhoA/ $\beta$ -actina, p-LIMK/ $\beta$ -actina y p-cofilina/cofilina total en forma porcentual. La **tabla 1** contiene las condiciones en las que fueron realizados estos análisis.

#### 4.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa estadístico GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU). Los datos se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. (error estándar medio). Para determinar diferencias estadísticas entre pares de grupos experimentales, los datos que presentaban sólo un factor que determine la variable dependiente (tratamientos, C/SAL, C/FAS, S/SAL o S/FAS) y que va a determinar el tiempo de inmovilidad (variable dependiente) en la prueba de natación forzada, fueron evaluados mediante ANOVA no paramétrico de una vía (test Kruskal-Wallis), seguido por el test de Dunn. Por otro lado, si los datos presentaban dos factores (por ejemplo, el aumento de peso corporal depende de dos factores: el tiempo (días de tratamiento) y el tratamiento como tal), la significancia estadística fue evaluada mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas, utilizando el test post hoc de Bonferroni para realizar comparaciones entre pares de grupos experimentales. Finalmente, en el caso de los análisis en que se comparan sólo dos grupos experimentales, se realizó el test-t no pareado, seguido de un análisis de Mann Whitney.

**Tabla 1. Condiciones, características y concentraciones de los anticuerpos y buffers utilizados en los análisis de inmuno western blot.**

| Proteína   | N°catálogo        | Bloqueo                                 | Ac 1°    | Ac 2°    |
|--|-------------------|---|----------|----------|
| RhoA (anti-mouse), <b>Santa Cruz</b>                                   | (26C4): sc 418    | Leche al 1% en TBS-Tween 1%, 15 minutos | 1:250    | 1:10.000 |
| p-LIMK1 (Thr508)/ p-LIMK2(Thr505) (anti-rabbit), <b>Cell Signaling</b> | #3841             | BSA al 2% en TBS-Tween 0,1%,            | 1:250    | 1:10.000 |
| p-cofilina (Ser3) (anti-rabbit), <b>Cell Signaling</b>                 | # 3313            | BSA al 5% en TBS-Tween 0,1%, 1 hora     | 1:500    | 1:10.000 |
| Cofilina total (anti-rabbit), <b>Cytoskeleton</b>                      | #ACFL02, Lot #037 | Leche al 3% en TBS-Tween 0,1%, 1 hora   | 1: 3.000 | 1:10.000 |
| $\beta$ -actina (anti-rabbit), <b>Sigma</b>                            | A 5060            | Leche al 1% en TBS-Tween 1%<br>1h       | 1:10.000 | 1:10.000 |

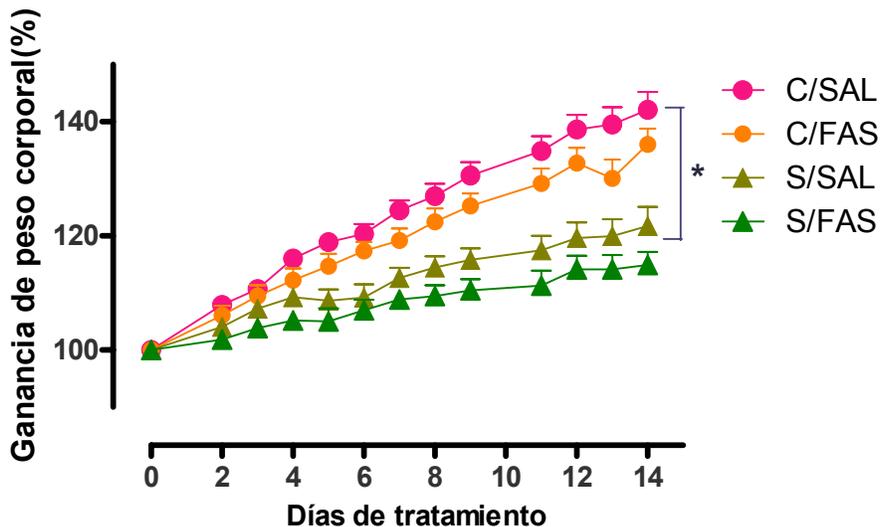
Se señalan las proteínas “blanco” de los anticuerpos, considerando los aminoácidos fosforilados, según corresponda. También se indica su marca y número de catálogo. Además, se mencionan las condiciones en las que fueron utilizados dichos anticuerpos (concentración, bloqueo y tampones utilizados).

## 5. Resultados

### 5.1. Indicadores fisiológicos

5.1.1. El estrés por restricción de movimiento disminuye la ganancia de peso corporal, efecto no prevenido por la administración crónica de fasudil.

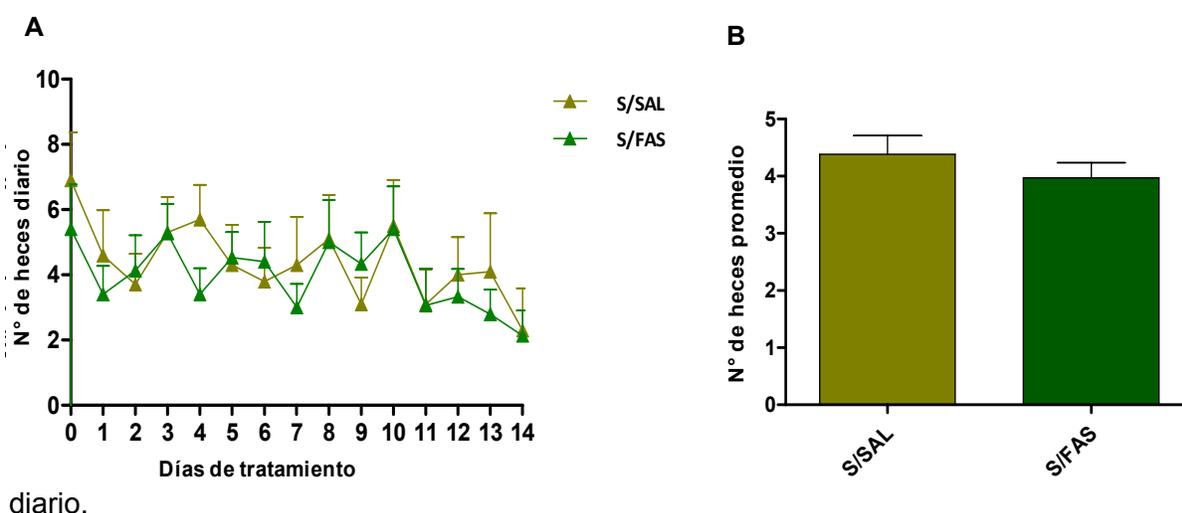
Debido a que la ganancia de peso corporal es un parámetro que es alterado por el estrés y a que puede ser modificado por fasudil, fue determinado en cada grupo experimental. La ganancia de peso corporal fue definida como la diferencia entre el peso diario y el peso inicial. Esperamos que el estrés promueva cambios en este parámetro. La **figura 5** muestra la ganancia de peso corporal durante 14 días de tratamiento. Animales sujetos a restricción crónica (S/SAL) ganaron menos peso que las ratas control (C/SAL). De hecho, el ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró un efecto significativo del tiempo ( $F(12, 216) = 256,68$ ,  $p < 0.0001$ ) y del tratamiento de estrés. También demostró una interacción significativa tiempo x tratamiento (véase estadística en la **figura 5**). El tratamiento con fasudil en ratas controles no produjo variación en la ganancia de peso



**Figura 5. El estrés por restricción de movimiento disminuye la ganancia de peso corporal, efecto que no es prevenido por la administración crónica de fasudil.** Los valores corresponden a los promedios  $\pm$  E.E.M de los cambios en el peso corporal como porcentaje de los valores iniciales para animales C/SAL ( $\bullet$ ,  $n=5$ ), C/FAS ( $\bullet$ ,  $n=5$ ), S/SAL ( $\blacktriangle$ ,  $n=6$ ) o S/FAS ( $\blacktriangle$ ,  $n=6$ ). Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías. No hubo diferencias entre el grupo C/SAL y C/FAS. Los animales sujetos a restricción crónica (S/SAL) ganaron menos peso que los controles (C/SAL) ( $p < 0,01$  días 5,6 y 7;  $p < 0,001$  días 8 a 14.) No hubo diferencia cuando se compararon los grupos S/SAL y S/FAS.

### 5.1.2. Fasudil no afecta la producción diaria y promedio de heces.

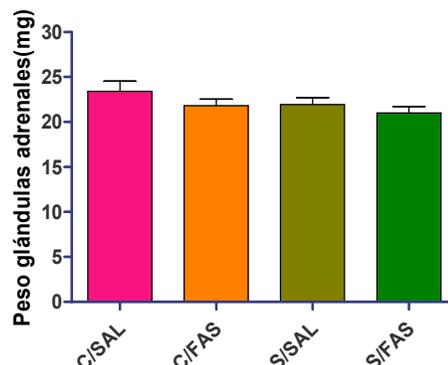
Con el objetivo de tener un indicador adicional del estrés inducido en las ratas, decidimos medir la cantidad de heces producidas diariamente por las ratas durante el período de estrés (2,5 horas) y el promedio de esta medición durante los 14 días de este procedimiento. Como se observa en la **figura 6.A**, no hay diferencias significativas entre los grupos S/SAL y S/FAS al comparar la producción de heces diarias. No obstante, se observó que existe un factor del tiempo sobre la producción de heces que fue estadísticamente significativa ( $F(14,322) = 1,91, p < 0,05$ ) pero no hubo efecto del tratamiento con fasudil. Por otra parte no hubo efecto de fasudil sobre el promedio de heces



**Figura 6. Fasudil no altera la producción de heces diaria y promedio durante el estrés. A.** Producción de heces **diaria**. Las barras representan el promedio  $\pm$  E.E.M. de la cantidad de heces (expresadas como valor absoluto) producidas durante todo el tratamiento de restricción. Los datos fueron analizados mediante t-test no pareado. Los grupos S/SAL y S/FAS no mostraron diferencias en la producción total de heces. ( S/SAL: n=10 y S/FAS: n= 15). **B.** Producción **promedio de** heces diaria. Los valores son el promedio  $\pm$  E.E.M del número de heces diario (expresado como valor absoluto) durante el tratamiento de restricción. Los datos fueron analizados mediante test-t no pareado. El fasudil no afecto la producción de heces diarias( S/SAL :n=10 y S/FAS: n= 15).

5.1.3. El estrés y fasudil no alteran la masa de las glándulas adrenales.

Se decidió determinar si los tratamientos producen variación en la masa de ambas glándulas adrenales de las ratas. La **figura 7** muestra que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos experimentales.

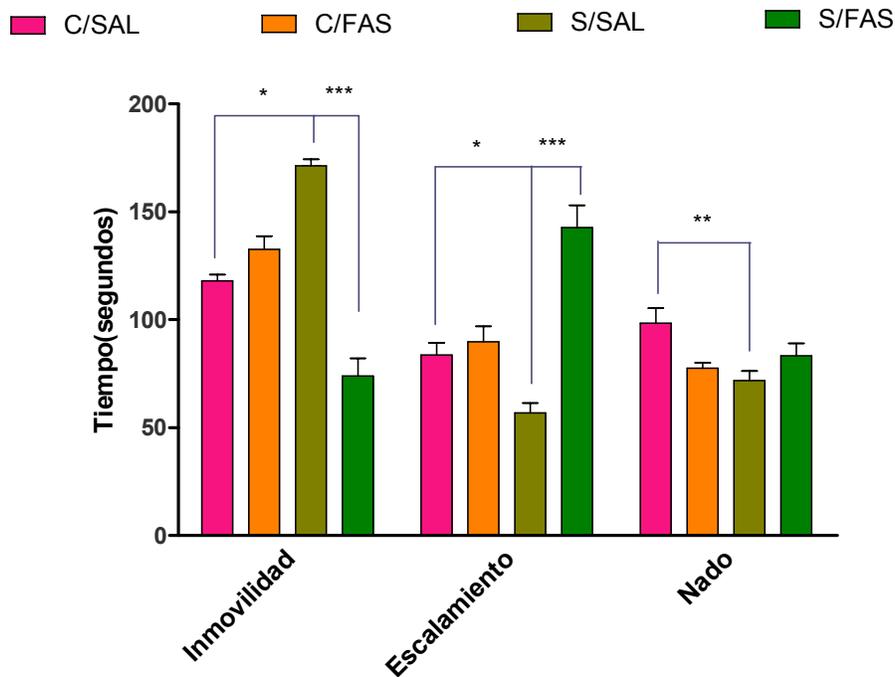


**Figura 7. El estrés y fasudil no alteran la masa de las glándulas adrenales. A.** Masa de las glándulas adrenales. El gráfico de barras representa el promedio  $\pm$  E.E.M de la masa de las glándulas adrenales luego del tratamiento de restricción de movimiento. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos experimentales. (C/SAL y C/FAS: n=9, S/SAL y S/FAS: n=10)

## 5.2. Pruebas conductuales

5.2.1 El estrés por restricción de movimiento aumenta el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada, efecto prevenido por la administración crónica de fasudil.

Con el test de natación forzada, se busca evaluar el grado de desesperanza aprendida que inducen los tratamientos. Al observar la **figura 8**, es posible notar que fasudil no produjo efectos en los animales controles (grupo C/SAL v/s C/FAS). Por otra parte, el grupo S/SAL pasó menos tiempo escalando y nadando que el C/SAL. Un hecho importante, es que el tratamiento crónico con fasudil previene la disminución del tiempo de escalamiento promovida por el estrés. Con los resultados obtenidos, se concluye que estamos en presencia de un modelo de depresión que efectivamente probó su capacidad de producir un mayor grado de desesperanza aprendida en ratas S/SAL respecto de las C/SAL y por otra parte, fasudil logró prevenir este síntoma en dichas ratas, al reducir el tiempo de inmovilidad e incrementando el tiempo de escalamiento.

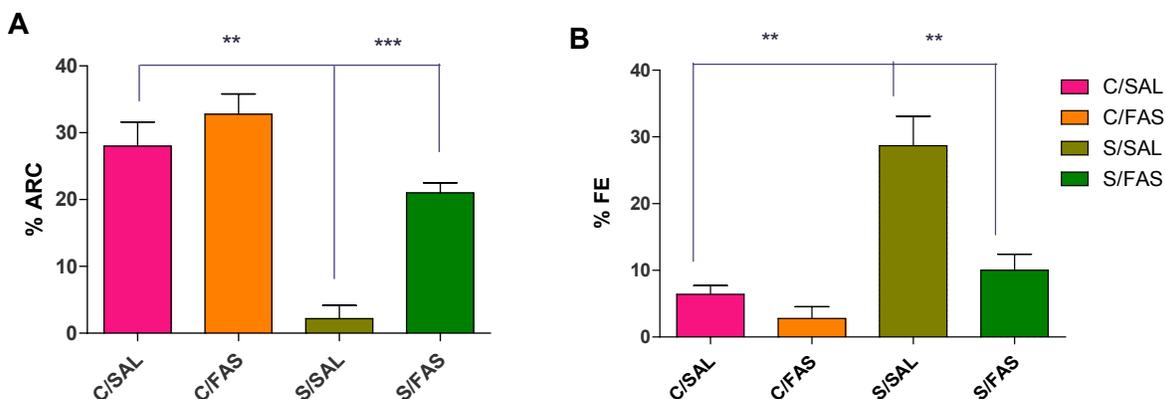


**Figura 8. El estrés por restricción incrementa el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada, efecto prevenido por la administración crónica de fasudil.** El gráfico de barras muestra el tiempo que los animales permanecieron en conductas activas (escalamiento y natación) o inmóviles. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía. Fasudil no produjo efectos en los animales control (grupo C/FAS). El grupo S/SAL pasó menos tiempo escalando y nadando que el grupo C/SAL (S/SAL (n=6) v/s C/SAL(n=5):  $p < 0,05$  para escalamiento y  $p < 0,01$  para natación). El tratamiento crónico con fasudil previno la disminución en el tiempo de escalamiento promovida por el estrés.(S/SAL v/s S/FAS (ambos grupos: n=6;  $p < 0,001$ ).

5.2.2 El estrés por restricción de movimiento disminuye %ARC e incrementa %FE en el test de evitación condicionada, lo que fue prevenido por la administración crónica de fasudil.

El propósito de esta prueba es evaluar el aprendizaje asociativo y la memoria de las ratas. Para ello, se diseñaron indicadores como el porcentaje de la adquisición de respuesta condicionada (%ARC), que se define como el número de veces que la rata cruza hacia la cámara opuesta dentro de los primeros 5 segundos, cuando sólo está presente el tono (para más detalles, véase **punto 4.4.2**) y el porcentaje de fallas en el escape (%FE), el que se define como el porcentaje de fallas en el escape frente al choque eléctrico dentro de los primeros 10 segundos. La **figura 9** muestra que el grupo S/SAL presentó una reducción significativa en ARC comparada al grupo C/SAL. Este efecto fue prevenido por el tratamiento crónico con fasudil. De acuerdo a esto, el grupo S/SAL mostró un aumento significativo en %FE comparado con el grupo C/SAL. El tratamiento crónico con fasudil

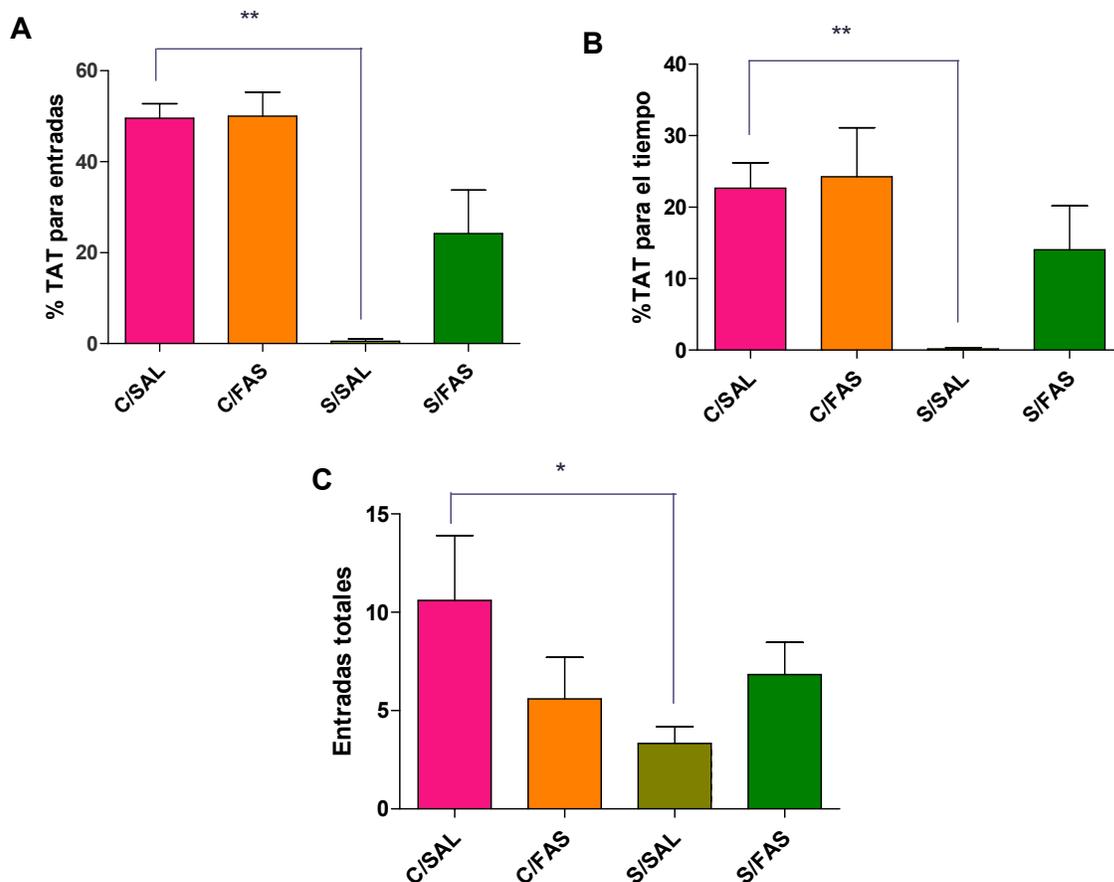
previene el incremento en %FE en animales S/SAL. Por otra parte, fasudil no alteró dichos indicadores en las ratas C/FAS respecto de las C/SAL. A partir de estos resultados, se desprende que el modelo de depresión utilizado efectivamente provoca un deterioro de la memoria asociativa y el aprendizaje, síntomas importantes en la depresión. También, se concluye que fasudil previene dichos síntomas, hecho que coopera con el perfil de potencial antidepressivo de dicho fármaco.



**Figura 9. La restricción crónica reduce %ARC e incrementa las %FE en el test de evitación condicionada, efecto que fue prevenido por la administración crónica de fasudil. A.** El gráfico de barras muestra que la respuesta de evitación condicionada (ARC), que fue definida como un cruce hacia la cámara opuesta en los primeros 5 segundos (sólo cuando el tono está presente). Los datos fueron expresados como un porcentaje de los intentos totales  $\pm$  E.E.M. y fueron analizados por ANOVA de una vía. El grupo S/SAL presentó una reducción significativa en el %ARC comparado con el grupo C/SAL (C/SAL (n=5) v/s S/SAL(n=6):  $p < 0,01$ ). Este efecto fue prevenido por el tratamiento crónico con fasudil (S/SAL v/s S/FAS (n=6):  $p < 0,001$ ). **B.** El gráfico de barras muestra el número promedio del porcentaje de fallas en el escape (%FE), las que fueron definidas como una respuesta de no escape al choque eléctrico dentro de 10 s. Los datos fueron expresados como un porcentaje de los intentos totales  $\pm$  E.E.M. El grupo S/SAL mostró un incremento significativo en el %FE comparado con el grupo C/SAL (C/SAL v/s S/FAS:  $p < 0,01$ ). El tratamiento crónico con fasudil previno el efecto del estrés (S/SAL v/s S/FAS:  $p < 0,01$ ).

5.2.3 El estrés por restricción de movimiento, aumenta %TAT para las entradas, para el tiempo y para las entradas totales, pero fasudil no previene estos efectos.

El laberinto elevado en cruz, constituye una prueba que permite evaluar el grado de ansiedad en las ratas. Para ello, se utilizó el indicador %TAT, que corresponde a la razón expresada en porcentaje entre un determinado parámetro en el brazo abierto y el mismo parámetro en ambos brazos (brazo abierto + brazo cerrado). El %TAT para las entradas, corresponde a la razón entre las entradas en el brazo abierto y las entradas totales (brazo abierto + brazo cerrado). El %TAT para el tiempo, es la razón entre el tiempo que las ratas permanecieron en el brazo abierto y el tiempo permanecido en ambos brazos (brazo abierto + brazo cerrado). Por otro lado, se utilizó otro indicador, denominado Entradas totales y que es el valor absoluto del número de entradas totales (brazo abierto + brazo cerrado). Según la **figura 10.A**, fasudil no produjo efectos en animales C/FAS en comparación al grupo C/SAL. Por otra parte, el grupo S/SAL muestra una disminución significativa en %TAT para las entradas comparado al grupo C/SAL. Sin embargo, fasudil no mostró diferencias estadísticamente significativas que le permitieran prevenir dicho efecto, a pesar de que muestra una clara tendencia a incrementar %TAT para las entradas (S/SAL v/s S/FAS). En la **figura 10.B**, fasudil no ejerció efectos en ratas C/FAS. El grupo S/SAL mostró una disminución en %TAT para el tiempo en comparación a C/SAL. Este efecto no logra ser prevenido por la administración de fasudil, a pesar de que se observa una tendencia que indicaría que es capaz de incrementar %TAT para el tiempo. En relación a la **figura 10.C**, se observa que el grupo C/FAS no presentó diferencias con respecto al grupo C/SAL. Por otra parte, el grupo S/SAL mostró una reducción significativa en las entradas totales comparada con el grupo C/SAL. Dicho efecto no fue prevenido por fasudil. Tomando toda esta información, es posible deducir que el modelo utilizado además de producir sintomatología “*tipo-depresiva*”, es capaz de generar conducta ansiosa, siendo el primer rasgo prevenido por fasudil.



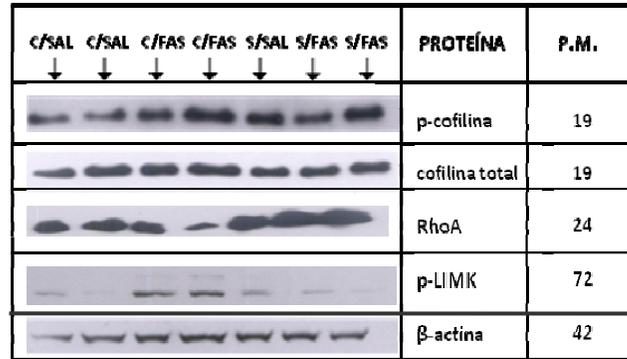
**Figura 10. El estrés por restricción crónica produce ansiedad la cual no fue prevenida por el tratamiento con fasudil.** Los gráficos de barras representan % de TAT para las entradas, %TAT para el tiempo y las entradas totales. Los datos fueron analizados a través de ANOVA de una vía. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  E.E.M. **A.** El %TAT para las entradas es una razón entre las entradas en los brazos abiertos y las entradas totales (brazos abiertos + brazos cerrados) expresada porcentualmente. Fasudil no produjo efectos en los animales C/FAS. El grupo S/SAL mostró una disminución significativa en %TAT para las entradas, al compararlo con C/SAL (C/SAL(n=5) v/s S/SAL(n=6):  $p < 0,01$ ). No hubo diferencia entre los grupos S/SAL y S/FAS. **B.** %TAT para el tiempo es una razón entre el tiempo que las ratas permanecieron en los brazos abiertos y el tiempo total, expresada como un porcentaje. Fasudil no ejerció efectos en las ratas C/FAS. El grupo S/SAL mostró una reducción en %TAT para el tiempo (C/SAL v/s S/SAL:  $p < 0,01$ ). Este efecto no fue prevenido por fasudil. **C.** Las entradas totales fueron definidas como las entradas totales en ambos brazos (abiertos y cerrados), expresadas como valor absoluto. Los animales C/FAS no presentaron diferencias con los animales C/SAL. El grupo S/SAL mostró una reducción significativa en las entradas totales en comparación al grupo C/SAL (C/SAL v/s S/SAL:  $p < 0,05$ ), efecto no prevenido por fasudil.

### 5.3 Análisis de inmuno western blot.

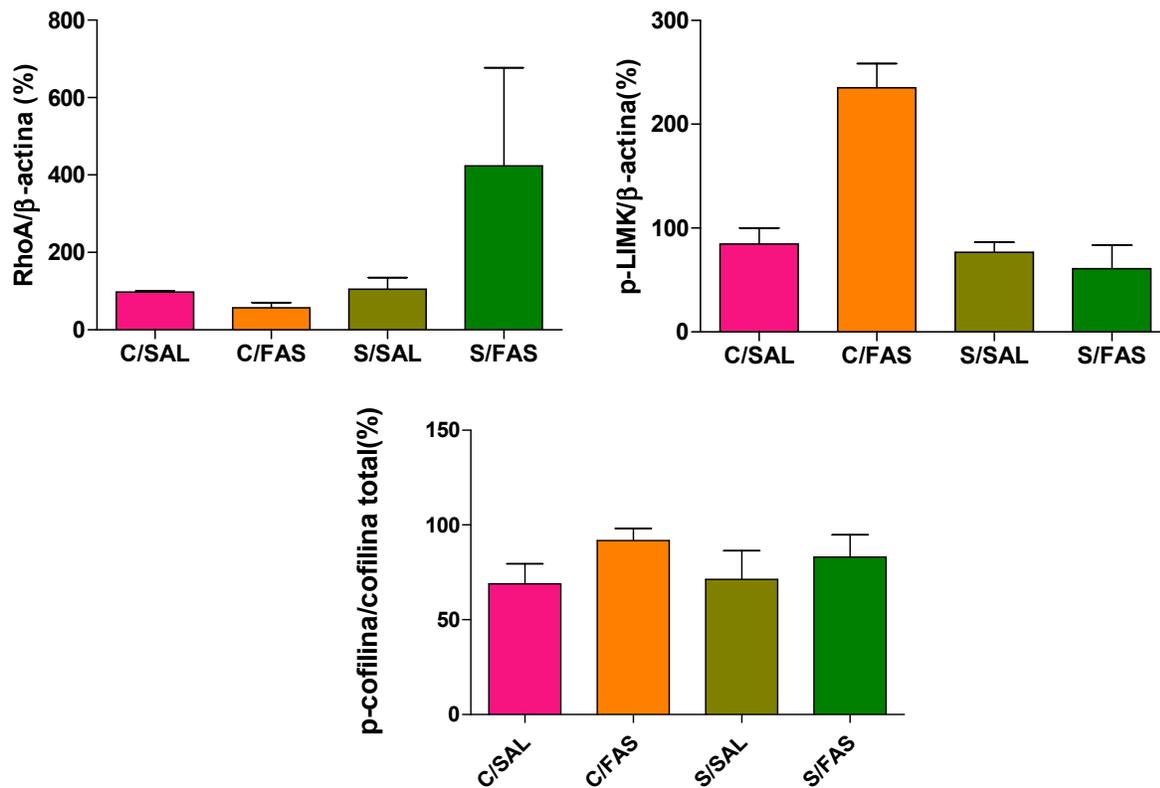
Con la finalidad de relacionar los cambios conductuales promovidos por el estrés y su prevención por el tratamiento crónico con fasudil, se realizaron mediciones de los niveles de proteínas relacionadas a la vía Rho/ROCK/LIMK/cofilina en extractos de hipocampo de animales en los diferentes tratamientos. En la **figura 11.A** se muestra un inmuno western representativo de las proteínas de interés y el análisis densitométrico de los inmuno western blots de los cuatro grupos experimentales de ratas. La **figura 11.B** muestra que ni la administración de fasudil ni el estrés logran producir cambios en los niveles de RhoA. Sin embargo, la administración de fasudil a ratas sometidas a estrés (comparar grupo S/SAL v/s grupo S/FAS) produce una tendencia notoria hacia el incremento en los niveles de RhoA, aunque no es estadísticamente significativa. Con la finalidad de determinar cambios en la actividad de Rho y por tanto en ROCK se evaluó cambios en el estado de fosforilación de un efector río abajo como LIMK. En la **figura 11 A**, se observa que hay dos bandas inmunoreactivas para p-LIMK y que de acuerdo al peso molecular esperado corresponden a las isoformas 1 y 2 respectivamente (72 kDa y 65 kDa). Debido a que la p-LIMK2 se detecta en forma confiable, se determinó si ésta varío su nivel de fosforilación por los tratamientos. Como se muestra en la **figura 11.B**, el estrés no produjo cambios significativos en los niveles de p-LIMK2. Sin embargo, puede observarse que el tratamiento con fasudil en animales controles produjo una tendencia al incremento de p-LIMK2, y este efecto no se observó en ratas estresadas. Se ha descrito que la única quinasa que fosforila a la cofilina es la LIMK, por tanto se determinaron cambios en la cuantía de su fosforilación por los diferentes tratamientos.

En la **figura 11.B** se muestra que el estrés ni fasudil provocaron alteraciones significativas en los niveles de cofilina fosforilada, sin embargo, puede verse una tendencia al incremento de los niveles de dicha proteína en las ratas C/FAS, lo que se relacionaría con el aumento en p-LIMK.

A.



B.



**Figura 11. Fasudil muestra una tendencia a incrementar los niveles de RhoA en ratas sometidas a estrés y de p-LIMK en ratas control, sin afectar a los otros grupos experimentales.** **A.** Muestra de inmunoblots representativos de homogeneizados de hipocampo de ratas C/SAL, C/FAS, S/SAL and S/FAS usando anticuerpos anti-RhoA, p-LIMK, p-cofilina, cofilina total y β-actina. **B.** Abundancia relativa de RhoA, p-LIMK y p-cofilina expresada como razón entre el promedio ± E.M. de los píxeles de cada proteína y β-actina y cofilina total, según corresponda. Estos píxeles fueron obtenidos por análisis densitométrico de inmuno western blots de homogeneizados de hipocampo de las ratas mencionadas. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía. Ni el estrés, ni fasudil produce alteraciones significativas en los niveles de RhoA. Sin embargo, fasudil produce una tendencia al alza en los niveles de RhoA en los animales sometidos a estrés, pero no afecta a los animales controles (C/SAL y S/FAS, n=3; C/FAS y S/SAL, n=4). Ni el estrés, ni fasudil produjeron efectos significativos en los niveles de p-LIMK (C/SAL y C/FAS, n=3; S/SAL y S/FAS, n=2) y p-cofilina (n=4 todos los grupos experimentales). No obstante, se observa que los animales C/FAS mostraron una notoria tendencia al incremento de p-LIMK y una de menor magnitud en p-cofilina.

## 6. Discusión

El principal resultado de esta memoria es el hallazgo de que el tratamiento crónico con fasudil a animales estresados previene las alteraciones conductuales producidas por el estrés. Sin embargo, este efecto no tendría relación con cambios en los niveles de LIMK y cofilina, que son efectores de ROCK.

### 6.1. Validez del modelo de estrés por restricción de movimiento como modelo de depresión animal.

Los requerimientos mínimos para que un modelo animal de depresión sea válido fueron propuestos hace más de 30 años: el modelo debería ser razonablemente análogo a la patología humana en su sintomatología, lo que se conoce como validez aparente. Por otra parte, debe provocar alteraciones conductuales que puedan ser monitoreadas objetivamente. Además, debe producir cambios conductuales que sean revertidos por los tratamientos que muestran ser efectivos en humanos, lo que se denomina validez predictiva y, finalmente, debería ser reproducibles entre investigadores. (Deussing 2006)

En esta memoria, usamos un modelo que logra reproducir síntomas de la patología como por ejemplo: anhedonia, déficits afectivos (lo que se evalúa en el test de natación forzada y se reconoce como desesperanza aprendida) y cognitivos que involucran alteraciones del aprendizaje asociativo y de la memoria (evaluado en prueba de condicionamiento por evitación activa). Estos síntomas son los mismos que se presentan en sujetos con depresión, de modo que contribuyen a la validez aparente de nuestro modelo. Además de estos requisitos necesarios para la validez de este modelo de depresión hay que considerar que debemos tener la certeza de que efectivamente hemos producido el estrés que induce dicha depresión en las ratas. Para ello, los indicadores fisiológicos fueron de gran ayuda, siendo el más importante de éstos, la ganancia de peso corporal. Puesto que se ha observado que el estrés crónico produce reducción en la ganancia de peso corporal. (Gregus y cols. 2005). El mecanismo mediante el cual las ratas sometidas a estrés crónico disminuyen su ganancia de peso, no está del todo dilucidado. No obstante, es posible hacer algunas propuestas al respecto. Una explicación podría estar dada por la menor ingesta de alimento. De hecho, hay evidencia que muestra que un estresor crónico moderado, como el ruido, produce disminución en la ingesta y el peso corporal (Alario y cols. 1987) . Por otra parte, en estudios de estrés agudo de restricción de movimiento (3 horas por un día)

también se ha reportado una reducción en la ingesta de alimento (Heinrichs y cols. 1992). El estrés, no sólo desencadena la inhibición de la ingesta ( mediante la regulación de NPY a través de CRH) (Heinrichs y cols. 1992), sino que también genera a nivel metabólico, un incremento en la lipólisis y proteólisis para favorecer la movilización de energía, como así también, a largo plazo, resistencia a la insulina, entre otras (Hayley y cols. 2005). Por lo tanto, no se descartan las alteraciones metabólicas como un factor que también puede participar en la disminución en la ganancia de peso de ratas sometidas a estrés crónico.

Respecto de la masa de las glándulas adrenales, no se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales. Esto no concuerda con lo que teóricamente se podría haber esperado. Puesto que el estrés crónico se traduce en un incremento en la síntesis y secreción de corticosterona por parte de las glándulas adrenales, situación que produciría una hipertrofia de estas glándulas, lo que estaría asociado con un incremento en su masa. Por lo tanto, este resultado, podría estar dando cuenta de que la restricción aplicada a las ratas, produjo un estrés moderado, a diferencia de otros modelos de estrés, como el estrés crónico variable, en los que luego de 21 días de estrés, se observa una alteración en la masa de dichas glándulas y en su contenido de catecolaminas (Magarinos y McEwen 1995). Adicionalmente, es necesario considerar que se trata de un parámetro medido al final de los 14 días de estrés, en consecuencia, no es posible saber qué es lo que sucedió durante dicho intervalo de tiempo. De modo que el no observar diferencias en este indicador, no descarta la posibilidad de que haya ocurrido una hipertrofia adrenal durante dicho período de tiempo producto de una activación simpática. Lo único que nos informa es que aproximadamente 3 días después de los 14 días de tratamiento (tiempo en que las ratas pasaron por los test conductuales), no se observa tal condición por mecanismos adaptativos que estarían operando (Bravo y cols. 2009). Un mecanismo adaptativo que puede estar participando, es una menor reactividad del HHA frente al estresor. De hecho, se ha descrito en ratas Sprague-Dawley, que frente a la exposición crónica a un estresor, se observa una disminución gradual en los niveles de corticosterona sérica en respuesta a los días de exposición a estrés por restricción de movimiento (Ulloa y cols. 2010). Dado que los GR tienen un rol clave en la retroalimentación negativa del eje HHA, la mayor expresión de estos receptores puede sustentar una mayor supresión de la actividad del eje.

Respecto del número de heces, no fue posible observar tendencias notorias que pudiesen marcar alguna diferencia entre las ratas S/SAL y las S/FAS. El número de heces total es un indicador que refleja lo que ocurre en forma global en todo el período de restricción. Este indicador mostró que fasudil provoca una ligera disminución en este parámetro. Por otra parte, el número de heces diario, nos permite observar cómo va cambiando este parámetro en función del tiempo que lleva el animal expuesto a la restricción. En consecuencia, nos permite ver la respuesta frente a un estrés de carácter agudo (mediciones de los primeros días del procedimiento) y de un carácter más bien crónico (mediciones de los últimos días). El gráfico de la **figura 6.B**, muestra tanto disminuciones como incrementos en el número de heces a través del tiempo. Sin embargo, en los últimos días se observa que estos valores son de una magnitud considerablemente menor a los observados en los primeros días. Esta tendencia puede dar cuenta de la adaptación al estrés crónico que experimentan las ratas.

Por otra parte, las alteraciones conductuales producidas en este modelo, se pueden observar en forma objetiva en distintas pruebas como: el test de natación forzada, el test de condicionamiento por evitación activa y el test laberinto elevado en cruz, entre otros. En dichos tests se puede evaluar el comportamiento de las ratas, el que da cuenta de la sintomatología depresiva y se mide con indicadores como por ejemplo: el tiempo de inmovilidad en el primer test, el porcentaje de fallas en el escape en el segundo. Así mismo, el estrés produce ansiedad en las ratas, que es un rasgo que en muchos casos acompaña al cuadro depresivo. En cuanto a la validez predictiva, hay datos de nuestro laboratorio en los que se ha probado que tanto antidepresivos tricíclicos, como I.S.R.S., son capaces de prevenir las alteraciones conductuales producidas por nuestro modelo.(Bravo y cols. 2009; Ulloa y cols. 2010).

## 6.2. Análisis de la evaluación de la prevención de síntomas.

Una interrogante interesante es ¿por qué evaluamos prevención y no reversión de síntomas “tipo-depresivo”? Ésta es una pregunta muy interesante, considerando que en la clínica la administración del antidepresivo se realiza después de haber diagnosticado la depresión con el objetivo de revertir los síntomas de dicha patología. La respuesta a esta pregunta es que en nuestro modelo no hemos determinado si los cambios inducidos por el estrés crónico permanecen en el tiempo luego de suspender el agente estresor. Habría que

considerar que las ratas que recibieron el tratamiento de estrés, pueden llevar a cabo mecanismos adaptativos con el objetivo de mitigar los efectos producidos por dicho tratamiento (Magarinos y cols. 1999; Bergstrom y cols. 2008). En consecuencia, si se realizara un estudio efectuando primero el tratamiento de estrés y luego la administración del fármaco, no podría precisarse si las ratas S/FAS revirtieron los síntomas por la administración del fármaco.

### 6.3. Interpretación de resultados de pruebas conductuales.

Respecto de los resultados conductuales podemos concluir que cada uno de ellos constituye un aporte en la evaluación de la sintomatología depresiva reproducida por nuestro modelo (véase **punto 6.1**), como así también en evaluar las propiedades antidepresivas de fasudil.

#### 6.3.1 El test de natación forzada

La prueba de natación forzada es muy utilizada por su validez predictiva, puesto que detecta antidepresivos confiables, es decir, cuyo uso ya se ha establecido en el área clínica. Sin embargo, se ha observado que los efectos de los antidepresivos evaluados en este test, son evidentes luego de un tratamiento agudo (por lo general 3 inyecciones en 24 horas). Esto no concuerda con lo que sucede en la clínica, en que se requieren varias semanas para observar los efectos antidepresivos. Se han realizado estudios en los cuales la administración de mirtazapina (antagonista directo de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos y de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> serotoninérgicos) por tres días, indujo un incremento significativo en el escalamiento; en cambio si se administraba por 14 días era posible ver su efecto de incremento en el tiempo en natación (Reneric J.P. 2002a). En el caso de reboxetina (inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina), sus acciones antidepresivas se manifestaron tanto al aumentar la dosis luego de un tratamiento agudo o al prolongar el tiempo de tratamiento con la dosis original (Cryan 2005). De modo que, al realizar este test con fármacos cuya administración fue realizada en forma aguda, no es posible conocer todo el espectro de propiedades farmacológicas que participan en su acción antidepresiva y por tanto, se hace necesaria la administración crónica. En otras palabras, el hecho de que la administración aguda de antidepresivos, muestre un efecto en el test de natación forzada, no quiere decir que este test pierda validez predictiva, si no que sólo da cuenta de

que en dichas condiciones se observa parte de su acción antidepresiva, la que podrá conocerse completamente al administrarlo en forma crónica; y en consecuencia, su acción observada en el test será más extrapolable a la clínica.

Por otra parte, este test evidencia, en nuestro caso, desesperanza aprendida inducida por el estrés. Para que esta prueba sea válida, se debe considerar la profundidad del estanque y temperatura del agua que estos factores constituyen variables adicionales a las que realmente se desea evaluar, a saber, la desesperanza aprendida por exposición a un estrés agudo e inescapable. En caso de que la profundidad sea cercana a la talla de la rata (considerando la cola), ésta tiene la posibilidad de apoyarse en la base del cilindro y por tanto, no manifiesta una respuesta. Por otra parte, si el agua es fría, las ratas desarrollarán inmovilidad más rápidamente que en agua tibia. En el caso de nuestro estudio, estas variables fueron bien controladas, de modo que no afectan los resultados ya informados.

Por otra parte, varios laboratorios en el mundo, han confirmado los distintos patrones producidos por diferentes tipos de antidepresivos de referencia en esta prueba, de modo que presenta una adecuada reproducibilidad (Cryan 2005). Por lo tanto, los resultados obtenidos son fiables. Otro punto importante, es que en esta prueba se ha visto que antidepresivos que actúan a través de vías serotoninérgicas inducen un incremento en el tiempo de natación, a diferencia de los antidepresivos que actúan a través de las vías noradrenérgicas, cuyo efecto es producir un alza en el escalamiento. En consecuencia, el hecho de que fasudil disminuya el tiempo de inmovilidad en ratas “estresadas”, prolongando el tiempo de escalamiento y sin modificar el tiempo de natación, da cuenta de que este fármaco evidencia ante este test el mismo efecto que producen antidepresivos utilizados en la clínica como la reboxetina (Cryan 2005). De modo que fasudil tiene potenciales propiedades antidepresivas probablemente modificando el tono noradrenérgico. Sin embargo, a diferencia de la administración crónica de un antidepresivo tricíclico como desipramina, que produce un aumento en el escalamiento en ratas no estresadas (Bravo y cols. 2009), no fuimos capaces de observar un efecto similar en ratas no estresadas. Esto sugiere que fasudil promueve un aumento en la movilidad sólo en ratas sometidas a restricción.

### 6.3.2. El test de condicionamiento por evitación activa.

En la prueba de condicionamiento por evitación activa el animal se enfrenta a un conflicto, porque debe volver a ingresar a la cámara donde recién se le aplicó un choque eléctrico. Este test posee validez para predecir la eficacia de los antidepresivos y hay pocos reportes de falsos positivos. Los animales que muestran desesperanza en esta prueba también presentan varios rasgos que tienen similitud con la depresión, incluyendo actividad motora disminuida, alteraciones en el sueño, motivación disminuida e incremento en glucocorticoides (Duman 2010). Dichas características dan cuenta de la validez aparente de esta prueba. Dentro de las limitaciones de este modelo, señalamos su baja reproducibilidad entre diferentes laboratorios, debido principalmente al manejo de las ratas y al criterio del experimentador; sin embargo, dentro de un mismo laboratorio es reproducible. En esta prueba, fasudil demostró prevenir tanto la disminución en %ARC y el incremento en %FE promovidas por el estrés. Esto significa que fasudil ejerce efecto en ratas sometidas a estrés, mejorando su desempeño en este test, el que evalúa la adquisición de memoria a corto plazo (o memoria de procedimiento) y el aprendizaje asociativo.

### 6.3.3. El test del laberinto elevado en cruz.

Con el uso de este test se observó que el estrés genera sintomatología ansiosa. Es destacable que el rasgo ansioso muchas veces se presenta en comorbilidad con la depresión (Nestler, y cols. 2006). No obstante, en nuestro modelo, la administración de fasudil en ratas sometidas a estrés, no produjo acciones ansiolíticas estadísticamente significativas, aunque hubo una tendencia a la prevención. Por tanto, será importante determinar a futuro con un tamaño muestral mayor y con otros test para determinar si este fármaco tiene acciones ansiolíticas.

Por otra parte, la cuantificación del número de entradas totales (**figura 10.C.**), indica que el estrés produjo una disminución significativa en la actividad motora de las ratas, la que no fue prevenida por fasudil en forma significativa. Hay evidencia que indica que la administración aguda i.c.v. (intracerebroventricular) de Y27632, otro inhibidor de ROCK, en

ratas produce un incremento en la conducta ansiosa, observado como un aumento en el tiempo y duración en los brazos cerrados en el test de laberinto en cruz elevado (Saitoh y cols. 2006). En base a esto, se deduce que el tiempo de restricción es un factor clave, pues puede marcar grandes diferencias en los efectos del inhibidor de ROCK en la conducta ansiosa promovida por estrés. Quizás, en nuestro estudio, fasudil podría haber potenciado la conducta ansiosa producida por el estrés durante los primeros días (estrés agudo).

#### 6.3.4. Potenciales propiedades antidepresivas de fasudil.

En base a la discusión recién efectuada de las dos primeras pruebas (test de natación forzada y condicionamiento por evitación activa), proponemos que fasudil posee potenciales propiedades antidepresivas. Estas propiedades deberán confirmarse con un estudio clínico, en el que se podrá ver la eficacia de fasudil y, en caso que sea efectivo, se podrán determinar las dosis para conseguir dicho efecto.

#### 6.4 Interpretación de los análisis de inmuno western blot

La RhoA es un mediador río arriba de ROCK (y de sus efectores: LIMK/cofilina y MLC,MLCP) (**figura 3**). Estudios realizados en cultivos primarios de hipocampo han permitido observar que la proteína RhoA es más abundante en dendritas que en axones (Da Silva y cols. 2003; O'Kane y cols. 2003). En tejido, es particularmente abundante en áreas como CA1, CA3 y GD del hipocampo (Nakayama y cols. 2000).

La RhoA cicla entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP. Su actividad es regulada por factores intercambiadores de guanina (GEFs), los que promueven la carga con GTP, y también por proteínas que activan su actividad GTPasa (GAPs), las cuales estimulan la hidrólisis del GTP. La activación de RhoA provoca retracción de neuritas en células como PC12 o neuroblastoma, y por el contrario, su inhibición provoca la inhibición de la retracción neurítica (Jalink y cols. 1994; Katoh H. 1998). Entre los factores extracelulares que modulan la actividad de RhoA, han sido mencionados factores de crecimiento como p75 o NGF (Yamaguchi y cols. 2001; Nusser y cols. 2002; Gehler y cols. 2004). Se ha descrito que la inducción de crecimiento gatillada por NGF a través de su receptor TrkA regula la actividad de PI3K, la que a través de Rac1 mediaría la inactivación

de RhoA, traducíéndose esto en una señal permisiva para el inicio del crecimiento de neuritas (Nusser y cols. 2002).

En este trabajo se observó que los niveles de RhoA no se modificaron por los tratamientos. Sin embargo, hay una tendencia al incremento en los niveles de RhoA en ratas S/FAS. Esto no concuerda con lo esperado para la condición S/SAL, debido a que otro estudio realizado en nuestro laboratorio mostró que el estrés aumenta los niveles de RhoA total (Ulloa y cols. 2010). Sin embargo, nosotros cuantificamos la masa total de esta proteína, sin saber que fracción de ésta se encuentra en estado activo e inactivo. Por otra parte, esta pequeña GTPasa presenta un amplio abanico de efectores, mucho mayor al que se ha descrito en esta memoria, participando así, en diversos fenómenos como el desensamblaje de microtúbulos (Chen y Firestein 2007), simplificación de la ramificación dendrítica (Nakayama y cols. 2000), como así también, formación de fibras de estrés durante los procesos de migración de distintos linajes celulares como fibroblastos (Albert 2008) y células endoteliales de vasos sanguíneos (Lamalice y cols. 2007), sin mencionar la formación de apéndices como las microvellosidades (Bretscher y cols. 2000), entre otros. De modo que esta pequeña GTPasa es regulada para que se realicen en forma adecuada muchas funciones en neuronas, pero también en otras células, como las células endoteliales de los vasos sanguíneos, las que están presentes en el extracto de hipocampo y que también aportan al resultado final de los niveles de RhoA total. Dado que fasudil es un inhibidor de la ROCK es muy probable que efectores río bajo de esta quinasa sean los responsables de los efectos antidepresivos observados. Entre estos efectores está la LIMK, que a su vez, regula la polimerización de actina a través de la fosforilación e inactivación de cofilina (Kranenburg y cols. 1999; Maekawa 1999; Govek y cols. 2005).

La LIMK-1 (72 kDa) es la isoforma que se encuentra mayoritariamente en cerebro, a diferencia de LIMK-2 (65 kDa) que está en menor proporción. La LIMK cuantificada en esta memoria, que es aquella de mayor intensidad y se encuentra “más abajo” en el film es la LIMK-2, debido a que es la de menor peso molecular. Hay evidencia de que LIMK-1 es una proteína que está principalmente en espinas dendríticas de neuronas hipocampales, a diferencia de LIMK-2, la que es ubicua (Sarmiere y Bamberg 2002). De modo que en los extractos de hipocampo, se podría inferir que la LIMK 1 está en menor proporción que la LIMK2, o bien que el anticuerpo presente una mayor afinidad por la última isoforma. La presencia de la LIMK2 puede corresponder a la contribución de otros linajes celulares como

células endoteliales de la musculatura lisa vascular que irriga el hipocampo, la que puede estar contribuyendo a incrementar los niveles de LIMK2.

La vía ROCK/LIMK/cofilina, produce dos efectos a nivel dendrítico, uno participando en el cono de crecimiento y otro participando en la formación de las espinas dendríticas. En contraposición, la vía ROCK/MCL; MLCP, participa en la retracción de las espinas. Considerando los antecedentes que señalan que ratas estresadas muestran una simplificación de la arborización dendrítica en el área CA3 hipocampal (Magarinos y cols. 1999) y disminución en la densidad de espinas dendríticas de neuronas basales del área CA1 (Ulloa y cols. 2010), es posible proponer que dichas ratas presentan una sobre-activación de la segunda vía en relación a la primera. De modo que si fuese éste el caso, las alteraciones en los niveles de las proteínas que participan en la vía de menor actividad no serían tan notorias, pues su magnitud sería pequeña y por lo tanto, la técnica de inmuno western blot no sería capaz de detectarlas. Esto podría explicar por qué las ratas S/SAL y S/FAS no muestran alteraciones respecto de las ratas C/SAL en el grado de fosforilación de p-LIMK y p-cofilina. A diferencia de los grupos S/SAL y S/FAS, las ratas C/FAS, muestran cambios de magnitud considerable en los niveles de fosforilación de dichas proteínas en relación a las ratas C/SAL. Esto respondería a que estas ratas, por el hecho de ser controles, no mostrarían la dominancia de una vía por sobre la otra, pues están en condiciones más cercanas a las fisiológicas.

Si fasudil inhibe a ROCK, se debería haber esperado observar en animales C/FAS una reducción en los niveles de p-LIMK acompañados por una disminución en los niveles de p-cofilina. A diferencia de esto, se observó que los animales *naive* tratados con fasudil mostraron un incremento en los niveles de p-LIMK, asociado a un ligero incremento en p-cofilina, probablemente como consecuencia de un predominio de vías de señalización asociadas a otras Rho-GTPasas. En este sentido, es probable que al inhibir a ROCK exista un mayor predominio de la Rac-GTPasa que al activar a PAK promueva una mayor fosforilación de LIMK y cofilina. Es destacable que el incremento en el grado de fosforilación de p-LIMK es de mayor magnitud que el de p-cofilina. Se ha descrito que las espinas son estructuras altamente dinámicas, pudiendo sufrir cambios en su forma en un período muy breve. Por tanto es difícil poder precisar a través de estudios de western si existen cambios localizados a nivel de las espinas. De acuerdo a esto, se debería determinar a futuro cambios locales mediante estudios de inmunohistoquímica.

La LIMK defosforilada se encuentra unida a los microtúbulos estabilizándolos, lo que sugiere que actúa como un puente entre ambos citoesqueletos. A su vez, está presente a nivel del cuello de la espina (Schratt y cols. 2006). En cambio, actina está mayoritariamente en la cabeza de la espina. En consecuencia, cuando LIMK es fosforilada por ROCK, tendría que ser transportada hasta la cabeza de la espina para poder fosforilar a cofilina. Por lo tanto, existe una compartimentalización de esta quinasa, la cual debe transitar a otro compartimento para actuar sobre su sustrato, lo cual podría explicar por qué se observa un mayor grado de fosforilación de p-LIMK que de p-cofilina. Estos resultados indican que fasudil promueve *in vivo* un aumento en la fosforilación de LIMK en ratas controles, lo que probablemente sea en respuesta a la inhibición de ROCK, y que al ser un tratamiento crónico, ocurren cambios adaptativos para compensar dicha inhibición.

En ratas sometidas a estrés, no se observaron cambios en el grado de fosforilación de dichas proteínas, ni tampoco en las ratas S/FAS. En cuanto a los mecanismos que podrían conducir a estos resultados, se señala que esta vía mostraría una baja actividad, por tratarse de ratas estrés. Además, por este mismo motivo, la vía Rac/PAK/LIMK/cofilina, debería presentar una baja actividad, pues dicha vía está a favor de la elongación de espinas, suceso morfológico opuesto al observado en ratas S/SAL. Por esta razón, se había escogido inicialmente detectar cambios en los niveles de fosforilación de MLC, que justamente participa produciendo contracción de los filamentos de actina. Desgraciadamente el anticuerpo utilizado no fue capaz de presentar inmunoreactividad contra dicha proteína.

## 7. Conclusiones

El tratamiento crónico con fasudil en ratas controles:

- ◆ No modifica las conductas activas en el test de la natación forzada ni el aprendizaje asociativo.
- ◆ No ejerce acciones ansiolíticas ni ansiogénicas.
- ◆ No modifica los niveles de RhoA, p-LIMK y p-cofilina.

El tratamiento crónico con fasudil en ratas sometidas a estrés:

- ◆ Previene la condición de desesperanza aprendida, evaluada como la reducción en el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada.
- ◆ Promueve un aumento en el tiempo de escalamiento en el test de natación forzada, es decir, muestra efectos comparables a los de antidepresivos de uso clínico del tipo ISRN.
- ◆ Previene los déficits en la memoria de procedimiento y el aprendizaje asociativo, síntomas característicos de sujetos con depresión.
- ◆ A diferencia de su administración aguda reportada por otros autores, el tratamiento crónico no indujo ansiedad.
- ◆ No altera los niveles de RhoA, p-LIMK y p-cofilina.

Por lo tanto, fasudil posee potenciales propiedades antidepresivas. Estas propiedades no estarían relacionadas con la actividad de la vía ROCK/LIMK/cofilina, aunque no se descarta la posibilidad de que otros efectores de ROCK participen en este efecto.

## 8. Proyecciones

Para corroborar las propiedades antidepresivas de fasudil, es necesario realizar estudios clínicos. También será relevante determinar variaciones en los niveles de las proteínas de interés mediante inmunohistoquímica, la que permitirá evaluar cambios regionales, tanto a nivel del hipocampo, como a nivel de las espinas dendríticas.

Queda pendiente la evaluación de las modificaciones en el número y tipo de espinas dendríticas producidas por el estrés y fasudil en neuronas hipocampales del área CA1. Esto nos permitirá ver si existe correlación entre los efectos preventivos que ejerce fasudil sobre síntomas “*depressive-like*” y en la densidad de espinas dendríticas, en conjunto con la evaluación de las acciones mediadas por RhoA/ROCK y sus efectores en las espinas dendríticas.

## 9. Bibliografía

Alario, P., Gamallo, A., Beato, M. J. y Tranco G. (1987). "Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats." Physiology and Behavior **40**(1): 29-32.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Molecular Biology of the cell. 5ª Ed. New York, USA. 2008. 992-1000.

Bergstrom, A., Jayatissa, M. N., Mork, A. y Wiborg, O. (2008). "Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression; an in situ hybridization study." Brain Research **1196**: 41-52.

Bravo, J. A., Diaz-Veliz, G., Mora, S., Ulloa, J. L., Berthoud, V. M., Morales, P., Arancibia, S. y Fiedler, J. L. (2009). "Desipramine prevents stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal markers of neuroprotection." Behavioural Pharmacology **20**(3): 273-285.

Bretscher, A., Chambers, D., Nguyen, R. y Reczek, D. (2000). "ERM-merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function." Annual Review of Cell and Developmental Biology **16**: 113-+.

Brown, E. S., Rush, A. J. y McEwen, B. S. (1999). "Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders." Neuropsychopharmacology **21**(4): 474-484.

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A. y Poulton, R. (2003). "Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene." Science **301**(5631): 386-389.

Cryan, J., Valentino R., Lucki I. (2005). "Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test." Neuroscience and Behavioral Reviews(29): 547-569.

Czeh, B. y Lucassen, P. J. (2007). "What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated?" European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience **257**(5): 250-260.

Chen, H. y Firestein, B. L. (2007). "RhoA regulates dendrite branching in hippocampal neurons by decreasing cypin protein levels." The Journal of Neuroscience **27**(31): 8378-8386.

Da Silva, J. S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W. y Dotti, C. G. (2003). "RhoA/ROCK regulation of neuriteogenesis via profilin Ila-mediated control of actin stability." The Journal of Cell Biology **162**(7): 1267-1279.

Deuschle, M., B. Hamann, Meichel, C., Krumm, B., Lederbogen, F., Kniest, A., Colla, M. y Heuser, I. (2003). "Antidepressive treatment with amitriptyline and paroxetine: effects on saliva cortisol concentrations." Journal of Clinical Psychopharmacology **23**(2): 201-205.

Deussing (2006). "Animal models of depression." Drug Discovery(3): 375-383.

Dhabhar, F. S., McEwen, B. S. y Spencer, R. L. (1997). "Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress." Neuroendocrinology **65**(5): 360-368.

Drug Information Online," Fasudil " [ en línea ] <<http://www.drugs.com/international/eril.htm>.> [ 10/11/2011]

Duman, C. H. (2010). "Models of depression." Vitamins and Hormones **82**: 1-21.

Ethell, I. M. y Pasquale, E. B. (2005). "Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling." Progress in Neurobiology **75**(3): 161-205.

Fiedler, J. L., Bravo, J. y Ulloa, L. (2007). What are the possible consequences of chronic stress in central nervous system? The neurobiology of stress: An evolutionary approach. A. Francisco and D.-S. Alexies. Kerala, Research Signpost.

Gehler, S., Gallo, G., Veien, E. y Letourneau, P. C. (2004). "p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity." The Journal of Neuroscience **24**(18): 4363-4372.

Govek, E. E., Newey, S. E. y Van Aelst, L. (2005). "The role of the Rho GTPases in neuronal development." Genes and Development **19**(1): 1-49.

Gregus, A., Wintink, A. J., Davis, A. C. y Kalynchuk, L. E. (2005). "Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats." Behavioural Brain Research **156**(1): 105-114.

Hayley, S., Poulter, M. O., Merali, Z. y Anisman, H. (2005). "The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity." Neuroscience **135**(3): 659-678.

Heinrichs, S. C., Cole, B. J., Pich, E. M., Menzaghi, F., Koob, G. F. y Hauger, R. L. (1992). "Endogenous corticotropin-releasing factor modulates feeding induced by neuropeptide Y or a tail-pinch stressor." Peptides **13**(5): 879-884.

Jalink, K., Hordijk, P. L. y Moolenaar, W. H. (1994). "Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator." Biochimica et Biophysica Acta **1198**(2-3): 185-196.

Kato H., A., J., Yamaguchi, Y., Kitano, Y., Ichikawa, A., and Negishi, M. (1998). "Constitutively active Gα12, Gα13, and Gαq induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways." The Journal of Biological Chemistry. (273): 28700–28707.

Kranenburg, O., Poland, M., van Horck, F. P., Drechsel, D., Hall, A. y Moolenaar, W. H. (1999). "Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction." Molecular Biology of the Cell **10**(6): 1851-1857.

Lamallice, L., Le Boeuf, F. y Huot, J. (2007). "Endothelial cell migration during angiogenesis." Circulation Research **100**(6): 782-794.

Lesch, K. P. y Gutknecht, L. (2005). "Pharmacogenetics of the serotonin transporter." Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry **29**(6): 1062-1073.

Li, Q., Huang, X. J. , He, W. , Ding, J., Jia, J. T., Fu, G., Wang, H. X. y Guo, L. J. (2009). "Neuroprotective potential of fasudil mesylate in brain ischemia-reperfusion injury of rats." Cellular and Molecular Neurobiology **29**(2): 169-180.

Linthorst, A. C., Flachskamm, C., Barden, N., Holsboer, F. y Reul, J. M (2000). "Glucocorticoid receptor impairment alters CNS responses to a psychological stressor: an in vivo microdialysis study in transgenic mice." European Journal of Neuroscience **12**(1): 283-291.

Lucki, I. (1997). "The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs." Behavioural Pharmacology **8**(6-7): 523-532.

Maekawa (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase" Science **285**(5429): 895-898.

Magarinos, A. M., Deslandes, A. y McEwen, B. S. (1999). "Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress." European Journal of Pharmacology **371**(2-3): 113-122.

Magarinos, A. M. y McEwen, B. S. (1995). "Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors." Neuroscience **69**(1): 89-98.

Manji, H. K. y Duman, R. S. (2001). "Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics." Psychopharmacology Bulletin **35**(2): 5-49.

McEwen, B. S. (2005). "Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain." Metabolism(54): 20-23.

Mora, S., Urresta, F., Dussaubat, N., Benavente, F., Baeza, R. y Diaz-Veliz, G. (1993). "Behavioral effects of a LHRH antagonist in intact and ovariectomized rats." Pharmacology Biochemistry and Behavior **46**(3): 673-677.

Nakade, Y., Fukuda, H., Iwa, M., Tsukamoto, K., Yanagi, H., Yamamura, T., Mantyh, C., Pappas, T. N. y Takahashi, T. (2007). "Restraint stress stimulates colonic motility via central corticotropin-releasing factor and peripheral 5-HT3 receptors in conscious rats." American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology **292**(4): G1037-1044.

- Nakayama, A. Y., Harms, M. B. y Luo, L. (2000). "Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons." Journal of Neuroscience **20**(14): 5329-5338.
- Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J. y Monteggia, L. M. (2002). "Neurobiology of depression." Neuron **34**(1): 13-25.
- Nestler, E. J., Tsankova, N. M., Bertone, O., Renthal, W., Kumar, A., y Neve, R. L. (2006). "Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action." Nature Neuroscience **9**(4): 519-525.
- Nusser, N., Gosmanova, E., Zheng, Y. y Tigy, G. (2002). "Nerve growth factor signals through TrkA, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac1 to inactivate RhoA during the initiation of neuronal differentiation of PC12 cells." The Journal of Biological Chemistry **277**(39): 35840-35846.
- O'Kane, E. M., Stone, T. W. y Morris, B. J. (2003). "Activation of Rho GTPases by synaptic transmission in the hippocampus." Journal of Neurochemistry **87**(5): 1309-1312.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. y Briley, M. (1985). "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat." Journal of Neuroscience Methods **14**(3): 149-167.
- Pittenger, C. y Duman, R. S. (2008). "Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms." Neuropsychopharmacology **33**(1): 88-109.
- Reneric J.P., B., M., Stinus, L (2002a). "In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs." Behavioral Brain Research(136): 521-532.
- Saitoh, A., Yamada, M., Kobayashi, S., Hirose, N., Honda, K. y Kamei, J. (2006). "ROCK inhibition produces anxiety-related behaviors in mice." Psychopharmacology (Berl) **188**(1): 1-11.
- Sarmiere, P. D. y Bamburg, J. R. (2002). "Head, neck, and spines: A role for LIMK-1 in the hippocampus." Neuron **35**(1): 3-5.
- Satoh, S., Utsunomiya, T., Tsurui, K., Kobayashi, T., Ikegaki, I., Sasaki, Y. y Asano, T. (2001). "Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage." Life Sciences **69**(12): 1441-1453.
- Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M. y Greenberg, M.E.(2006). "A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development." Nature **439**(7074): 283-289.
- Shibuya, M., Hirai, S., Seto, M., Satoh, S. y Ohtomo, E. (2005). "Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial." The Journal of Neurological Sciences **238**(1-2): 31-39.

Ulloa, J. L., Castaneda, P., Berrios, C., Diaz-Veliz, G., Mora, S., Bravo, J. A., Araneda, K., Menares, C., Morales, P. y Fiedler, J. L. (2010). "Comparison of the antidepressant sertraline on differential depression-like behaviors elicited by restraint stress and repeated corticosterone administration." Pharmacology Biochemistry and Behavior **97**(2): 213-221.

Walf, A. A. y Frye, C. A. (2007). "The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents." Nature Protocols **2**(2): 322-328.

Drug Information Online, Fasudil, [ en línea ] <<http://www.drugs.com/international/eril.htm>.> [ 10/11/2011

WHO, Depression, [ en línea] <[http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/definition/en/](http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/)> [08/11/2011]

Yamaguchi, Y., Katoh, H., Yasui, H., Mori, K. y Negishi, M. (2001). "RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway." The Journal of Biological Chemistry **276**(22): 18977-18983.

Yin, L., Morishige, K., Takahashi, T., Hashimoto, K., Ogata, S., Tsutsumi, S., Takata, K., Ohta, T., Kawagoe, J., Takahashi, K. y Kurachi, H. (2007). "Fasudil inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo." Molecular Cancer Therapeutics **6**(5): 1517-1525.

Ying, H., Biroc, S. L., Li, W. W., Alicke, B., Xuan, J. A., Pagila, R., Ohashi, Y., Okada, T., Kamata, Y. y Dinter, H. (2006). "The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models." Molecular Cancer Therapeutics **5**(9): 2158-2164.