



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**CAMBIOS NEUROPLÁSTICOS  
INDUCIDOS POR EL ANTIDEPRESIVO SERTRALINA  
EN UN MODELO DE DEPRESIÓN EN RATA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO**

**José Luis Ulloa Fulgeri**

**Directora y Patrocinante:**

**Dra. Jenny L. Fiedler Temmer**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**

**Universidad de Chile**

Lugar de Realización

**Laboratorio de Neurobioquímica**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

**Santiago de Chile**

**2007**

**A mi padres Cecilia y José Luis,  
a mi hermana Paola  
y a todos aquellos que quieren cambiar el mundo...**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis papás, mi hermana, mis abuelos y mis tíos por su apoyo, ejemplo, comprensión... por todo.

A la profesora Jenny por todas sus enseñanzas, fuerza, apoyo y espíritu.

A muchos profesores que me ayudaron, a la profesora Gabriela y al profesor Sergio por su gentil colaboración y ayuda en las determinaciones conductuales, a Patricia y Javier por los trabajos realizados en conjunto, a la profesora Amalia por las valiosas correcciones de este escrito, al profesor Bruce y a la profesora Inés por instruirme en ciencias durante mis años de carrera. A todos los profesores que de alguna u otra manera me motivaron.

A Juan Carlos, Freddy, Alejandra, Ximena y Chendo por su gran cooperación.

A Claudio, Sergio, Daniela, Pauli, Romi, David por su amistad, curiosidad, alegría y colaboración.

A Karina por su cariño, su encanto y su apoyo incondicional.

Al profesor Hernán, Alfonso, Mauricio, Pablo, Ramón, Monika, Eric, Sergio, Claudio, Gabriel por su amistad y simpatía.

A Carlos, Chang, Cristell, Daniel, Ginez, Hernando, Jocelyn, Jorge, Manuel, Marco (y chicos del lab), Nelson, Pablo, Pancho, Raúl, Rodrigo, Valentina, Víctor (y familia) y a otros más, por su invaluable amistad.

Esta memoria de título fue financiada por los proyectos FONDECYT 1040937, FONDECYT 7050285 y Universidad de Chile ENL1107, y ha dado origen a las siguientes comunicaciones:

**Berríos C. y Ulloa J.L.**

Comparación entre el efecto de la administración crónica de glucocorticoides y el estrés crónico: Efecto del antidepresivo sertralina.

II Congreso Chileno de Psicología.

Santiago de Chile, 3-6 Octubre 2007.

**Ulloa J.L., Berríos C., Díaz-Véliz G., Mora S., Gysling K., Fiedler J.**

Comparación entre el efecto de la administración crónica de glucocorticoides y el estrés crónico: Efecto del antidepresivo sertralina.

III Congreso de la Sociedad Chilena de Neurociencia.

Los Andes, Chile, 26-28 Septiembre 2007.

**Ulloa J.L., Castañeda P., Bravo J., Sotomayor R., Fiedler J.**

Chronic stress modulates phospho-CRMP-2 levels in rat hippocampus with no changes in monoamines content in rat prefrontal cortex.

II Reunión de la Sociedad Chilena de Neurociencia.

Curicó, Chile, 27-29 Septiembre 2006.

**Ulloa J.L., Castañeda P., Bravo J., Berríos C., Mora S., Díaz-Véliz G., Berthoud V., Fiedler J.**

Efecto del antidepresivo sertralina sobre parámetros fisiológicos y conductuales en un modelo animal de depresión.

I Congreso de la Sociedad Chilena de Neurociencia.

Santiago de Chile, 1-2 Diciembre 2005.

**Berríos C., Ulloa J.L., Castañeda P., Bravo J., Mora S., Díaz-Véliz G., Berthoud V., Fiedler J.**

Los efectos de sertralina se encuentran asociados a cambios conductuales, fisiológicos y moleculares en modelos animales de depresión.

XXVII Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile.

Santiago de Chile, 17-18 Noviembre 2005.

## ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
SUMMARY .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.2 La teoría monoaminérgica.....	1
1.3 Nuevas teorías sobre la etiología de la depresión.....	2
1.4 Alteraciones endocrinas asociadas a la depresión .....	3
1.5 Alteraciones en la función neurotrófica .....	4
1.6 Alteraciones en la conectividad sináptica.....	5
1.7 Crecimiento neuronal .....	5
1.8 Cambios moleculares asociados al crecimiento axonal.....	6
1.9 La proteína mediadora de la respuesta a la colapsina-2 .....	7
1.10 Estudio de la depresión en modelos animales .....	8
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>10</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
3.1 Objetivo general .....	10
3.2 Objetivos específicos.....	10
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
4.1 Reactivos generales y fármacos.....	11
4.2 Condiciones experimentales .....	12
4.2.1 Animales .....	12
4.2.2 Modelo de estrés crónico .....	12
4.2.3 Tratamiento farmacológico.....	12
4.2.4 Grupos experimentales .....	13
4.3 Preparación general de los tejidos .....	13
4.4 Determinación de los niveles séricos de corticosterona .....	14
4.5 Determinación del contenido de catecolaminas de la médula adrenal .	15
4.6 Determinación de neurotransmisores y sus metabolitos en la corteza prefrontal .....	15
4.7 Pruebas conductuales.....	17
4.7.1 Prueba de preferencia por sacarosa al 1% .....	17
4.7.2 Prueba de evitación activa .....	18
4.7.3 Prueba de natación forzada.....	19
4.8 Determinación de la CRMP-2 en extracto de hipocampo .....	19
4.8.1 <i>Western</i> de la CRMP-2.....	20
4.9 Determinación de la CRMP-2 y del BDNF por inmunohistoquímica .	21
4.9.1 Cuantificación de la inmunorreactividad de la CRMP-2.....	22
4.9.2 Cuantificación de la inmunorreactividad del BDNF .....	22

4.10	Análisis estadísticos .....	23
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
5.1	Cambios fisiológicos inducidos por el estrés crónico y por la administración de sertralina.....	24
5.1.1	Reducción en la ganancia de peso corporal .....	24
5.1.2	Marcadores asociados a la respuesta al estrés.....	24
5.1.2.1	Masa de la médula adrenal y contenido de catecolaminas .....	26
5.1.2.2	Niveles séricos de corticosterona .....	26
5.1.3	Contenido de neurotransmisores en la corteza prefrontal .....	26
5.1.3.1	Contenido de serotonina (5-HT) y de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) en la corteza prefrontal .....	26
5.1.3.2	Contenido de dopamina (DA) y de noradrenalina (NA) en la corteza prefrontal .....	29
5.2	Cambios conductuales inducidos por el estrés crónico y por la administración de sertralina.....	29
5.2.1	Anhedonia .....	32
5.2.2	Adquisición de respuestas condicionadas .....	32
5.2.3	Incapacidad para responder a estímulos aversivos: la desesperanza aprendida.....	32
5.2.3.1	Fallas en el escape .....	35
5.2.3.2	Inmovilidad .....	35
5.3	Cambios moleculares inducidos por el estrés crónico y por la administración de sertralina.....	35
5.3.1	Inmunorreactividad del BDNF en el hipocampo .....	38
5.3.2	Niveles de la CRMP-2 en el hipocampo .....	38
5.3.2.1	Niveles de la CRMP-2 en extracto de hipocampo ..	38
5.3.2.2	Distribución de la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el hipocampo .....	42
5.3.2.3	Inmunorreactividad de la CRMP-2 en el área CA1 del hipocampo .....	42
5.3.2.4	Inmunorreactividad de la CRMP-2 en el área CA3 del hipocampo .....	45
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
6.1	El modelo animal de restricción de movimiento.....	47
6.2	Reducción en la ganancia de peso corporal.....	48
6.3	Marcadores de estrés .....	50
6.4	Contenido de serotonina, ácido 5-hidroxi-indolacético, dopamina y noradrenalina en la corteza prefrontal .....	51
6.5	Anhedonia.....	55
6.6	Adquisición de respuestas condicionadas .....	56
6.7	Desesperanza aprendida .....	57
6.8	Inmunorreactividad del BDNF en el hipocampo.....	59

6.9	Inmunorreactividad de la CRMP-2 en el hipocampo .....	62
6.9.1	Distribución de la CRMP-2 en el hipocampo de rata .....	63
6.9.2	Inmunorreactividad de la CRMP-2 las áreas CA1 y CA3 del hipocampo.....	64
6.10	Proyecciones.....	66
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

## Página

Figura 1.	Estructura de la sertralina .....	12
Figura 2.	El estrés y la sertralina indujeron una reducción en la ganancia de peso corporal.....	25
Figura 3.	El estrés y/o la administración de sertralina no produjeron cambios en los niveles séricos de corticosterona.....	28
Figura 4.	El estrés y/o la administración de sertralina no produjeron cambios significativos en el contenido de serotonina y ácido 5-hidroxi-indolacético .....	30
Figura 5.	El estrés crónico y/o la administración de sertralina no produjeron cambios significativos en el contenido de dopamina y noradrenalina .	31
Figura 6.	La administración de sertralina impidió la anhedonia producida por el estrés .....	33
Figura 7.	La administración de sertralina impidió la reducción en la adquisición de respuestas condicionadas producida por el estrés.....	34
Figura 8.	La administración de sertralina impidió el incremento de las fallas en el escape producida por el estrés .....	36
Figura 9.	La administración de sertralina impidió el incremento en el tiempo de inmovilidad producido por el estrés .....	37
Figura 10.	Distribución de la inmunorreactividad del BDNF en el hipocampo ....	39
Figura 11.	El estrés y la administración de sertralina no modificaron la inmunorreactividad del BDNF en el hipocampo.....	40
Figura 12.	El estrés y la administración de sertralina no modificaron los niveles de la CRMP-2 en extracto de hipocampo.....	41
Figura 13.	Distribución de la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el hipocampo .....	43
Figura 14.	El estrés produjo una reducción en la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el área CA1 del hipocampo .....	44

Figura 15. La administración de sertralina modificó la reducción de la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el área CA3 del hipocampo producida por el estrés..... 46

## ÍNDICE DE TABLAS

## Página

Tabla 1.	Efecto del estrés y de la sertralina sobre la masa de la médula adrenal y el contenido de catecolaminas .....	27
----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## ABREVIATURAS

5-HIAA	:Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	:Serotonina
ACTH	:Hormona adrenocorticotrófica
ARC	:Adquisición de respuestas condicionadas
ARNm	:Ácido ribonucleico mensajero
BDNF	:Factor neurotrófico derivado de cerebro
CA	:Cuerno de Ammon
CAs	:Catecolaminas
CORT	:Corticosterona
CRF	:Factor liberador de corticotropina
CRMP-2	:Proteína mediadora de la respuesta a la colapsina
DA	:Dopamina
DAT	:Transportador de dopamina
DHBA	:Dihidrobencil-amina
DSM-IV	:Manual de diagnóstico y estadístico de enfermedades mentales
FE	:Fallas en el escape
FSL	:Línea de ratas sensibles Flinders
GD	:Giro dentado
GD-IP	:Capa infrapiramidal del giro dentado
GD-SP	:Capa suprapiramidal del giro dentado
GSK-3 $\beta$	:Kinasa de la glicógeno sintasa- 3 $\beta$
HHA	:Hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal
HPLC	:Cromatografía líquida de alta resolución
i.p.	:Intraperitoneal
IHQ	:Inmunohistoquímica
ISRN	:Inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina
ISRS	:Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
MAO	:Monoaminoxidasa
mBDNF	:Forma madura del BDNF
NA	:Noradrenalina
NAc	:Núcleo accumbens
NTR	:Receptor de neurotrofinas
P-CRMP-2	:Proteína mediadora de la respuesta a colapsina, fosforilada
PI3K	:Fosfatidilinositol-3 kinasa
PIP <sub>3</sub>	:Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PVN	:Núcleos paraventriculares
proBDNF	:Forma inmadura del BDNF
REM	:Movimiento rápido de ojos
TrkB	:Receptor para BDNF
VTA	:Area tegmental ventral

## **RESUMEN**

La depresión es el desorden del ánimo más importante y prevalente en la población actual, llegando a afectar al 10% de la población chilena adulta. La depresión es una enfermedad compleja y heterogénea, que compromete funciones cognitivas, emocionales, endocrinas y autonómicas. Aunque se desconoce la etiología exacta de esta enfermedad, se ha establecido que la depresión está asociada a factores genéticos y ambientales. Inicialmente se propuso que la depresión era una consecuencia de una alteración en la función aminérgica, especialmente de la serotoninérgica, siendo los inhibidores de la recaptación de serotonina muy útiles para el tratamiento antidepresivo. Actualmente hay evidencias que muestran una correlación entre la depresión y cambios neuroanatómicos como la reducción en el volumen hipocampal, indicando una pérdida de la plasticidad sináptica y probablemente la asociación de proteínas relacionadas al crecimiento neuronal (como el factor neurotrófico derivado de cerebro, BDNF) y proteínas asociadas al funcionamiento del citoesqueleto (como la proteína mediadora de la respuesta a la colpasina, CRMP-2) con el remodelamiento de las redes neuronales. A nivel experimental hay varios modelos animales de depresión, como por ejemplo aquellos que usan el estrés crónico, en los que se han observado cambios fisiológicos y conductuales que son impedidos por la administración de antidepresivos.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del estrés crónico por restricción de movimiento (2,5 hr/día durante 14 días) y de la administración repetida de sertralina (10 mg/kg/día durante 14 días), un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, en parámetros fisiológicos que cambian en respuesta al estrés, en parámetros conductuales similares a los observados en sujetos depresivos y en los niveles del BDNF y la CRMP-2 en el hipocampo, considerando su posible participación en el remodelamiento neuronal.

El estrés crónico por restricción de movimiento produjo una reducción en la ganancia de peso, efecto que no fue alterado por la administración de sertralina. El estrés crónico, así

como el tratamiento con sertralina, no modificaron los niveles de corticosterona, el contenido de catecolaminas ni la masa de la médula adrenal y tampoco modificaron significativamente el contenido de serotonina y ácido 5-hidroxi-indolacético en la corteza prefrontal de los animales. Sin embargo, se observaron pequeños efectos del estrés crónico y de la sertralina, en conjunto, sobre el contenido de los neurotransmisores cuantificados. Además, se observó un pequeño aumento en el contenido de noradrenalina y de dopamina en la corteza prefrontal por el estrés crónico y por la sertralina, respectivamente.

Los animales sometidos a estrés crónico presentaron conductas similares a la depresión tales como anhedonia, una menor adquisición de respuestas condicionadas y desesperanza aprendida (observado como fallas en el escape en la prueba de evitación activa e incremento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada). Estos cambios conductuales se correlacionaron con una reducción de los niveles de CRMP-2 en el área CA3 del hipocampo. La administración de sertralina abolió los cambios conductuales y normalizó los niveles de la CRMP-2, sugiriendo que esta proteína está asociada al remodelamiento neuronal inducido por los antidepresivos como la sertralina, tal vez a través de la modulación del citoesqueleto. No hubo cambios en los niveles del BDNF en el stratum oriens, cerca del área CA3 del hipocampo, sugiriendo que en esta área no serían necesarios cambios en esta neurotrofina para los efectos antidepresivos de sertralina.

## **SUMMARY**

### **NEUROPLASTIC CHANGES INDUCED BY THE ANTIDEPRESSANT SERTRALINE ON A RAT MODEL OF DEPRESSION**

Depression is one of the most important and prevalent mood disorders affecting 10% of the Chilean adult population. Depression is a complex and heterogeneous disorder, that compromises cognitive, emotional, endocrine and autonomic functions. Although there is no specific aetiology underlying depression, it has been established that this disease could be a consequence of genes and environmental factors. Initially it was proposed that depression is a consequence of an alteration in monoaminergic functions, especially those related to the serotonergic pathway, being the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) useful in clinical practice. Today there are evidences showing a correlation between depressive disorders and neuroanatomical changes such as a reduction in hippocampal volume, indicating a loss of synaptic plasticity associated to depression and an association between proteins related to neuronal growing (like brain derived neurotrophic factor, BDNF), proteins related to cytoskeleton functioning (like collapsin response mediator protein-2, CRMP-2) and the remodeling of these networks. At experimental level, there are several animals models of depressive e.g. chronic stress models. In these models there are physiological and behavioral changes by stress that are prevented by chronic antidepressants administration.

The aim of this study was to determine the effects of chronic motion restraint stress (2,5 hr/day for 14 days) and the chronic sertraline administration (10 mg/kg/day for 14 days), a SSRI antidepressant, on physiological parameters that change in response to stress, on behavioural parameters observed in depressive subjects and on BDNF and CRMP-2 levels in the hippocampus, considering its putative actions on neuronal remodeling.

Chronic stress reduced the weight gain, an effect that was not prevented by sertraline treatment. Neither chronic stress nor sertraline treatment affect corticosterone levels, the content of catecholamines, or the mass of the adrenal medulla. Likewise the content of serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid in the prefrontal cortex were not affected by chronic stress or sertraline treatment, however there were small effects of both experimental procedures as a whole on these parameters. Also, there was a little increase in content of noradrenaline and dopamine in the prefrontal cortex by chronic stress and by sertraline administration, respectively.

Chronically restrained animals showed depression-like behaviours: anhedonia, reduced acquisition of conditioned responses and learned helplessness (escape deficit in the active avoidance test and increased immobility in the forced swimming test). These behavioral changes were correlated with reductions in the level of CRMP-2 in the CA3 area of the hippocampus. Sertraline treatment prevented these behavioral changes and normalized the level of CRMP-2, suggesting that this protein is associated to the neuronal remodeling induced by antidepressants like sertraline, perhaps by modulating the cytoskeleton. There were no changes in the BDNF level in stratum oriens, near the CA3 area of the hippocampus, suggesting that is not necessary changes in this neurotrophin in this area for the antidepressant effects of sertraline.

# **1. INTRODUCCIÓN.**

La depresión es una enfermedad mental con un profundo impacto en la salud pública, llegando a afectar a cerca del 10% de la población chilena (Rojas y cols., 1997). Se considera clínicamente que un sujeto es depresivo cuando cinco o más síntomas como disminución del ánimo, alteración en el apetito y en el sueño, reducción en la capacidad de concentración, e ideación suicida entre otros, se presentan durante un período mínimo de 2 semanas (APA, 1994). La sintomatología asociada a la depresión no se manifiesta siempre igual en los sujetos afectados, lo que queda de manifiesto por ejemplo en la alteración del sueño (insomnio o hipersomnio) y en el apetito (hipofagia o hiperfagia) (Matthews y cols., 2005). En la actualidad se reconoce que el riesgo de presentar esta patología es en parte genética (40%-50%) y se han descrito varios genes que se asocian a una mayor susceptibilidad, indicando la complejidad de esta patología (Muller y Holsboer, 2006). Además, la aparición del cuadro depresivo está asociada a factores ambientales como el estrés, el trauma emocional, las infecciones virales y las alteraciones en el desarrollo cerebral (Fava y Kendler, 2000). Sin embargo, se desconocen los mecanismos mediante los cuales estos factores modulan la aparición de esta enfermedad.

## **1.2 La teoría monoaminérgica.**

No se han establecido las causas exactas de la depresión, pero se han postulado distintas teorías. En la década de los 50 se observó que la iproniazida, un fármaco que inhibe la monoaminoxidasa (MAO), reduciendo el catabolismo de las monoaminas, y aumentando así sus niveles, mejoraba el estado anímico de sujetos con tuberculosis a pesar del cuadro infeccioso (Castren, 2005). Estas observaciones dieron origen a la teoría monoaminérgica que postula que en sujetos depresivos hay una deficiencia en la neurotransmisión de monoaminas, especialmente de serotonina y noradrenalina (Nestler y cols., 2002). Por ello, se siguieron desarrollando fármacos que permitieran una mayor disponibilidad de neurotransmisores en el espacio sináptico: inhibidores de la MAO e

inhibidores generales y selectivos de la recaptación de monoaminas, siendo los inhibidores selectivos de serotonina (ISRS) y de noradrenalina (ISRN) los que, por sus menores efectos adversos, han logrado un mejor efecto terapéutico. La teoría monoaminérgica no explica el período de dos semanas que separa el comienzo de la terapia farmacológica y su efecto clínico, pues el restablecimiento de los niveles de los neurotransmisores es un proceso rápido que ocurre a pocas horas de la ingesta del antidepresivo (Castren, 2005). Por ello, se ha propuesto que la acción terapéutica de los antidepresivos se logra por cambios adaptativos que demoran en establecerse (D'Sa y Duman, 2002).

### **1.3 Nuevas teorías sobre la etiología de la depresión.**

Durante la maduración del sistema nervioso y en el cerebro adulto durante la formación de la memoria y el aprendizaje se modifican de manera temporal la estructura y la actividad de las conexiones sinápticas permitiendo ajustes y mecanismos de adaptación a diversos estímulos, conjunto de procesos que se ha llamado neuroplasticidad (D'Sa y Duman, 2002). El hipocampo es una estructura límbica conformada por neuronas piramidales (cuerno de Ammon o CA) y neuronas granulares (giro dentado o GD) que está asociada a la adquisición de memoria. Además, a través de conexiones con otras estructuras como la amígdala y la corteza prefrontal, el hipocampo está asociado a la regulación de las emociones. La atrofia de la corteza prefrontal y del área CA del hipocampo en modelos animales de estrés así como la disminución de volumen de estas mismas áreas cerebrales en sujetos depresivos (Manji y cols., 2001), sugiere que hay cambios en la neuroplasticidad cerebral relacionados con la aparición de la depresión (McEwen y Chattarji, 2004). En animales se ha observado que la atrofia hipocampal que se produce por una exposición crónica al estrés podría estar mediada por un incremento excesivo de glucocorticoides. Estas hormonas forman parte del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal y se han asociado al desarrollo de la depresión (Tafet y Bernardini, 2003).

#### **1.4 Alteraciones endocrinas asociadas a la depresión.**

El estrés es una respuesta fisiológica normal que corresponde a un conjunto de modificaciones nerviosas y endocrinas que permiten un proceso de adaptación a cambios en las condiciones ambientales de un ser vivo. Esta respuesta involucra principalmente la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal (HHA) (Tafet y Bernardini, 2003). Este comienza por un aumento en la descarga de las neuronas ubicadas en los núcleos paraventriculares (PVN) del hipotálamo, permitiendo la liberación del factor liberador de corticotrofina (CRF). Este factor estimula la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) desde la hipófisis anterior, la cual por su parte estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides desde la corteza de la glándula adrenal (Holsboer y Barden, 1996). La unión de estas hormonas a sus receptores permite regular la expresión de genes que poseen elementos de respuesta a glucocorticoides, ejerciendo profundos cambios en el metabolismo y en el comportamiento (Tafet y Bernardini, 2003). La actividad del eje HHA está controlada por estructuras cerebrales como el hipocampo, el que ejerce una influencia inhibitoria sobre las neuronas del PVN, y por la amígdala, que produce un aumento en la actividad de estas neuronas. Para mantener los niveles de glucocorticoides dentro de un rango fisiológico, el eje HHA es controlado por un mecanismo de retroalimentación negativa mediado por la unión de las mismas hormonas a receptores ubicados en la hipófisis y en el PVN del hipotálamo (Holsboer y Barden, 1996). Los glucocorticoides tienen efectos benéficos sobre el organismo participando en procesos como la adquisición de memoria (Sandi y cols., 1997). Sin embargo, se ha observado que los niveles sostenidos de esta hormona pueden causar daño en el área CA3 del hipocampo, provocando una reducción del árbol dendrítico y produciendo pérdida de espinas sinápticas (Watanabe y cols., 1992), a la vez que reducen el nacimiento de nuevas células granulares en el hipocampo (Lau y cols., 2007). En la mitad de los sujetos depresivos se ha observado un incremento de cortisol (principal glucocorticoide en humanos) y de CRH, indicando una desregulación del eje HHA (Holsboer y Barden, 1996). Además, algunos antidepresivos como la tianeptina y la amitriptilina, son capaces de reducir la actividad del eje HHA (Linkowski

y cols., 1987, Holsboer y Barden, 1996). Se ha propuesto que el daño producido por los glucocorticoides sobre las neuronas hipocampales es responsable de las alteraciones cognitivas que aparecen en sujetos depresivos y en otras enfermedades relacionadas con el estrés (Watanabe y cols., 1992). Además, la sobreactivación del eje HHA puede contribuir al desarrollo de la depresión no sólo por el aumento del cortisol sino por un incremento de la actividad hipotalámica que altera por ejemplo a las áreas relacionadas con el ciclo sueño-vigilia y el apetito, a la amígdala, afectando la respuesta emocional, y a las áreas asociadas al sistema nervioso simpático, incrementando la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Smagin y cols., 1999).

### **1.5 Alteraciones en la función neurotrófica.**

Los factores neurotróficos son reguladores del crecimiento y diferenciación de las neuronas del sistema nervioso central durante el desarrollo y en el adulto tienen un importante rol en la neuroplasticidad y en la supervivencia celular (Duman y Monteggia, 2006). Algunos autores han planteado que la depresión es el resultado de la deficiencia de factores neurotróficos y que el mecanismo de acción de los antidepresivos es incrementarlos; sin embargo, se desconoce cómo proceden estos cambios (Duman y Monteggia, 2006). El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) es un péptido que incrementa el largo axonal y el número de espinas dendríticas promoviendo la formación de contactos sinápticos (Tapia-Arancibia y cols., 2004). El BDNF también modula la plasticidad sináptica en estructuras como el hipocampo, modificando su función a través de un aumento de la eficiencia sináptica (Lu y cols., 2005). Se ha observado que el estrés agudo y crónico producen disminución de su ARNm en el giro dentado y en la capa piramidal de esta estructura, efecto mediado en parte por el alza de glucocorticoides y en parte por una alteración de la neurotransmisión serotoninérgica (Duman y cols., 2001). En animales, la administración crónica, pero no aguda, de antidepresivos promueve un incremento del ARNm del BDNF en el hipocampo e incluso impiden su disminución en diferentes protocolos de estrés (Duman y Monteggia, 2006). Además, la infusión directa

del BDNF en el hipocampo produce acciones antidepresivas en roedores (Shirayama y cols., 2002). Se ha propuesto que el aumento en los niveles del BDNF podría explicar el tiempo que se requiere para observar la manifestación de la mejoría clínica ejercida por la terapia farmacológica (Duman y Monteggia, 2006), pero aún no hay datos concluyentes.

### **1.6 Alteraciones en la conectividad sináptica.**

Los cambios anatómicos que se observan en sujetos depresivos, así como la atrofia de las dendritas de neuronas piramidales en el hipocampo de ratas sometidas a estrés, han llevado a postular que en esta patología se produce una alteración en el funcionamiento de las redes neuronales (Castren, 2005). La actividad de los circuitos neuronales cambia en función de los estímulos recibidos del medio ambiente para generar una respuesta adecuada. En la depresión, al producirse un deterioro de la actividad neuronal se produce una percepción aberrante de los estímulos y la generación de respuestas inadecuadas (Castren, 2005). Esta hipótesis contempla no sólo cambios en los niveles de factores de crecimiento y de neurotransmisores sino que también cambios en proteínas que están relacionados con la mantención y función de los circuitos neuronales (Sandi, 2004; Magarinos y McEwen, 1995).

### **1.7 Crecimiento neuronal.**

El perfeccionamiento de técnicas para estudiar la formación y el crecimiento de los circuitos neuronales ha permitido explorar las proteínas involucradas en las conexiones neuronales. En estudios *in vitro* se ha observado que durante el proceso de maduración neuronal las células extienden proyecciones citoplasmáticas llamadas neuritas. Una de ellas crece y madura para transformarse en axón y condiciona a las demás a convertirse en dendritas (Arimura y cols., 2004). En la extremidad distal de las neuritas existen los conos de crecimiento, estructuras dinámicas que alternan fases de elongación y

retracción y cuya interacción con una variedad de factores, solubles y de membrana, permite que el axón crezca y realice una trayectoria determinada (Kandel y cols., 2001). El extremo del axón avanza por elongación y contracción de proyecciones citoplasmáticas formadas por complejos proteicos de microfilamentos de actina y de microtúbulos (Arimura y cols., 2004). La actina es una proteína globular que forma parte fundamental del citoesqueleto y está relacionada con la contracción muscular. Los filamentos de actina ocupan regiones periféricas del cono de crecimiento otorgando movilidad a las proyecciones citoplasmáticas (Challacombe y cols., 1996). Los microtúbulos son polímeros formados por la proteína tubulina que proveen un soporte estructural a las neuronas y en los axones permiten el transporte de vesículas. Durante el crecimiento y el avance del axón hacia su blanco la red de microtúbulos dentro del cono en crecimiento se reorganiza para orientar su dirección (Challacombe y cols., 1996).

## **1.8 Cambios moleculares asociados al crecimiento axonal.**

El cono de crecimiento está provisto de un sistema de transducción de señales que permite integrar toda la información que recibe (Kandel y cols., 2001). Se ha observado que la activación de enzimas como la fosfatidilinositol-3 kinasa (PI3K) y la acumulación de su producto, el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), en la extremidad distal de las neuritas inmaduras es un evento importante para la especificación y elongación axonales (Menager y cols., 2004). La unión del BDNF y del factor de crecimiento neuronal a sus receptores Trk permite la activación de la PI3K. El posterior aumento de PIP<sub>3</sub> permite la activación de la kinasa Akt (Fukumoto y cols., 2001), que junto a otras kinasas permite la fosforilación de la kinasa de la glicógeno sintasa -3β (GSK-3β), inhibiendo su actividad (Yoshimura y cols., 2006). Esta kinasa se ha asociado a la transducción de señales de la insulina, de factores tróficos y de nutrientes (Forde y Dale, 2007). La inhibición de la GSK-3β induce la formación de múltiples axones, mientras que una GSK-3β constitutivamente activa inhibe la formación de axones.

Entre los numerosos blancos de fosforilación de la GSK-3 $\beta$  se encuentra la proteína mediadora de la respuesta a la colapsina-2 (CRMP-2) (Yoshimura y cols., 2005).

### **1.9 La proteína mediadora de la respuesta a la colapsina-2.**

Las proteínas mediadoras de la respuesta a la colapsina (CRMPs) son una familia de fosfoproteínas citosólicas cuya presencia está circunscrita a las neuronas. Aunque la mayoría sólo se encuentra en estadios tempranos del desarrollo neuronal, la CRMP-2 persiste en la edad adulta (Wang y Strittmatter, 1996). Inicialmente se descubrió en *Caenorhabditis elegans*, que la mutación de un gen homólogo al de CRMP-2 produce la formación de axones aberrantes (Li y cols., 1992). Posteriormente se determinó que la CRMP-2 regula el colapso del cono de crecimiento en ganglios de la raíz dorsal, un evento asociado a la retracción del axón. Actualmente se sabe que la vía de las semaforinas, iniciada por la unión de la proteína semaforina 3A a su receptor formado por neuropilina-1 y plexina, es uno de los sistemas que controla la guía del axón hacia su blanco, siendo las CRMPs algunas de las proteínas que retransmiten la señal (Bretin y cols., 2005). Se ha observado que la CRMP-2 puede promover la retracción del axón cuando forma parte de la vía de las semaforinas, pero dependiendo de su localización o de su asociación puede funcionar como un factor elongador (Arimura y cols., 2004). En cultivos de neuronas hipocampales se ha observado que los conos de crecimiento están enriquecidos en CRMP-2 y que la sobreexpresión de esta proteína produce la formación de axones supernumerarios (Inagaki y cols., 2001). Interesantemente, este proceso parece estar regulado por proteínas como la neurotrofina-3 y el BDNF, a través de la inactivación de la GSK-3 $\beta$  y la consiguiente desfosforilación de la CRMP-2 (Yoshimura y cols., 2005). Además se ha observado que cambios en la CRMP-2 están relacionadas con algunas patologías neurológicas y psiquiátricas. En pacientes con epilepsia del lóbulo temporal mesial, patología que se caracteriza por la pérdida de neuronas hipocampales, se ha observado una disminución de ciertas isoformas de la CRMP-2 en esta área cerebral (Czech y cols., 2004). Además, en un estudio postmortem en sujetos depresivos y con otras enfermedades psiquiátricas se observó una disminución de la

CRMP-2 en la corteza frontal en comparación con sujetos normales (Johnston-Wilson y cols., 2000). La relación de la CRMP-2 con la depresión también se ha puesto de manifiesto en un estudio en que la administración crónica de los antidepresivos venlafaxina y fluoxetina a ratas produjo un incremento de la CRMP-2 en el hipocampo (Khawaja y cols., 2004).

### **1.10 Estudio de la depresión en modelos animales.**

El estudio en modelos *in vitro* ha permitido un conocimiento más profundo de los mecanismos asociados a la conectividad sináptica, y actualmente se complementa con estudios en modelos animales para tratar de explicar los cambios morfológicos que se han observado en sujetos depresivos. En los modelos animales se trata de generar un conjunto de signos análogos a los que se observan en sujetos depresivos (Matthews y cols., 2005). Entre ellos, los modelos de estrés crónico se han utilizado ampliamente y se han observado cambios como disminución de la actividad locomotora, menor desempeño en pruebas de aprendizaje, disminución en la ganancia de peso y menor interés por estímulos placenteros, entre otros (Matthews y cols., 2005).

Algunos investigadores han establecido que para modelar una patología psiquiátrica en un animal, se deben cumplir al menos dos criterios: (i) confiabilidad, es decir, la reproducibilidad con que se observan los cambios que se miden, y (ii) validez de la predicción, o sea, que se puede predecir un comportamiento humano en base a lo que se observa en el modelo. Para estudiar la depresión este criterio se cumple cuando hay una correspondencia entre la acción de los antidepresivos en el modelo y lo observado en sujetos depresivos (Geyer y Markou, 2000). Además, la interpretación de estos modelos se debe hacer sobre la premisa de que se hace una extrapolación de la conducta de la rata a la del hombre suponiendo que hay analogía entre las características fisiológicas y conductuales entre ambos, haciendo notar que para entender la depresión siempre tiene que existir investigación clínica complementaria a la investigación en modelos animales.

**De todo lo expuesto es necesario destacar:**

- ☑ La depresión es una enfermedad multifactorial de sintomatología muy variable.
- ☑ El riesgo de sufrir depresión depende de factores genéticos y ambientales.
- ☑ Los fármacos que aumentan la disponibilidad de la noradrenalina y/o la serotonina en el espacio sináptico son de gran utilidad para tratar la depresión, pero aún se desconoce su mecanismo de acción terapéutica.
- ☑ Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina tienen una buena eficacia terapéutica y menores efectos adversos que los antidepresivos tradicionales.
- ☑ En estudios postmortem en sujetos depresivos y en modelos animales de depresión se han observado alteraciones morfológicas en el sistema límbico, especialmente en el hipocampo.
- ☑ Algunos pacientes con depresión mayor presentan incremento de los niveles de glucocorticoides lo que refleja alteraciones en el eje HHA.
- ☑ Se desconoce de qué forma el BDNF y otras neurotrofinas están asociadas a las acciones terapéuticas de los antidepresivos, pero una de sus posibles acciones es la modulación de proteínas relacionadas con el citoesqueleto.
- ☑ Estudios recientes sugieren que existe una asociación entre los niveles de la CRMP-2 y los cambios morfológicos que se observan en estructuras como el hipocampo en sujetos depresivos y en modelos animales de depresión.

## **2. HIPÓTESIS.**

**El antidepresivo sertralina impide las modificaciones fisiológicas, conductuales y moleculares producidas en la rata por el estrés crónico por restricción de movimiento.**

## **3. OBJETIVOS.**

### **3. Objetivo general.**

Determinar si en la rata la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento produce cambios fisiológicos en respuesta al estrés, cambios conductuales similares a la depresión y cambios moleculares del BDNF y la CRMP-2 en el hipocampo. Así mismo, determinar si estos cambios son modulados por la administración repetida de sertralina.

### **3.1 Objetivos específicos.**

3.1.1 Determinar si en la rata la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento produce cambios en A) marcadores de estrés: niveles de corticosterona séricos, masa de la médula adrenal y su contenido de catecolaminas y B) cambios en el contenido de neurotransmisores en la corteza prefrontal. Además determinar si la administración repetida de sertralina es capaz de impedir estos cambios.

3.1.2 Determinar si la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento produce conductas similares a la depresión. Además, determinar si la administración repetida de sertralina es capaz de impedir estos cambios.

3.1.3 Determinar si la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento produce cambios en la inmunoreactividad del BDNF y de la CRMP-2 en el hipocampo. Además, determinar si la administración repetida de sertralina es capaz de prevenir estos efectos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1 Reactivos generales y fármacos.

**BioRad Laboratories** (CA, EE.UU.): azul de bromo fenol, persulfato de amonio, bis, N,N-metilen-bis-acrilamida (bis-acrilamida), acrilamida.

**Farmacias Ahumada:** sertralina (droga pura).

**GIBCO BRL** (Carlsbad, CA, EE.UU.): suero fetal de bovino.

**Merck** (Darmstadt, Alemania): cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), dodecil sulfato de sodio (SDS), fosfato monoácido de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato diácido de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), ácido perclórico (PCA), paraformaldehído (PFA), sacarosa, glicerol, glicina, Tween 20, Tris-HCl, ácido ortofosfórico, acetonitrilo.

**Sigma-Aldrich** (Saint Louis, MO, EE.UU.): rojo Ponceau, HEPES, EGTA, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), NaPPi, NaF, leupetina, aprotinina, PMSF,  $\text{NaVO}_3$ , Triton X-100, albúmina sérica de bovino (BSA), dihidrobencil-amina (DHBA), ácido bicinconínico (BCA), octilsulfato de sodio.

**United States Biologicals** (Swampscott, MA, EE.UU.): tris-base.

**Invitrogen** (Carlsbad, CA, EE.UU.): marcador de peso molecular para geles de proteínas (Bench Mark), TEMED.

**Riedel-de Haën** (Hanover, Alemania): isopentano.

**Drug Pharma** (Santiago, Chile): ketamina 10%.

**Laboratorios Centrovvet** (Santiago, Chile): xilacina 2%.

Para preparar las soluciones se utilizó agua destilada de un equipo Schott y para las determinaciones cromatográficas se utilizó agua desionizada de un equipo Millipore.

## **4.2 Condiciones experimentales.**

### **4.2.1 Animales.**

Se usaron ratas macho Sprague-Dawley 200-220 g de peso al inicio de los experimentos y criadas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en condiciones estandarizadas de ciclo luz-oscuridad de 12 horas, a una temperatura de  $\pm 22^{\circ}\text{C}$  y con una humedad de 45%. Los animales tuvieron libre disponibilidad de agua y alimentos. Durante los tratamientos se determinó el peso de las ratas diariamente. Posteriormente se realizaron pruebas conductuales tras lo cual se sometieron las ratas a eutanasia. Los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

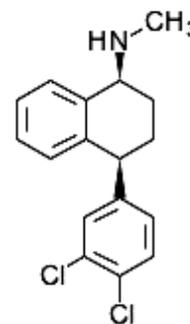
### **4.2.2 Modelo de estrés crónico.**

Se utilizó un modelo de estrés crónico por restricción de movimiento. Los animales se colocaron en tubos de acrílico transparente (80 mm de diámetro) para disminuir su capacidad de movimiento, pero no para inmovilizarlos completamente. Este procedimiento se realizó 2,5 horas diarias durante 14 días consecutivos. Durante el tiempo que estuvieron restringidos de movimiento los animales no tuvieron acceso a agua ni comida. Las sesiones de restricción de movimiento se realizaron durante la mañana (entre 9:00 y 12:00) para evitar efectos no específicos debido a cambios circadianos (Bravo, 2007).

### **4.2.3 Tratamiento farmacológico.**

Los animales recibieron inyecciones por vía intraperitoneal (i.p.) de sertralina ((1S)-cis-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-N-metil-1-naftalenamina) un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina. La sertralina se disolvió en agua tibia a una

concentración de 5 mg/mL y se inyectó a una dosis diaria de 10 mg/kg de peso corporal del animal. La estructura de la sertralina se muestra a continuación.



**Figura 1**  
Estructura de  
la sertralina

#### 4.2.4 Grupos experimentales.

Se consideraron cuatro condiciones experimentales cuyos tratamientos duraron 14 días:

1) animales controles que no se estresaron y recibieron inyecciones de solución de NaCl al 0,9% (C); 2) animales controles que no se estresaron y recibieron inyecciones de sertralina (S); 3) animales que se estresaron crónicamente y recibieron inyecciones de solución de NaCl al 0,9% (R) y 4) animales que se estresaron y recibieron inyecciones de sertralina (R/S).

#### 4.3 Preparación general de los tejidos.

Los animales utilizados en el análisis por inmunohistoquímica (IHQ), fueron perfundidos como se describe a continuación. Las ratas se anestesiaron con una inyección i.p. de ketamina 10%-xilaxina 2% a una dosis de 1,5 y 9 mg/kg de peso del animal, respectivamente. Luego, se abordó la cavidad abdominal para conectar la aorta del corazón a una bomba peristáltica y se perfundió con 200 mL de una solución de NaCl al 0,9% a temperatura ambiente y con un flujo de 14 mL/min. Posteriormente se perfundió con una solución de PFA al 4% en PBS (NaCl 0,15 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,08 M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 M pH 7,4), al mismo flujo anterior. Después se extrajo el encéfalo de los animales, se deshidrataron en una solución de sacarosa al 30% en PBS y se guardaron en un congelador a -80°C hasta su utilización. Para los experimentos de IHQ se realizaron cortes coronales de 12 µm de grosor en un crióstato (Microm HM 500 OM, Microm, Walldorf, Alemania) de acuerdo a las coordenadas Bregma -2,8 a -3,8 para hipocampo (Paxinos y Watson, 1982). Los cortes se colocaron alternadamente sobre portaobjetos silanizados y se almacenaron en un congelador a -80°C hasta su utilización.

Aquellos animales utilizados en las mediciones bioquímicas, se eutanaziaron por decapitación. Se extrajeron el hipocampo y la corteza prefrontal y se congelaron rápidamente en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Se almacenaron inmediatamente en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Además, se recolectó una muestra de sangre en tubos de vidrio y se extrajeron las glándulas adrenales, se registró su masa y se colocaron en tubos plásticos de 1,5 mL para su almacenamiento en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4 Determinación de los niveles séricos de corticosterona.**

La muestra de sangre se centrifugó a  $4000\times g$  durante 15 minutos y el suero obtenido se almacenó en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la determinación cuantitativa de los niveles séricos de corticosterona mediante un ensayo inmunoenzimático que tiene un límite de sensibilidad de  $27\text{ pg/mL}$  (Correlate-EIA<sup>TM</sup>, Enzyme Immunoassay Kit, Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI, EE.UU.). Se realizó la dilución de los estándares de la hormona ( $32, 160, 800, 4000, 20000\text{ pg/mL}$ ) y de las muestras (1:40) en el tampón proporcionado por el fabricante. Se colocaron  $100\text{ }\mu\text{L}$  de las diluciones en una placa de 96 pocillos ya recubierta con un anticuerpo (anti cabra Ig G), que reconoce al anticuerpo que se une específicamente a la corticosterona (anticuerpo preparado en cabra). Se agregaron  $50\text{ }\mu\text{L}$  de corticosterona conjugada a fosfatasa alcalina la cual compite con la hormona presente tanto en las muestras como en los estándares por la unión al anticuerpo que reconoce a la corticosterona presente en la placa. Se adicionaron a todos los pocillos, excepto al pocillo blanco y al pocillo para determinar la unión no específica,  $50\text{ }\mu\text{L}$  de un anticuerpo policlonal que reacciona contra la corticosterona libre (conjugada y no conjugada) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Se efectuaron 3 lavados con  $400\text{ }\mu\text{L}$  de un tampón provisto por el fabricante y se agregó el sustrato de la fosfatasa alcalina (p-nitrofenilfosfato) el cual genera un producto de color amarillo (p-nitrofenol). Luego de 1 hora se detuvo la reacción mediante la adición de una solución provista por el fabricante. Se determinó la absorbancia del producto

coloreado a 405 nm en un lector de placas (Expert 96, Asys Hitech, Augendorf, Austria). La lectura de la absorbancia de la curva estándar se usó para calcular la concentración de corticosterona en los sueros de los animales.

#### **4.5 Determinación de catecolaminas de la médula adrenal.**

La determinación de catecolaminas se realizó en homogeneizados de médula adrenal de rata. El tejido se homogeneizó en 1 mL de PCA 0,2 N con un homogeneizador vidrio-vidrio. Después se centrifugó a 4°C a 12000x g durante 15 minutos y se recolectaron 100 µL del sobrenadante para la medición de catecolaminas por el método colorimétrico de Von Euler y Hamberg (1949), que se basa en la oxidación de adrenalina y noradrenalina a adrenocromo y noradrenocromo respectivamente los que tienen una absorbancia a 540 nm. La muestra y los estándares de catecolaminas (250 µg/mL) se diluyeron en agua y se les agregó 40 µL de acetato de sodio 1 M, seguidos por 20 µL de una solución de yodo/yoduro 0,1 N/0,05 N. La reacción procedió durante 3 minutos y se detuvo con tiosulfato de sodio 0,05 N. Se midió la absorbancia de las muestras y de los estándares a 540 nm y finalmente se obtuvo la concentración de las catecolaminas extrapolando en la curva de calibración.

#### **4.6 Determinación de los neurotransmisores y sus metabolitos en la corteza prefrontal.**

Al término de los tratamientos los animales se sometieron a eutanasia, se disecó la corteza prefrontal colectándola en frío y se almacenó en un congelador a -80°C. El tejido se homogeneizó en frío por 1 minuto en 400 µL de PCA 0,2 N, el homogeneizado se centrifugó a 12000x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se separó con una unidad de filtración de 0,2 µm y se centrifugó a 12000x g durante 10 minutos a 4° C. El nuevo sobrenadante se inyectó en el sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para la determinación de noradrenalina (NA) se requirió, además, un proceso de purificación y concentración a través de un protocolo de adsorción de catecolaminas

en alúmina. Este tratamiento se aplicó tanto a las muestras como a las soluciones estándares de NA. Se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de cada estándar o 100  $\mu\text{L}$  de la muestra en tubos cónicos de 15 mL. A las muestras se les agregaron 100  $\mu\text{L}$  de PCA 0,2 N y 20  $\mu\text{L}$  de dihidrobencil-amina (DHBA) 5 mg/mL como estándar interno. A cada tubo se agregaron también 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,1 M pH 7, 1 mL de agua desionizada, 50 mg de alúmina activada y 1 mL de Tris-HCl 1,5 M-EDTA 2% pH 8,5. Se le ajustó el pH a esta solución entre 8,5 y 8,6 con NaOH 5 N (5  $\mu\text{L}$  aproximadamente) para permitir la adsorción de las catecolaminas a la alúmina. Las muestras se agitaron durante 15 minutos y se sedimentó la alúmina por centrifugación a 1000x g durante 5 minutos. El líquido se sacó por aspiración y se lavó la alúmina resuspendiéndola en 5 mL de agua desionizada fría y agitando durante 10 minutos, proceso que se repitió 3 veces. Finalmente la alúmina se secó introduciendo una tira de papel filtro terminado en punta y las catecolaminas se eluyeron con 100  $\mu\text{L}$  de PCA 0,2 N. Se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se dejaron reposar las muestras en hielo otros 5 minutos. Los tubos se centrifugaron 5 minutos y se colectaron los sobrenadantes. La elución se repitió con 100  $\mu\text{L}$  adicionales de PCA 0,2 N y de la solución obtenida se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  en el sistema de HPLC para la cuantificación de la NA. Las fases móviles que se utilizaron para la cromatografía fueron las siguientes:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, EDTA 1 mM, octilsulfato de sodio 0,42 mM y acetonitrilo 1,5 % v/v ajustado a pH 2,6 con ácido ortofosfórico para la determinación de NA y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, EDTA 1 mM, octilsulfato de sodio 0,84 mM y acetonitrilo 5 % v/v ajustado a pH 2,2 con ácido ortofosfórico para la determinación de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) y dopamina (DA).

Las muestras se analizaron usando HPLC (Waters 600-E Multisolvant, Waters, Millipore Corporation, Milford, MA, EE.UU.) acoplada a detección amperométrica (Waters 464 Pulsed Electrochemical Detector, Waters, Millipore Corporation, Milford, MA, EE.UU.) a una diferencia de potencial de 650 mV, potencial al cual se oxidan los neurotransmisores estudiados. Los neurotransmisores se separaron en una columna BAS

250 x 4,6 mm MF-6017, Biophase ODS 5  $\mu\text{m}$  (BAS, West Lafayette, IN, EE.UU.). La sensibilidad del detector amperométrico se fijó en 1, 2 o 5 nA, dependiendo de la cantidad de neurotransmisor de cada muestra. Los cromatogramas se analizaron en un computador conectado al detector del equipo usando un *software* que permite la integración del área bajo la curva. Los tiempos de retención fueron: 5 minutos para la NA, 10 minutos para el DHBA, 3 minutos para la DA, 5 minutos para el 5-HIAA y 8 minutos para la 5-HT. La determinación de neurotransmisores y metabolitos se realizó mediante la construcción de una curva de calibración en la que se relaciona la cantidad de neurotransmisor del estándar con el área bajo la curva. Se calculó la cantidad de neurotransmisor de las muestras por interpolación en la curva a partir del área bajo la curva obtenida de los cromatogramas.

#### **4.7 Pruebas conductuales.**

Se utilizaron pruebas conductuales para determinar si el estrés crónico por restricción de movimiento originó características similares a las que se observan en sujetos depresivos.

##### **4.7.1 Prueba de preferencia por sacarosa al 1%.**

El objetivo de esta prueba fue evaluar el grado de motivación que tiene el animal por la búsqueda de un estímulo placentero, o conducta hedónica, que en este caso es la solución dulce de sacarosa al 1%. En esta prueba los animales tuvieron la posibilidad de elegir entre beber agua o beber una solución de sacarosa al 1%. Durante la semana previa al inicio de los tratamientos las ratas se pusieron diariamente durante 3 horas en jaulas individuales provistas de dos tubos de plástico: uno con agua y otro con la solución de sacarosa al 1%. Los tubos se alternaron diariamente y en forma azarosa, con el fin evitar el reconocimiento de la solución de sacarosa por la habituación (Zurita et al., 2000). Al séptimo día se evaluó el porcentaje de preferencia por la solución de sacarosa al 1% en función del volumen total de líquido consumido. Una vez que se iniciaron los

tratamientos, se evaluó la preferencia por la solución de sacarosa al 1% a los 7 y 14 días de los protocolos. Para realizar la medición se colocaron los animales en jaulas individuales y se determinó el consumo de líquidos durante 1 hora. Una vez que se terminó la prueba se determinó el porcentaje de preferencia por la solución de sacarosa al 1% en función del volumen total de líquido consumido.

#### **4.7.2 Prueba de evitación activa.**

El objetivo de esta prueba fue determinar si el estrés por restricción de movimiento fue capaz de modificar la capacidad de adquirir una respuesta condicionada (medida como “adquisición de respuestas condicionadas”) y si fue capaz de promover la condición de desesperanza aprendida (medida como “fallas en el escape”).

En esta prueba cada animal se puso individualmente en una caja compuesta por dos compartimentos de acero inoxidable entre los cuales hay una compuerta abierta 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 acondicionamiento, durante la cual la rata pudo 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 durante 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 Díaz-Véliz, 1993).

#### **4.7.3 Prueba de natación forzada.**

El objetivo de esta prueba fue determinar si el estrés crónico por restricción de movimiento fue capaz de promover una conducta de desesperanza aprendida. La prueba de natación forzada tuvo dos etapas de un día cada una. En el primer día los animales se pusieron durante 15 minutos en un cilindro de acrílico de 20 cm de diámetro por 50 cm de alto, llenado con agua (22° - 23°C) hasta una altura de 30 cm. En el segundo día se evaluaron durante 5 minutos las conductas que el animal presentó a esta nueva exposición a un estímulo aversivo. Se evaluó la conducta midiendo la duración de tres parámetros: 1) escalamiento: cuando el animal trata de subir por la pared del tubo; 2) natación: cuando el animal nada en busca de una salida, y 3) inmovilidad: cuando la rata no hace ningún esfuerzo por buscar una salida y sólo intenta mantenerse a flote. La inmovilidad se obtuvo sustrayendo de los 5 minutos el tiempo en que el animal no estuvo en conductas activas.

#### **4.8 Determinación de la CRMP-2 en extracto de hipocampo.**

A través de disección en frío se obtuvo tejido hipocampal de los animales. El tejido se homogeneizó en cinco volúmenes de tampón para lisis (HEPES 10 mM pH 7,9; KCl 10 mM; EGTA 0,1 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 0,5 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1 mM; PMSF 0,1 mM; aprotinina 2 µg/mL; leupeptina 2 µg/mL; NaF 0,02 mM; NaPPi 0,025 mM y Tritón X-100 0,06%) usando un homogeneizador vidrio-vidrio y a 4°C. Se centrifugó a 18.000x g durante 30 minutos a 4°C y se descartó el precipitado. Se utilizó una alícuota del sobrenadante para cuantificar las proteínas mediante el método del ácido bicinónico

(BCA) (Sapan y cols., 1999), usando BSA como estándar para la curva de calibración. El resto del sobrenadante fue desnaturalizado con una solución de carga tamponada (Tris-HCl 250 mM pH 6,8; SDS 5%; glicerol 6,7% v/v; DTT 0,512 mg/mL; azul de bromofenol 13,33 mg/mL). Las muestras se hirvieron durante 10 minutos y se almacenaron en el congelador a -80°C.

#### **4.8.1 Western de la CRMP-2.**

Se resolvieron 25 µg de proteínas y 4 µg de estándar preteñido de un rango de peso molecular de 6,0-181,8 kDa en un gel de poliacrilamida-SDS. El gel concentrador contenía 5% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), SDS 0,1%, Tris 125 mM a pH 6,8 y el gel separador contenía SDS 0,1%, Tris 375 mM pH 8,8 y 12% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1). La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis (Mini Protean III, BioRad, EE.UU.) en un tampón de corrida (Tris 2,5 mM, SDS 0,01%, glicina 19 mM) y durante 3 horas a una diferencia de potencial de 80 V con una fuente de poder Desatronic 500/500 (DESAGA, Alemania). Luego de la separación de las proteínas se realizó la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa de poro 0,2 µm (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) durante 2 horas a 250 mA en una fuente con hielo (aproximadamente a 4°C) en un tampón de transferencia (glicina 19 mM, Tris 2,5 mM, metanol 20%). Para verificar el proceso de transferencia se visualizaron las bandas de las proteínas tiñendo con rojo Ponceau al 2%. Posteriormente se decoloró la membrana exhaustivamente con PBS-Tween 20 al 0,1%. Para bloquear las uniones no específicas del anticuerpo a la membrana, ésta se incubó, agitándola continuamente (agitador D56-304, Heidolph, Alemania) en una solución de leche descremada en polvo (Nestlé) al 3% disuelta en TBS (Tris HCl 25 mM, NaCl 140 mM y KCl 2 mM a pH 7,4) con Tween-20 al 0,1% durante 1 hora. Se incubó en una solución del anticuerpo primario anti-CRMP-2 (AB9218, Chemicon, EE.UU.) a una dilución 1:5000 en TBS con leche al 3% y Tween-20 al 1%, toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno con una solución de TBS con Tween-20 al 0,1% a temperatura ambiente. A continuación se incubó la membrana con una solución del anticuerpo secundario anti-

IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, IL, EE.UU.) a una dilución de 1:10.000 en una solución de PBS con Tween-20 al 1% y leche descremada en polvo al 3%, durante dos horas con agitación y a temperatura ambiente. Nuevamente se sometió la membrana a dos lavados de 10 minutos cada uno con una solución de PBS, y luego se incubó con el sustrato de quimioluminiscencia para la peroxidasa (Perkin-Elmer, Boston, MA, EE.UU.) durante 1 minuto. La membrana se puso en contacto con un film fotográfico (Kodak, Rochester, NY, EE.UU.) a distintos tiempos (entre 1 y 30 minutos). El film se colocó en una solución de revelado durante 1 minuto y luego en una solución de fijado durante 5 minutos (AGFA-Gevaert, BA, Argentina). Las bandas obtenidas en los films se analizaron mediante densitometría con el programa UN-SCAN-IT gel, *Automated Digitizing System* Versión 4.1 Windows (Silk Scientific Inc., Orem, UT, EE.UU.). Para determinar cambios semicuantitativos, las intensidades de las bandas de las proteínas se normalizaron respecto a la intensidad de la banda de la proteína constitutiva  $\beta$ -actina.

#### **4.9 Determinación de la CRMP-2 y del BDNF por inmunohistoquímica.**

Se utilizó la IHQ para determinar cambios regionales de la CRMP-2 y del BDNF en distintas zonas del hipocampo. Los cortes coronales se sacaron del congelador y se realizó un lavado con PBS. Con el fin de realizar una recuperación antigénica los cortes se incubaron en una solución de tampón citrato (pH 6,0) durante 20 minutos a 90°C y se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Los cortes se lavaron con agua destilada durante 5 minutos tres veces, y luego se pusieron en PBS durante 10 minutos dos veces. El tejido se permeabilizó con Tritón X-100 0,3% en PBS durante 10 minutos y se realizó un lavado con PBS dos veces durante 10 minutos. Se agregó suero normal de cabra (NGS) al 3% en PBS y se incubó durante 30 minutos para evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario al tejido. Luego se incubó con los anticuerpos primarios para las diferentes proteínas, en NGS 1% en PBS durante toda la noche a 4° C.

Para el BDNF se usó un anticuerpo policlonal (Santa Cruz, N-20, EE.UU.) en dilución 1:750 y para la CRMP-2 se usó un anticuerpo policlonal (Chemicon, AB9218, EE.UU.) en dilución 1:400. Al día siguiente los tejidos se lavaron y se incubaron en una solución con anticuerpo secundario anti Ig G de conejo conjugado a biotina a una dilución 1:200 en NGS al 1% en PBS durante toda la noche a 4°C; procedimiento que permite la detección indirecta y amplificada de la señal de la proteína. Al día siguiente se incubó durante 1 hora en una solución del complejo peroxidasa estreptavidina a 37°C. Finalmente, para el desarrollo de color se utilizó una solución que contiene el sustrato diaminobenzidina (DAB), que da un producto de color marrón (kit Elite Rabbit IgG ABC Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.).

#### **4.9.1 Cuantificación de la inmunorreactividad de la CRMP-2.**

La intensidad de la inmunorreactividad de la CRMP-2 se cuantificó en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo con la ayuda del programa computacional de análisis de imagen Image J (Image Processing and Analysis in Java, versión 1.32j; Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE.UU.) que permite analizar diferencias en la intensidad de la inmunorreactividad de las células transformándolas en una escala de grises. En cada hipocampo se contabilizaron 50 células para CA1 y CA3. Los píxeles obtenidos se ordenaron y separaron en cuartiles, clasificando las células en cuatro categorías: con marca muy alta (rango: 115-131), alta (rango: 132-148), moderada (rango: 149-165) y débil (rango: 166-182). Finalmente se aplicó el método H-SCORE que se basa en la sumatoria de la proporción de células que muestran diferentes grados de reactividad:  $(0 \times \text{el \% de células con marca débil}) + (1 \times \text{el \% de células con marca moderada}) + (2 \times \text{el \% de células con marca alta}) + (3 \times \text{el \% de células con marca muy alta}) / \text{número total de células}$  (Araneda, 2006). Para cada animal se evaluaron las células teñidas en al menos tres cortes coronales (6 hipocampos) y se obtuvo un valor promedio por animal y para cada región del hipocampo. Los resultados corresponden al promedio de 4 animales para cada condición.

#### **4.9.2 Cuantificación de la inmunorreactividad del BDNF.**

La intensidad de la inmunorreactividad del BDNF se determinó mediante la captura de la imagen del área CA3 del hipocampo y para su análisis semicuantitativo se utilizó el *software* computacional de análisis de imagen UN-SCAN-IT versión 4.1 para Windows (Silk Scientific Inc, Orem, UT, EE.UU.). Se realizaron mediciones de intensidad de la marca en escala de grises capturadas como píxeles en un área determinada, sustrayendo el ruido de fondo específico para cada área. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la marca específica respecto a la marca total. Para cada animal se evaluaron las áreas inmunorreactivas en al menos tres cortes coronales (6 hipocampos) y se obtuvo un valor promedio por animal y para cada región del hipocampo. Los resultados corresponden al promedio de 4 animales para cada condición.

#### **4.10 Análisis Estadísticos.**

Para el análisis estadístico se usó el test de ANOVA seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls, utilizando el programa computacional estadístico GraphPadPrisma versión 4.0 (GraphPad Software Incorporated).

## **5. RESULTADOS.**

### **5.1 Cambios fisiológicos inducidos por el estrés crónico y por la administración de sertralina.**

En modelos animales de depresión se han utilizado diversos tipos de estrés crónico, como el estrés psicosocial y el estrés por inmovilidad, los cuales llevan a la aparición de características similares a las observadas en sujetos depresivos (Nestler y cols., 2002). Las consecuencias del estrés crónico incluyen alteraciones en la ingesta de alimentos, cambios en los niveles de glucocorticoides y alteraciones en la neurotransmisión.

#### **5.1.1 Reducción en la ganancia de peso corporal.**

Se determinó la ganancia de peso corporal de los animales la semana previa al inicio de los tratamientos; todas las ratas se manipularon de la misma manera durante este periodo. Todos los animales presentaron una ganancia de peso similar (Figura 2A). En el séptimo día los animales se separaron en cuatro grupos y se iniciaron los tratamientos. Los animales expuestos a estrés crónico presentaron una menor ganancia de peso que los animales controles (Figura 2B), siendo esta diferencia significativa a partir del octavo día de tratamiento. La administración del antidepresivo sertralina tanto a animales controles como estresados produjo una leve reducción en la ganancia de peso.

#### **5.1.2 Marcadores asociados a la respuesta al estrés.**

La respuesta al estrés involucra la activación del sistema nervioso simpático y con ello la estimulación de la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) por la médula adrenal. Además, aumenta la actividad del eje HHA promoviendo la secreción de glucocorticoides desde la corteza adrenal (Holsboer y Barden, 1996). En modelos de estrés crónico existen alteraciones en estos marcadores y la magnitud de estos cambios puede dar cuenta de la severidad del estrés.



### **5.1.2.1 Masa de la médula adrenal y contenido de catecolaminas.**

La Tabla 1 muestra la masa de la médula adrenal (mg de tejido húmedo), el contenido de catecolaminas ( $\mu\text{g}$  por médula adrenal) y la concentración de catecolaminas ( $\mu\text{g}$  por mg de médula adrenal). No se observaron cambios importantes en el contenido de catecolaminas ni en la masa de la médula adrenal en las diferentes condiciones. Sin embargo, se observó un muy leve aumento de la masa de la médula adrenal que es concomitante con un leve incremento en el contenido de catecolaminas.

### **5.1.2.2 Niveles séricos de corticosterona.**

Se determinó si los procedimientos experimentales modificaron los niveles séricos de corticosterona realizando una medición cuantitativa mediante un ensayo inmunoenzimático. Las muestras se obtuvieron entre las 10:00 y las 12:00 AM al momento de la eutanasia. No se observaron diferencias importantes en los niveles séricos de corticosterona entre las distintas condiciones (Figura 3).

### **5.1.3 Contenido de neurotransmisores en la corteza prefrontal.**

Se ha propuesto que la depresión está relacionada con una alteración de la neurotransmisión de serotonina y noradrenalina (Nestler y cols., 2002). Sin embargo, no se ha determinado si las variaciones en los niveles de estos neurotransmisores están directamente relacionadas con el curso de la enfermedad y si cambian con el tratamiento farmacológico.

#### **5.1.3.1 Contenido de serotonina (5-HT) y de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) en la corteza prefrontal.**

Mediante HPLC acoplada a detección amperométrica se determinó el contenido de la 5-HT y del 5-HIAA, metabolito de la 5-HT producido por la monoaminoxidasa A. Las mediciones se realizaron en la corteza prefrontal por corresponder a una estructura que recibe numerosas aferencias desde el núcleo dorsal del *raphe*, agrupación de somas que distribuye difusamente la serotonina a varias zonas del cerebro, entre ellas la corteza.





Hubo un leve aumento de los niveles 5-HT (Figura 4A), 5-HIA (Figura 4B) y 5-HT más 5-HIA (Figura 4C) en los animales estresados y que recibieron inyecciones de sertralina respecto a los animales estresados. Se observó un leve incremento en la razón entre el contenido de 5-HIA y 5-HT en los animales tratados con sertralina y/o estresados con respecto a los animales controles (Figura 4D).

### **5.1.3.2 Contenido de dopamina (DA) y de noradrenalina (NA) en la corteza prefrontal.**

Mediante la misma metodología se evaluó el contenido de DA y de NA en la corteza prefrontal con el objeto de determinar cambios promovidos por el estrés crónico o por la administración de sertralina. Las mediciones se realizaron en la corteza prefrontal porque esta estructura también recibe aferencias desde el núcleo *locus ceruleus*, zona donde se originan los somas de las neuronas noradrenérgicas y del área tegmental ventral, zona de origen de la innervación dopaminérgica mesocortical. No se observaron cambios significativos en el contenido de DA y NA entre las distintas condiciones experimentales (Figura 5). Sin embargo, se registró un leve incremento en el contenido de DA en los animales no estresados que recibieron sertralina al compararlos con los otros grupos. También se observó un leve incremento de NA en los animales estresados crónicamente respecto a los otros grupos, aunque estas diferencias no resultaron ser significativas.

## **5.2 Cambios conductuales inducidos por el estrés crónico y por la administración de sertralina.**

El estado depresivo se manifiesta en signos que pueden variar una persona a otra. En sujetos depresivos se han observado dificultades en la capacidad de concentración, problemas en la adquisición de memoria y aprendizaje e incapacidad para responder a estímulos placenteros (anhedonia). Algunos de estos signos se observan en modelos animales de depresión y pueden ser evaluados en forma objetiva mediante pruebas conductuales (Geyer y Markou, 2000).





### **5.2.1 Anhedonia.**

Se determinó la condición de anhedonia, o pérdida en la reactividad a estímulos placenteros, mediante una prueba que evalúa la reducción en la preferencia por el consumo de una solución de sacarosa al 1% como líquido de bebida. En el día previo al inicio de los tratamientos (día 0) todos los animales mostraron una preferencia similar por la solución de sacarosa al 1% (Figura 6). Luego de 7 y 14 días de estrés crónico se observó una reducción significativa (60% y 50% respectivamente) de la preferencia por la solución de sacarosa al 1% con respecto a los animales controles, efecto que fue anulado por la administración repetida de la sertralina.

### **5.2.2 Adquisición de respuestas condicionadas.**

La alteración de los procesos cognitivos, que es un signo clásico del cuadro depresivo, se puede evaluar en animales de experimentación mediante la prueba de evitación activa. En esta prueba se determina la capacidad del animal para asociar un estímulo aversivo (choque eléctrico en las patas) con un estímulo sensorial (sonido), proceso que se llama condicionamiento y que se cuantifica como el porcentaje en la adquisición de respuestas condicionadas (% de ARC). Los animales controles presentaron un 30% de ARC (Figura 7) y los animales estresados crónicamente presentaron un 10% de ARC, reducción que fue impedida por la administración de sertralina (20% de ARC). Además, la administración de sertralina a animales sin estresar produjo una reducción a un 20% de ARC.

### **5.2.3 Incapacidad para responder a estímulos aversivos: la desesperanza aprendida.**

La desesperanza aprendida corresponde a una condición en la cual los acontecimientos son percibidos como incontrolables no pudiendo hacer nada para cambiarlos (Maier, 1984). Este estado es característico de sujetos depresivos y en modelos animales; esta conducta se puede evaluar en la prueba de evitación activa y en la prueba de natación forzada.





### **5.2.3.1 Fallas en el escape.**

En la prueba de evitación activa se determinó la incapacidad de los animales para responder en forma activa a un estímulo aversivo (el choque eléctrico en las patas) medido como el porcentaje en las fallas en el escape (% de FE), determinación que se interpreta como una medida de desesperanza aprendida. Los animales controles presentaron un 2% de FE y los animales estresados un 21% de FE (Figura 8), incremento que fue impedida por la administración de sertralina ( 7% de FE).

### **5.2.3.2 Inmovilidad.**

En la prueba de natación forzada se pone al animal en un cilindro con agua (estímulo aversivo) para determinar las conductas de escape como natación y escalamiento, y la conducta de inmovilidad. El aumento de inmovilidad es un indicador de la desesperanza aprendida. Los animales estresados presentaron un incremento en el tiempo de inmovilidad (127 s) al compararlos con el grupo control (78 s) (Figura 9), incremento que ocurrió a expensas de una disminución en el tiempo de escalamiento. El aumento en el tiempo de inmovilidad fue abolido por la administración de sertralina (65 s) y consecuentemente se observó un incremento en el tiempo de natación.

## **5.3 Cambios moleculares inducidos por el estrés crónico y por la administración de sertralina.**

Se ha sugerido que los cambios en los niveles de proteínas relacionadas con la formación y la estabilización de las sinapsis podrían dar cuenta de los cambios conductuales que se observan en sujetos depresivos (Castren, 2005). El BDNF es un péptido que al unirse a su receptor promueve mecanismos neuroprotectores (Duman y Monteggia, 2006). Se ha sugerido que el BDNF modula la actividad de la CRMP-2, una proteína que se ha asociado a la modulación del citoesqueleto neuronal, pudiendo ser otro de los mecanismos asociados a la neuroprotección del BDNF (Yoshimura y cols., 2005).





### **5.3.1 Inmunorreactividad del BDNF en el hipocampo.**

Se ha descrito que la inmunorreactividad para el BDNF se distribuye extensamente, localizándose en somas, dendritas y fibras (Tapia-Arancibia y cols., 2004). La inmunorreactividad del BDNF en el hipocampo de rata se observó principalmente en la región adyacente al área CA3 (stratum oriens), en el área CA4 y en las zonas subgranulares (bandas internas) del giro dentado (Figura 10). Mediante inmunohistoquímica se determinó si el estrés crónico y el tratamiento con sertralina produjeron cambios en la inmunorreactividad del BDNF. La Figura 11A muestra una microfotografía representativa de la inmunorreactividad del BDNF en el área CA3 del hipocampo y la magnificación muestra que la inmunorreactividad está presente pericelularmente. La intensidad de la inmunorreactividad del BDNF fue determinada cuantificando los pixeles de microfotografías con un programa computacional que transforma la intensidad de la inmunorreactividad en pixeles. La inmunorreactividad del BDNF en el área CA3 del hipocampo no se modificó por estrés crónico ni por la administración repetida de sertralina (Figura 11B).

### **5.3.2 Niveles de la CRMP-2 en el hipocampo.**

A partir de ensayos *in vitro* se ha sugerido que la CRMP-2 está asociada a la elongación y retracción del axón (Yoshimura y cols., 2006). Asimismo, estudios de proteómica han indicado que la CRMP-2 podría estar relacionada con eventos asociados a la acción de fármacos antidepresivos (Khawaja y cols., 2004).

#### **5.3.2.1 Niveles de la CRMP-2 en extracto de hipocampo.**

Mediante *western* se determinó si los tratamientos experimentales produjeron cambios en los niveles de la CRMP-2 en homogeneizados de hipocampo (Figura 12A). Se cuantificó la intensidad de los pixeles de las bandas inmunorreactivas de la CRMP-2 y de la CRMP-2 no fosforilada (P-CRMP-2) y se normalizó con respecto a la intensidad de los pixeles de la banda inmunorreactiva para la  $\beta$ -actina (Figuras 12C y 12D).







Se observó que el estrés crónico produjo un leve aumento, aunque no significativo, de la CRMP-2 total (suma de CRMP-2 y P-CRMP-2) (Figura 12B). La cuantificación de la CRMP-2 sigue la misma tendencia de la cuantificación de la CRMP-2 total (Figura 12C). No se observaron cambios en los valores de la P-CRMP-2 (Figura 12D). Se ha propuesto que la forma no fosforilada de la CRMP-2 corresponde a la proteína activa, siendo el cociente entre la P-CRMP-2 y la CRMP-2 un reflejo de la cuantía de su actividad. Aunque el estrés produjo un leve descenso en este valor (Figura 12E) los cambios no son significativos.

#### **5.3.2.2 Distribución de la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el hipocampo.**

Mediante inmunohistoquímica se evaluó si el estrés crónico y el tratamiento con sertralina producen cambios en la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el hipocampo. La intensidad de la inmunorreactividad de la CRMP-2 se determinó mediante la captura de la imagen en la región de interés y su análisis mediante un programa computacional que transforma la intensidad de la marca de cada célula en píxeles. Las intensidades de las células se separaron en cuartiles, y se determinó la frecuencia de células en cada rango de intensidad (muy alta, alta, moderada y débil). Finalmente se aplicó el método H-SCORE que se basa en la sumatoria ponderada de la proporción de células de diferentes grados de reactividad. La distribución de la CRMP-2 no es homogénea en el hipocampo (Figura 13A) siendo el doble en las regiones del CA respecto al GD (Figura 13B). Los análisis posteriores se realizaron en las zonas CA1 y CA3 del hipocampo porque son importantes en los procesos de neuroplasticidad, siendo la zona CA3 vulnerable en la depresión.

#### **5.3.2.3 Inmunorreactividad de la CRMP-2 en el área CA1 del hipocampo.**

La inmunorreactividad de la CRMP-2 se distingue principalmente en el soma de las neuronas del área CA1 del hipocampo (Figura 14A). Se observó una disminución en la inmunorreactividad de la CRMP-2 en los animales estresados, pero las diferencias no son significativas porque el método del H-SCORE no permite apreciar las diferencias de





marca en los rangos moderado y débil (Figura 14B): en la fórmula se multiplica por 1 y por 0 respectivamente el número con esas intensidades, subestimando estos valores. Por esta razón se realizó un análisis del número de células pertenecientes a los rangos de marca muy alta, alta, moderada y débil (Figura 14C). Los animales controles presentaron una distribución homogénea de células en el rango muy alto, alto y moderado. En los animales sometidos a estrés crónico se observó un aumento en la proporción de células menos inmunorreactivas con respecto a los animales controles, efecto que no fue modificado por la administración de sertralina.

#### **5.3.2.4 Inmunorreactividad de la CRMP-2 en el área CA3 del hipocampo.**

La inmunorreactividad de la CRMP-2 se distingue principalmente en el soma de las neuronas en el área CA3 del hipocampo (Figura 15A), sin embargo se ve una leve inmunorreactividad en el stratum oriens. Se observó una disminución en la inmunorreactividad de la CRMP-2 en los animales estresados crónicamente, pero las diferencias no son significativas porque el método del H-SCORE no permite apreciar las diferencias de marca en los rangos moderado y débil (Figura 15B). Por esta razón se realizó un análisis del número de células en los rangos de marca muy alta, alta, moderada y débil (Figura 15C). Los animales controles presentaron una distribución homogénea de células en el rango muy alto, alto y moderado. En los animales sometidos a estrés crónico se observó un aumento en la proporción de células menos inmunorreactivas con respecto a los animales controles, efecto que fue modificado por la administración de sertralina.



## **6. DISCUSIÓN.**

### **6.1 El modelo animal de restricción de movimiento.**

El modelo de estrés crónico por restricción de movimiento tiene una confiabilidad moderada pues en distintos laboratorios se han observado cambios que no siempre aparecen en la misma dirección. Estas diferencias se pueden atribuir a los procedimientos y condiciones con que se efectúan los experimentos (Gregus y cols., 2005). Además no todos los trabajos se realizan en el mismo período de tiempo porque no existe un acuerdo general en la escala de tiempo en que se debe trabajar. Los efectos que se ven en una ventana temporal pueden ser diferentes de los observados en otra y además, tratándose de roedores, es probable que a cierto período del tratamiento empiecen a operar mecanismos adaptativos normales en estos animales (Gregus y cols., 2005). De hecho, en nuestro laboratorio se ha observado que los animales sometidos a estrés por restricción de movimiento presentan manifestaciones de desagrado en los primeros 14 días del protocolo de estrés, a través de vocalizaciones y de excrementos. Sin embargo, si el experimento se extiende por un período de 21 días estos efectos son menos pronunciados e incluso en algunos casos se han observado ratas durmiendo en el restrictor (datos no publicados). Otra observación importante es que en este modelo se produce atrofia dendrítica en el área CA3 del hipocampo en un protocolo similar, pero de mayor duración (Watanabe y cols., 1992). Este efecto en el hipocampo podría ser análogo a la pérdida del volumen hipocampal que se observa en sujetos depresivos y que al parecer esta relacionada con ciertas disfunciones en el desempeño cognitivo que caracterizan a esta enfermedad (Frodl y cols., 2006).

En el modelo que se utilizó en esta memoria se limitó el movimiento de las ratas 2,5 horas diarias durante 14 días. Se observaron cambios fisiológicos como la disminución en la ganancia de peso y no se observaron otros como el incremento de la masa de la glándula adrenal y un alza de corticosterona, sugiriendo que el estrés aplicado no es tan severo como en otros modelos de estrés crónico. Además, no se observaron cambios en

el contenido de las monoaminas 5-HT, DA y NA en corteza prefrontal, aunque de acuerdo a la literatura los niveles de neurotransmisores pueden ser muy variables (Torres y cols., 2002; Zangen y cols., 1999; Sortwell y Sagen, 1993). La exposición a estrés crónico por restricción de movimiento provoca cambios en la adquisición de respuestas condicionadas, en la conducta asociada a la anhedonia y en conductas asociadas a la desesperanza aprendida, cambios que son impedidos por la administración del antidepresivo sertralina. Los cambios en la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el hipocampo sugieren que hay modificaciones morfológicas asociadas a las alteraciones conductuales que se observaron.

## **6.2 Reducción en la ganancia de peso corporal.**

Según el Manual de Diagnóstico y Estadística de las Enfermedades Mentales, DMS-IV (APA, 1994), los sujetos depresivos presentan una pérdida o una ganancia significativa de peso. La variación en el sentido en que se producen estos cambios sugiere que hay diferentes endofenotipos de la enfermedad que probablemente estén asociados a la modulación de distintas zonas cerebrales (por ejemplo los centros del apetito o los centros de la saciedad) (Nestler y Carlezon, 2006). En los estudios en modelos animales de estrés crónico se ha observado una disminución en la ganancia de peso corporal, y en algunos casos no se han observado cambios en este parámetro. A pesar de las diferencias generales entre varios modelos, el estrés crónico por restricción de movimiento siempre produce una disminución en la ganancia de peso corporal (Gregus y cols., 2005). Para explicar este efecto existen dos hipótesis. El animal disminuye su ingesta de alimentos o gana menos peso pese a la ingesta normal de alimentos (Marti y cols., 1994).

La primera hipótesis ha encontrado apoyo en estudios que sugieren que hay una alteración del apetito de los animales expuestos a estrés (Marti y cols., 1994). Así mismo se ha sugerido que la menor ingesta de alimentos esta mediada por zonas del hipotálamo, una estructura subcortical que coordina muchas funciones vegetativas, entre ellas el

apetito (Smagin y cols., 1999). Se ha observado que la administración intracerebral de un antagonista de CRF en zonas adyacentes al tercer ventrículo es capaz de impedir la pérdida de apetito y la menor ganancia de peso corporal de animales que han sido estresados por restricción de movimiento por 3 horas diarias durante 3 días (Smagin y cols., 1999). Aunque se sugiere que los cambios se producen por una alteración del apetito, se debe tener en cuenta que la activación de receptores de CRF en el hipotálamo puede provocar una serie de eventos que llevan a una alteración del equilibrio metabólico lo cual puede determinar cambios en el peso del animal sin provocar cambios en su apetito. De hecho durante el estrés hay activación del eje HHA, cambios en los sistemas serotoninérgicos, catecolaminérgicos y activación del sistema simpático, cambios que podrían ser precursores de alteraciones en la actividad metabólica de las ratas (Hayley y cols., 2005). Cabe destacar que en esta memoria los animales que se estresaron por restricción de movimiento presentaron excrementos más líquidos (y tal vez más numerosos, aunque esto no se puede verificar porque el trabajo con los animales ocupaba sólo una parte de la mañana) sugiriendo que podrían existir cambios fisiológicos en el animal que le pueden llevar a defecar más, y por consiguiente adquirir menos peso. Por lo tanto es necesario hacer un estudio más profundo de los mecanismos fisiopatológicos que llevan a la pérdida en la ganancia de peso de estos animales en este modelo en particular, estudiando quizás los circuitos cerebrales relacionados con el apetito y algunos marcadores del metabolismo del animal.

Por otro lado, la leve reducción en la ganancia de peso que se produce en animales que recibieron inyecciones de sertralina, y la incapacidad del mismo tratamiento de impedir la reducción en la ganancia de peso en animales estresados está de acuerdo con los efectos anorexigénicos que se han reportado para la sertralina y para otros ISRS como la fluoxetina (Nielsen y cols., 1992). En estos estudios en los animales tratados con sertralina se observó una disminución en el tiempo que pasaban las ratas alimentándose y en la ganancia de peso corporal. (Nielsen y cols., 1992). El aumento de la neurotransmisión serotoninérgica a través de fármacos agonistas, de inhibidores de la

recaptación de este neurotransmisor o de inhibidores de su catabolismo producen hipofagia y por ello se ha propuesto que los efectos de los ISRS como fluoxetina y sertralina están mediados por vías serotoninérgicas centrales (Nielsen y cols., 1992).

### **6.3 Marcadores de estrés.**

La respuesta a estrés involucra, entre otros sistemas, una activación del eje HHA y del eje simpático-adrenal. Sus efectores finales, los glucocorticoides y las catecolaminas, tienen acciones complementarias en la movilización de las reservas energéticas y en la regulación de la presión arterial, entre otras funciones (Ulrich-Lai y cols., 2006). Pero, si el estrés que lo origina se vuelve persistente o es muy grande se producen alteraciones endocrinas y nerviosas que impiden una respuesta normal, siendo uno de los factores importantes en la generación del cuadro depresivo. En la mitad de los sujetos depresivos se ha observado un incremento en los niveles de cortisol (Holsboer y Barden, 1996) y algunos, un aumento de la masa de la médula adrenal (Maas y cols., 1994).

En el modelo animal de depresión de esta memoria los niveles séricos de corticosterona estuvieron en un rango de 5-10  $\mu\text{g}$  de hormona/dL de suero. Estos valores fueron muy variables, pero en promedio no cambiaron entre las distintas condiciones experimentales; excedieron levemente los valores esperados para los animales controles, rango reportado entre de 1-2  $\mu\text{g}$  de hormona/dL a esa hora de la mañana, pero es posible que la manipulación haya incrementado estos valores. Para los animales estresados estos valores son bajos si se comparan con los obtenidos en otros modelos de estrés crónico, donde se han encontrado niveles tan altos como 20  $\mu\text{g}$  de hormona/dL (Xu y cols., 2006). Estos resultados confirman que el estrés que se utilizó en este trabajo es un estrés moderado. Esta explicación es apoyada por los resultados obtenidos al analizar los cambios en la masa de las médulas adrenales y el contenido de catecolamina que, si bien aumentaron levemente, se mantuvieron en un rango similar.

Los valores de corticosterona que se obtuvieron corresponden a niveles plasmáticos al final del protocolo de estrés y sería necesario analizar los cambios a diferentes tiempos a lo largo de los experimentos para determinar si este estrés es capaz de alterar los ritmos circadianos normales de secreción de corticosterona. Esto es importante porque se ha observado que la alteración del ritmo de secreción, más que el nivel de la hormona a un determinado tiempo, es lo que lleva a los cambios observados en sujetos depresivos (Schule y cols., 2003).

#### **6.4 Contenido de serotonina, ácido 5-hidroxi-indolacético, dopamina y noradrenalina en la corteza prefrontal.**

La idea original de la hipótesis monoaminérgica de la depresión se basó en la evidencia farmacológica que sugería indirectamente que hay una deficiencia en la neurotransmisión de monoaminas, especialmente serotonina y noradrenalina en el sistema nervioso central de sujetos depresivos (Castren, 2005). Aunque se han informado alteraciones de los sistemas monoaminérgicos durante el curso de la enfermedad y en la terapia farmacológica, en realidad no se han estudiado los niveles de los neurotransmisores en las estructuras cerebrales que son afectadas en la depresión (corteza prefrontal, hipocampo), sino que se han hecho mediciones indirectas analizando los niveles de monoaminas en el líquido cefalorraquídeo y en el plasma sanguíneo (Sortwell y Sagen, 1993). En modelos animales las investigaciones no son abundantes y presentan resultados variables, lo que probablemente refleja la diversidad de cambios que podrían encontrarse en sujetos depresivos.

En esta memoria se estudió el contenido de 5-HT, 5-HIAA, DA y NA en la corteza prefrontal porque, como el hipocampo, esta estructura anatómica se relaciona con funciones que se alteran durante el cuadro depresivo. La corteza prefrontal está asociada a funciones de integración complejas y se relaciona con distintas funciones emocionales y cognitivas recibiendo numerosas aferencias difusas noradrenérgicas desde el *locus*

*coeruleus*, serotoninérgicas desde el núcleo del *raphe* y dopaminérgicas desde el área tegmental ventral. Los niveles de los neurotransmisores en la corteza prefrontal podría indicar el estado de actividad general de los distintos núcleos. Se encontró que los niveles de 5-HT y de 5-HIAA fueron similares en todas las condiciones. El leve aumento de 5-HIAA en los animales estresados y que recibieron inyecciones de sertralina podría estar relacionado con la inhibición de la recaptación de 5-HT por la sertralina, pues al inhibirse la recaptación, aumentan los niveles de 5-HT que podría degradarse. Consecuentemente, los niveles de la suma de 5-HT y 5-HIAA muestran que, si bien se mantienen niveles similares en todas las condiciones, hay un leve aumento en los animales estresados tratados con sertralina, lo que tal vez también esté asociado a un leve aumento de la síntesis total de 5-HT. En estudios *in vitro* se ha observado que la sertralina produce un incremento de los niveles de la triptofano hidroxilasa, la enzima responsable de la síntesis de este neurotransmisor (Kim y cols., 2002), sugiriendo una activación de esta enzima. La ausencia de este efecto en los animales que sólo recibieron sertralina podría dar cuenta del hecho de que los antidepresivos sólo ejercen sus efectos benéficos en sujetos con una patología presente (Gelfin y cols., 1998). La actividad serotoninérgica se analiza estudiando su tasa de recambio y se expresa como la razón 5-HIAA/5HT. Si este valor aumenta significa que hay una mayor cantidad de 5-HT que es liberado y que puede producir incremento de su metabolito (Torres y cols., 2002). Este valor aumenta, pero no significativamente, en todas las condiciones con respecto al grupo control. El leve aumento de la actividad serotoninérgica en los animales estresados podría estar relacionado con una activación de los sistemas nerviosos responsables de la respuesta a estrés. Se ha observado que el estrés agudo activa el sistema serotoninérgico, incrementando la tasa de descarga de estas neuronas, resultando en un aumento de la liberación y un incremento de la tasa de recambio (Torres y cols., 2002; Inoue y cols., 1994). Así mismo se ha observado un aumento de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en hipocampo por estrés agudo (Graeff y cols., 1996). Sin embargo, en estrés crónico, así como en la depresión, parece ocurrir lo contrario. En estudios postmortem en sujetos depresivos se ha observado una disminución del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en

hipocampo (Graeff y cols., 1996) y en modelos animales de estrés crónico se reduce la actividad de este receptor, especialmente en el hipocampo, lo que podría reflejar una alteración en esta neurotransmisión (Torres y cols., 2002). Los resultados en esta memoria sugieren que el leve aumento en la actividad serotoninérgica en la condición de estrés puede reflejar los cambios de actividad neuronal en una ventana temporal donde tal vez todavía están operando mecanismos adaptativos que eventualmente pueden desaparecer a más largo plazo, pudiendo reflejarse más tarde en variaciones en la síntesis y secreción de neurotransmisores. A diferencia de esto, los efectos que se observan en los animales que recibieron sertralina pueden ser el producto combinado del estrés y de cambios producidos por el efecto de la activación de la síntesis de la 5-HT. Estos resultados no parecen tan sorprendentes. La línea de ratas sensibles Flinders (FSL), corresponde a un grupo de animales que por selección de fenotipos exhiben características similares a la depresión (locomoción retardada, anhedonia, aumento del sueño REM, y dificultades cognitivas) (Zangen y cols., 1999). En la corteza prefrontal de estos animales se ha reportado un aumento de los niveles de NA, DA y 5-HT y en hipocampo un aumento de NA y DA, valores que son normalizados con la administración del antidepresivo desipramina (un ISRN) (Zangen y cols., 1999). Por otro lado, en un estudio de estrés crónico por restricción de movimiento de 1 hr diaria, 5 días a la semana por 40 días, no se observaron cambios importantes de 5-HT y 5-HIAA en corteza prefrontal, pero en el hipocampo se observó una reducción de la serotonina (Torres y cols., 2002). Esto sugiere que los cambios que se observaron en corteza prefrontal no necesariamente reflejan los cambios en la neurotransmisión serotoninérgica en hipocampo. En nuestro modelo es recomendable hacer estudios del contenido de neurotransmisores en el hipocampo, para analizar cambios específicos en esta zona, y otras estructuras, como la amígdala y el hipotálamo, que efectivamente pueden modular la actividad de distintos centros neuronales que llegan a la corteza prefrontal y al hipocampo.

En los análisis de la DA y NA la medición de algunos metabolitos no se pudo efectuar porque el procedimiento de cuantificación implica una etapa de concentración y purificación a través de un protocolo de adsorción en alúmina. Este método permite la retención de aquellas moléculas con el anillo catecol, perdiéndose aquellas que no lo poseen, como el ácido homovanílico, metabolito de la DA y el 3-metoxi-4-hidroxi-mandélico, metabolito de la NA. Además, otras moléculas que sí se podrían haber cuantificado, como el ácido dihidroxifenilacético, metabolito de la DA, no se determinaron por problemas metodológicos.

El contenido de DA se mantuvo constante, aunque aumentó levemente en los animales que sólo recibieron sertralina. Al igual que en la neurotransmisión serotoninérgica, se ha observado que la actividad dopaminérgica se incrementa en condiciones de estrés agudo, y disminuye en estrés crónico (Torres y cols., 2002). Esto sugiere que los leves cambios producidos por el estrés en el contenido de 5-HT en esta memoria no tiene correspondencia con variaciones en el contenido de DA, aunque esta propuesta debe ser verificada analizando los metabolitos de este neurotransmisor. El aumento del contenido de DA en los animales que sólo reciben sertralina podría ser explicada por una leve actividad inhibitoria de este fármaco sobre el transportador de DA (DAT) (Muijsers y cols., 2002), pero curiosamente este efecto no se observa en animales estresados y tratados con la sertralina. Para una mejor comprensión de estos resultados deben ser analizados en conjunto los niveles de la DA y de sus metabolitos. Los niveles en el contenido de NA también se mantuvieron constantes, excepto para la condición de estrés, donde se observó un incremento que no logró ser significativo probablemente por su grado de dispersión. El aumento en el contenido de NA puede reflejar la activación simpática que presentan algunos animales en respuesta al estrés (Ulrich-Lai y cols., 2006). La ausencia de este efecto en los animales que además recibieron sertralina puede indicar algún efecto indirecto de la neurotransmisión serotoninérgica sobre la noradrenérgica, aunque se debe evaluar si estos cambios se correlacionan con variaciones en el contenido de los metabolitos. Estas observaciones sugieren que, si bien

es innegable la participación de estos neurotransmisores en la patología depresiva, en modelos animales de estrés y otros como el FSL se han encontrado una variedad de resultados que hace difícil llegar a un consenso sobre la variación en los niveles de neurotransmisores y a su vez qué ocurre cuando se interviene con un antidepresivo. Los resultados de esta parte de la memoria sugieren que no hay correlación directa entre la alteración de los sistemas serotoninérgicos y los cambios conductuales encontrados en este modelo (ver más adelante). La diversidad de efectos que se observan en modelos de depresión indica que los cambios en la actividad neuroquímica pueden ser un efecto secundario de la depresión y no su principal causa y se podría proponer que los efectos farmacológicos que ejercen los antidepresivos serían más complejos que la simple regulación de la neurotransmisión, pero que se inician modificando este proceso. Por otro lado, puede haber cambios en zonas tan reducidas en las distintas estructuras cerebrales que sea difícil detectarlas, de modo que sería necesario analizar algo más que el contenido. En este sentido estos resultados se verían complementados con estudios que analicen la velocidad de síntesis y liberación de los neurotransmisores. La administración de sertralina a animales estresados produjo un leve aumento de los niveles de 5-HT y de 5-HIAA y sería interesante conocer los mecanismos por los cuales procede este cambio.

## **6.5 Anhedonia.**

Una de las características de un sujeto depresivo es una disminución de interés o placer por las actividades diarias (APA, 1994). La anhedonia, o la pérdida de la capacidad para experimentar placer o para responder afectivamente a la anticipación del placer, es una condición que ha sido utilizada para evaluar si en un modelo animal se genera una conducta similar a la depresión (Matthews y cols., 2005). Algunos autores han reportado que la medición del consumo de una solución azucarada es una medición confiable de la conducta anhedónica en un modelo de estrés crónico (Li y cols., 2007). En el modelo que se utiliza en esta memoria se observó que los animales expuestos a estrés crónico

tienen una reducción en la preferencia por la solución de sacarosa al 1%, efecto que ya era observable a los 7 días de estrés crónico. El tratamiento con el antidepresivo sertralina es capaz de impedir este efecto. A pesar del masivo uso de esta prueba para validar un estado anhedónico en modelos con conducta similar a la depresión, hay autores que no han observado cambios en la ingesta de la solución azucarada, o más bien atribuyen la menor ingesta a factores como una mayor inapetencia generalizada (Geyer y Markou, 2000), de modo que esta prueba debe ser complementada con otras para asegurar su validez.

## **6.6 Adquisición de respuestas condicionadas.**

Los pacientes con depresión presentan dificultades para concentrarse y pensar, funciones que están relacionadas con estructuras cerebrales como la corteza frontal y el hipocampo (Nestler y cols., 2002). En estudios postmortem se ha observado que pacientes depresivos presentan pérdida de neuronas y glías en la corteza cerebral (Popoli y cols., 2002), sugiriendo que hay cambios morfológicos que podrían dar cuenta de estas alteraciones conductuales.

En estudios en animales existen mediciones para evaluar el aprendizaje, siendo un ejemplo de esto, la prueba de evitación activa. En esta prueba se mide un tipo de aprendizaje basado en la asociación entre dos estímulos (condicionamiento), definiéndose una ARC cuando el animal escapa de un compartimiento al otro cuando escucha el sonido. Los animales estresados crónicamente presentaron un menor porcentaje de ARC que los animales controles. Estos efectos parecen no estar mediados por los glucocorticoides, pues se ha observado que la administración crónica de corticosterona no modifica el porcentaje de ARC (Berríos, 2007), lo que sugiere que el alza de los glucocorticoides por sí sola no explica el deterioro cognitivo producido por el estrés crónico. La disminución de la ARC por el estrés crónico es impedida por la administración de sertralina, pero, la recuperación en la ARC se logra hasta un nivel que

es similar al nivel observado cuando se administra la sertralina a animales controles. Este nivel de ARC difiere significativamente de los animales controles, sugiriendo que la sertralina puede afectar la adquisición de memoria de animales normales y que, aunque mejora la ARC en animales estresados crónicamente, no logra la recuperación completa debido a efectos propios de la sertralina. De hecho, algunos estudios demuestran efectos deletéreos de los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina sobre algunos aspectos de la memoria (Wadsworth y cols., 2005). Sería interesante conocer qué tipo de memoria es afectada por este tipo de estrés.

#### **6.7 Desesperanza aprendida.**

Una de las características más descritas en la literatura en los modelos animales de depresión es la incapacidad de los animales de responder adecuadamente para evitar un estímulo nocivo al que ya habían sido expuestos anteriormente. Esta condición, conocida como desesperanza aprendida, se produce cuando el animal ha aprendido a percibir que sus acciones son inútiles, que los acontecimientos aversivos son incontrolables y no se puede hacer nada para cambiarlos, siendo una condición similar al desamparo que se observa en sujetos depresivos (Maier, 1984). Esta condición produce un rápido deterioro que impide responder de forma adaptativa a una situación traumática o iniciar respuestas voluntarias para ejercer control sobre los acontecimientos (Maier, 1984). En la prueba de evitación activa la medición de la fallas en el escape permite determinar la condición de desesperanza aprendida, pues se observa que el animal no responde ante una situación que normalmente evitaría (el dolor provocado por la descarga eléctrica).

En este estudio los animales estresados crónicamente presentaron un aumento de 10 veces en el porcentaje de FE comparado con los animales controles, siendo un efecto impedido por la administración de sertralina. En la prueba de natación forzada también se mide la condición de desesperanza aprendida, pero en esta prueba los animales son colocados en un recipiente con agua del cual no pueden escapar y durante un periodo de

tiempo durante el cual despliegan actividad motora y luego permanecen inmóviles. Esta última conducta se ha asociado a la condición de desesperanza aprendida y se ha observado un acortamiento del periodo de inmovilidad en animales que han sido tratados con antidepresivos (Cryan y cols., 2005). Los animales estresados crónicamente presentaron un aumento en el tiempo de inmovilidad comparado con los animales controles, siendo un efecto impedido por la administración de sertralina. La desesperanza aprendida es una condición ampliamente usada para determinar conductas similares a la depresión en modelos animales. Aunque no se ha establecido a través de qué mecanismos neurofisiológicos se produce esta condición, algunos trabajos han propuesto la participación de la neurotransmisión noradrenérgica y serotoninérgica (Zazpe y cols., 2007). Otros estudios sugieren que la vía VTA-NAc (área tegmental ventral-núcleo accumbens), cuyo principal neurotransmisor es la dopamina, podría estar relacionada con la condición de desesperanza aprendida, así como con la anhedonia. De hecho, se ha observado que el tratamiento con antidepresivos puede alterar la actividad dopaminérgica en el VTA y en estructuras inervadas por el VTA. Los fármacos que promueven la función dopaminérgica como la bupropiona -un inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina y dopamina- y la nomifensina -un inhibidor selectivo de la dopamina- funcionan como antidepresivos, sugiriendo que la modulación dopaminérgica podría ser uno de los efectos de otros antidepresivos (Nestler y Carlezon, 2006). De hecho la sertralina posee una pequeña actividad dopaminérgica (Muijsers y cols., 2002) y tal vez algunos de sus efectos antidepresivos cursen a través de esta vía. Por otro lado, en estudios hechos en nuestro laboratorio la administración de corticosterona a animales produjo los mismos efectos que el estrés crónico cuando se determinó la condición de desesperanza aprendida en las pruebas de evitación activa y en la prueba de natación forzada, aunque se observó una menor magnitud en el incremento de las fallas de escape. En estos animales, la administración del antidepresivo sertralina no llevó a niveles tan similares a los animales controles, como los que se observan cuando se administra el antidepresivo a animales estresados, sugiriendo que la acción antidepresiva está asociada a otros cambios no relacionados con la normalización de glucocorticoides.

## **6.8 Inmunorreactividad del BDNF en el hipocampo.**

La hipótesis neurotrófica postula que la reducción de los niveles cerebrales del BDNF puede contribuir a la atrofia y a la muerte celular en hipocampo y en corteza prefrontal observada en sujetos depresivos, mientras que los antidepresivos ejercen sus efectos terapéuticos incrementando los niveles del BDNF, llevando a la reversión de la atrofia neuronal y la muerte celular (Duman y Monteggia, 2006).

En esta memoria se estudiaron cambios en los niveles del BDNF mediante un análisis histoquímico en cortes coronales de hipocampo y, aunque se ha reportado que la inmunorreactividad para esta proteína está presente en el soma y en las proyecciones neuronales (Tapia-Arancibia y cols., 2004), en este estudio se observó inmunorreactividad en las fibras adyacentes al área CA3 (stratum oriens), en el área CA4 y en las capas subgranulares de las zonas suprapiramidal e infrapiramidal del giro dentado. El análisis posterior se centró en los cambios en la zona adyacente al área CA3 pues en esta zona se han observado cambios morfológicos (retracción de dendritas apicales) en modelos animales de depresión (Magarinos y McEwen, 1995), observándose que en todas las condiciones experimentales existe una inmunorreactividad similar para el BDNF. Este resultado muestra una aparente discordancia con los trabajos que han establecido que la disminución de esta neurotrofina producto del estrés debe ser revertido para que los antidepresivos lleven a cabo sus acciones terapéuticas, sin embargo, estos estudios no han tomado en consideración algunos detalles. La mayoría de los estudios solamente han correlacionado los niveles totales del ARNm del BDNF, sin considerar que el gen del BDNF tiene una estructura compleja, donde el uso de distintos promotores y el procesamiento alternativo del mismo ARNm, pueden generar distintos transcritos. En estudios recientes en rata se ha determinado que los antidepresivos parecen actuar selectivamente en algunos promotores, pero no en otros (Dias y cols., 2003) quedando por determinar cuáles transcritos del BDNF están asociados a la depresión y a la respuesta clínica de otros antidepresivos (Martinowich y cols., 2007). Además se debe considerar que los distintos

transcritos son expresados diferencialmente en los distintos tejidos, en diferentes tipos celulares e incluso en diferentes partes de la neurona, sugiriendo que puede haber cambios específicos que todavía no se han estudiado (Pattabiraman y cols., 2005). Por otro lado, aunque algunos pocos estudios han mostrado que la infusión directa del BDNF en hipocampo puede producir efectos antidepresivos en roedores (Shirayama y cols., 2002), no se ha considerado que todas las neurotrofinas emergen de proneurotrofinas (en este caso, proBDNF) las cuales son proteolíticamente clivadas para producir la proteína madura (en este caso, mBDNF), indicando que los niveles totales no necesariamente se relacionan con una acción en particular. Recientemente se ha demostrado que el proBDNF es abundante en cerebro adulto, y que se une preferencialmente al receptor p75NTR (un receptor de baja afinidad para neurotrofinas), a través del cual produce muerte celular por apoptosis en neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, una estructura subcortical del sistema nervioso central, mientras que la neurotrofina madura, a través de su unión al receptor TrkB y la activación de vías de señalización, promueve la supervivencia celular (Volosin y cols., 2006). Estos hallazgos han llevado a la “hipótesis yin-yang” que propone que las neurotrofinas inmaduras y las maduras ejercen efectos biológicos opuestos a través de su unión al receptor p75NTR o el Trk, respectivamente (Lu y cols., 2005). Los modelos animales con una delección del gen del BDNF no muestran un claro fenotipo similar a la depresión (MacQueen y cols., 2001) y se podría argumentar que eliminando los efectos negativos del proBDNF y los efectos positivos del mBDNF sobre el comportamiento depresivo, se elimina cualquier cambio conductual observable. Más aún, hay procesos más allá de la transcripción y la maduración del BDNF que podrían estar alterados, y que podrían dar cuenta de su pérdida funcional, pero que no se han estudiado a fondo. Por ejemplo, se sabe que el BDNF es una neurotrofina cuya secreción puede ser regulada en respuesta a la actividad neuronal (Tapia-Arancibia y cols., 2004) y en un modelo murino que lleva el polimorfismo Val66Met en el gen del BDNF (una modificación que produce un cambio en el aminoácido 66 de valina por metionina) se ha observado que hay una disminución en la secreción dependiente de actividad, mientras que los niveles totales del BDNF, así

como su secreción constitutiva, no cambian (Chen y cols., 2006). En este sentido, ya que en este trabajo se observaron niveles similares de inmunorreactividad del BDNF en las distintas condiciones, sería necesario determinar los niveles específicos del proBDNF y el mBDNF, y además sería interesante determinar los niveles de secreción de la neurotrofina y los niveles del receptor TrkB.

Aún con todos los estudios los datos respecto al rol del BDNF en la depresión aún no son concluyentes. La mutación condicional del BDNF en rata muestra efectos leves e inconsistentes en pruebas que miden conductas similares en la depresión, observándose déficit en la prueba de natación forzada y anhedonia sólo en hembras (Monteggia y cols., 2007). Además, ratones heterocigotos para una delección del gen de BDNF, animales que exhiben bajos niveles de la neurotrofina, tampoco presentan anhedonia ni desesperanza aprendida, recordando que en realidad todavía no existe una evidencia directa de que la alteración de la señalización vía BDNF lleve a un comportamiento similar a la depresión. De hecho en otros trabajos donde se interrumpe la señalización del BDNF, delecionando el TrkB, o sobreexpresando la forma dominante negativa de este receptor, tampoco se logra observar un fenotipo similar a la depresión, advirtiéndose una conducta ansiosa en el último caso (Saarelainen y cols., 2003; Zorner y cols., 2003). Interesantemente el ratón con el polimorfismo Val66Met también mostró un incremento en comportamientos asociados a la ansiedad (Chen y cols., 2006). Esta evidencia cuestiona la sugerencia de que una deficiencia en la señalización en el BDNF es la causa principal de la depresión. En contraste, en los animales con una delección del gen del BDNF o con una sobreexpresión de la forma dominante negativa del TrkB, la administración de antidepresivos no reduce el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada (Saarelainen y cols., 2003). Además, la sobreexpresión del gen del BDNF en el prosencéfalo de animales transgénicos produce efectos ansiosos y antidepresivos (Govindarajan y cols., 2006). Esta evidencia sugiere que si bien la depresión puede no ser gatillada por déficit en la señalización del BDNF, tal vez, si sea necesaria para alguna de las acciones de los antidepresivos.

Entre los efectos del BDNF se ha postulado que podría regular la morfología celular a través de la modulación de la actividad de proteínas reguladoras del citoesqueleto (Yoshimura y cols., 2005). A través de la vía PI3K-Akt-GSK-3 $\beta$ , el BDNF regula la fosforilación de una variedad de proteínas y recientemente se ha observado que podría regular la activación de la CRMP-2 (Yoshimura y cols., 2005).

### **6.9 Inmunorreactividad de la CRMP-2 en el hipocampo.**

Estudios recientes han destacado la importancia de la CRMP-2 para la elongación axonal de las neuronas en cultivo. Se ha demostrado *in vitro* que la CRMP-2 interactúa con la tubulina (Gu y Ihara, 2000; Fukata y cols., 2002), sugiriéndose que promueve el ensamblaje de microtúbulos (Fukata y cols., 2002). En un modelo de injuria en nervio hipogloso de rata, se observó un aumento del ARNm de la CRMP-2 después del daño, indicando que la CRMP-2 es necesaria para la elongación de neuritas (Suzuki y cols., 2003) y sugiriendo su participación en procesos de reparación del sistema nervioso. Los estudios en torno a la función de la CRMP-2 han avanzado, pero no sin controversias. En un par de estudios se reportó la presencia de dos isoformas para la CRMP-2, la A y la B tanto *in vitro* como *in vivo* (Yuasa-Kawada y cols., 2003, Bretin y cols., 2005), determinándose que ambas proteínas exhibían roles opuestos. La CRMP-2A (de 75 kDa) promueve un patrón ordenado de microtúbulos, inhibiendo la aparición de ramificaciones en el axón, y la CRMP-2B (de 64 kDa) favorece la formación de un patrón desorientado de microtúbulos y permite la aparición de ramificaciones en el axón (Yuasa-Kawada y cols., 2003). En este estudio se mencionó que la discordancia con los resultados de otros grupos se debía a un artefacto al utilizar la fusión de CRMP-2 con la proteína fluorescente verde. Estudios posteriores no han hecho referencia a lo encontrado por Bretin y cols, (2005) y Yuasa-Kawada y cols. (2003). Aunque haya dudas respecto a la función precisa de la CRMP-2, es evidente su participación en la formación correcta de las conexiones sinápticas, de hecho, se han observado cambios de esta proteína en sujetos con enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Johnston-Wilson

y cols., 2000; Czech y cols., 2004).

### **6.9.1 Distribución de la CRMP-2 en el hipocampo de rata.**

Se ha determinado la inmunorreactividad de la CRMP-2 en cerebro de ratón, (Bretin y cols., 2005), y en este trabajo se muestra por primera vez la distribución de la CRMP-2 en el hipocampo de rata. La inmunorreactividad para esta proteína se observó principalmente en las neuronas piramidales del hipocampo y en menor magnitud en el giro dentado. La inmunorreactividad se distribuye principalmente en el soma, siendo leve en el estrato que corresponde a los axones y a las dendritas. Por *western* se determinó que la CRMP-2 detectada corresponde a la isoforma B de 64 kDa, observándose resultados similares a los observados en los estudios en ratón, donde se describe la presencia de la CRMP-2 en neuronas piramidales, aunque la inmunorreactividad en esta zona se observó predominante en dendritas y axones (Bretin y cols., 2005). Estos cambios se podrían atribuir a la diferencia de especies o tal vez a la especificidad del anticuerpo, puesto que el análisis que se hizo en ratón se realizó indirectamente, utilizando anticuerpos contra la isoforma A y contra las isoformas A y B. En trabajos *in vitro* también se han observado discrepancias en la distribución de la CRMP-2. En cultivos celulares de la línea Neuro2A se encontró inmunorreactividad de CRMP-2 en núcleos celulares, junto a tubulina y formando parte del huso mitótico (Gu y Ihara, 2000). Sin embargo, en cultivos de neuronas corticales no se observó esto (Bretin y cols., 2005), sugiriendo que en distintas condiciones de cultivo o en distintos modelos la distribución de la CRMP-2 puede variar. Gran parte de los estudios de la CRMP-2 han determinado su importancia para la elongación axonal, probablemente porque *in vitro* se detectan niveles altos de proteína en esta estructura, pero se ha observado inmunorreactividad en soma y dendritas. En esta memoria se observaron variaciones en los niveles de la CRMP-2 en el soma, pero es posible que no se hayan alcanzado a pesquisar en dendritas porque en ellas la inmunorreactividad es muy baja, sin embargo, es probable que esta proteína también sea importante para la dinámica del citoesqueleto

de las dendritas. Por su importancia para los procesos de neuroplasticidad se determinaron variaciones en los niveles de la CRMP-2 en las áreas CA3 y CA1 del hipocampo.

### **6.9.2 Inmunorreactividad de la CRMP-2 en las áreas CA3 y CA1 del hipocampo.**

El estrés crónico provoca una disminución de la inmunorreactividad de la CRMP-2 en las zonas CA1 y CA3 del hipocampo, lo que se observa por un incremento en la proporción de células que presentan marca moderada y débil, y una disminución en la proporción de células que presentan marca alta y muy alta. En CA1 se observa que la administración de sertralina no modifica el perfil de distribución de la CRMP-2 en los animales estresados. Sin embargo, la disminución de la inmunorreactividad es impedida por la sertralina en el área CA3, observándose que disminuye la proporción de células con marca moderada y débil, y aumenta la proporción de células con marca alta. El significado de una disminución en la CRMP-2 es difícil de explicar existiendo tan pocos trabajos, y que aún no llegan a un consenso respecto de su función. Pero se puede sugerir que la disminución en la inmunorreactividad de la CRMP-2 puede reflejar que el estrés provoca la interrupción de los mecanismos normales asociados a la remodelación dendrítica, procesos en los que existe una alternación entre la elongación y el acortamiento de proyecciones citoplasmáticas que derivarán en nuevas ramificaciones. Estos resultados se podrían complementar con estudios de neuroimagen *in vivo* que demuestren los efectos de niveles disminuidos de la CRMP-2 sobre la citoarquitectura neuronal.

La anulación de los efectos del estrés crónico en la inmunorreactividad de la CRMP-2 sólo en el área CA3 del hipocampo por la sertralina, podría indicar que los efectos del antidepresivo están asociados a cambios moleculares que ocurren específicamente en esta zona. La zona CA3 está dañada en sujetos con epilepsia del lóbulo temporal medial y en sujetos depresivos (Johnston-Wilson y cols., 2000; Czech y cols., 2004), y

justamente se han observado cambios en los niveles de la CRMP-2 en estas patologías, sugiriendo alguna asociación entre esta proteína y los cambios morfológicos que se han observado en el hipocampo, específicamente en el área CA3. En esta memoria se observaron cambios conductuales que si bien no están directamente relacionados con la función hipocampal, podrían estar asociados de forma indirecta a través de las interacciones que se mantienen con otras estructuras como la amígdala y la corteza frontal. Para completar este trabajo, se debe determinar mediante estudios morfológicos si existe atrofia en las neuronas piramidales del hipocampo.

Los resultados del análisis por *western* muestran que no hay variación en los niveles de la CRMP-2 en hipocampo total, indicando que puede haber cambios en los niveles de esta proteína en otras zonas del hipocampo capaces de compensar la disminución de los niveles de CRMP-2 que se observan en las neuronas piramidales del hipocampo por inmunohistoquímica. De hecho en estudios en neuronas corticales en cultivo se ha detectado la presencia de esta proteína en oligodendrocitos (Bretin y cols., 2005).

Se ha propuesto que la forma no fosforilada de la CRMP-2 se puede unir a la tubulina para promover la elongación de los microtúbulos, siendo la razón entre la forma no fosforilada y la fosforilada un valor que podría indicar la cantidad de proteína que podría interactuar con la tubulina (Fukata y cols., 2002). En el análisis por *western* no se observaron cambios importantes en la forma fosforilada ni en este cociente, sugiriendo que los efectos del estrés crónico y del antidepresivo sertralina cursarían modificando los niveles de la proteína más que su actividad. Los análisis de la forma fosforilada se hicieron sobre antecedentes que indicaban que la forma fosforilada corresponde a una banda secundaria que aparece sobre la banda principal, así que queda por determinar si esta banda es efectivamente la forma fosforilada de la proteína. Además, también queda por determinar a qué corresponden otras bandas que se observaron en el *western*. Se ha observado que la injuria cerebral isquémica produce la aparición de formas de menor peso molecular de esta proteína producto de la activación de calpaínas pudiendo ser uno

de los mecanismos que podrían llevar a la disminución de la CRMP-2 (Zhang y cols., 2007). En un estudio mediante espectrometría de masas se observó que la administración de los antidepresivos fluoxetina y venlafaxina incrementa los niveles de la CRMP-2 en hipocampo de rata, lo que coincide con nuestra propuesta de que esta proteína está asociada a cambios moleculares que deben ser promovidos por los antidepresivos. Aunque no se observaron cambios fisiológicos tan acentuados como en otros modelos donde se utiliza un estrés más severo, se observaron cambios conductuales que se correlacionaron con las variaciones en la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el área CA3 del hipocampo, sugiriendo que la CRMP-2 podría estar asociada a los cambios morfológicos que ocurren en esta zona y que probablemente están relacionados con los cambios conductuales en sujetos depresivos. En futuros experimentos deberá determinarse la relación entre el mBDNF y la CRMP-2 a fin de investigar si los efectos antidepresivos de la neurotrofina madura pueden cursar modificando los niveles o la activación de la CRMP-2.

#### **6.10 Proyecciones.**

En este modelo el estrés produce cambios fisiológicos moderados. En este sentido, queda por determinar el curso temporal de los cambios en la corticosterona y los cambios en los metabolitos de NA y DA en la corteza prefrontal.

Para completar los estudios moleculares del BDNF se sugiere estudiar los niveles del proBDNF y el mBDNF, estudiar los niveles de secreción de esta neurotrofina y analizar los niveles de su receptor, el TrkB.

Los resultados de los estudios moleculares de la CRMP-2 sugieren que es interesante estudiar en mayor profundidad la participación de la CRMP-2 en los cambios morfológicos que se han observado en modelos animales de depresión estudiando como cambian los niveles de las isoformas de la CRMP-2. Además, en este modelo es necesario determinar si existen cambios morfológicos en el área CA3 del hipocampo.

## 7. CONCLUSIONES.

- ✓ En la rata la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento produjo una reducción en la ganancia de peso corporal, efecto que no se acompañó por un aumento en la actividad del eje HHA ni por una activación del sistema simpático-adrenal, indicando que el estrés aplicado es moderado o que en los animales se produjo adaptación a este tipo de estrés.
- ✓ La administración del antidepresivo sertralina a ratas estresadas no modificó la ganancia en el peso; sugiriendo que la sertralina no es capaz de interferir con los mecanismos asociados a la variación del peso del animal modulados por el estrés.
- ✓ El estrés crónico o la administración del antidepresivo sertralina no modificaron el contenido de la serotonina y el del su metabolito el ácido 5-hidroxi-indolacético en la corteza prefrontal.
- ✓ En la rata la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento produjo cambios conductuales como anhedonia, reducción en la adquisición de respuestas condicionadas y desesperanza aprendida, indicando que el estrés aplicado es suficiente para producir conductas similares a las observadas en sujetos depresivos.
- ✓ Los cambios conductuales inducidos por el estrés crónico fueron abolidos por la administración del antidepresivo sertralina, indicando que este modelo es útil para entender los cambios que subyacen a la terapia farmacológica en sujetos depresivos. La acción antidepresiva de la sertralina se correlacionó con un incremento aunque no significativo del contenido de la serotonina y del ácido 5-hidroxi-indolacético en la corteza prefrontal. Esto sugiere que la acción antidepresiva de la sertralina está acompañada por un aumento en la neurotransmisión serotoninérgica.

- ✓ La modificación de los cambios conductuales causados por el estrés no se asocian a cambios en la inmunorreactividad de la neurotrofina BDNF en el stratum oriens cercana a la región CA3 del hipocampo, lo que sugiere que al menos en esta área no sería necesario un cambio en los niveles de esta neurotrofina.
  
- ✓ Los cambios conductuales causados por el estrés crónico se correlacionaron con una reducción de la proteína CRMP-2 en los somas localizados en el área CA3 del hipocampo, efectos que son atenuados por la administración del antidepresivo sertralina. Por primera vez se demuestra *in vivo* una localización somática de esta proteína sugiriendo su participación en funciones somato-dendríticas. Además, la reducción en la inmunorreactividad de CRMP-2 en el área CA3 se correlaciona con la atrofia dendrítica hipocámpal causada por el estrés crónico en modelos similares.

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

- APA, 1994. DSM IV - Diagnostic and statistical manual of psychiatric disorders. American Psychiatric Association.
- Araneda, K., 2006. Glucocorticoides y la vía ERK-MAPK en hipocampo de rata. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología, Santiago.
- Arimura, N., Menager, C., Fukata, Y. and Kaibuchi, K., 2004. Role of CRMP-2 in neuronal polarity. *J Neurobiol.* 58, 34-47.
- Berríos, C., 2007. Glucocorticoides administrados en forma crónica a ratas produce alteraciones conductuales que son prevenidas por el tratamiento con antidepresivos. Tesis para optar al grado de Magíster en Neurobiología. Universidad de Chile, Santiago.
- Bravo, J., 2007. Efecto del antidepresivo desipramina sobre marcadores hipocampales asociados a la resiliencia celular. Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica. Universidad de Chile, Santiago.
- Bretin, S., Reibel, S., Charrier, E., Maus-Moatti, M., Auvergnon, N., Thevenoux, A., Glowinski, J., Rogemond, V., Premont, J., Honnorat, J. and Gauchy, C., 2005. Differential expression of CRMP1, CRMP2A, CRMP2B, and CRMP5 in axons or dendrites of distinct neurons in the mouse brain. *J Comp Neurol.* 486, 1-17.
- Castren, E., 2005. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci.* 6, 241-246.
- Challacombe, J. F., Snow, D. M. and Letourneau, P. C., 1996. Actin filament bundles are required for microtubule reorientation during growth cone turning to avoid an inhibitory guidance cue. *J Cell Sci.* 109 ( Pt 8), 2031-2040.
- Chen, Z. Y., Jing, D., Bath, K. G., Ieraci, A., Khan, T., Siao, C. J., Herrera, D. G., Toth, M., Yang, C., McEwen, B. S., Hempstead, B. L. and Lee, F. S., 2006. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science.* 314, 140-143.
- Cryan, J. F., Valentino, R. J. and Lucki, I., 2005. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 547-569.
- Czech, T., Yang, J. W., Csaszar, E., Kappler, J., Baumgartner, C. and Lubec, G., 2004. Reduction of hippocampal collapsin response mediated protein-2 in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Neurochem Res.* 29, 2189-2196.
- Dias, B. G., Banerjee, S. B., Duman, R. S. and Vaidya, V. A., 2003. Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology.* 45, 553-563.
- D'Sa, C. and Duman, R. S., 2002. Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord.* 4, 183-194.
- Duman, R. S., Malberg, J. and Nakagawa, S., 2001. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J Pharmacol Exp Ther.* 299, 401-407.
- Duman, R. S. and Monteggia, L. M., 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* 59, 1116-1127.

- Fava, M. and Kendler, K. S., 2000. Major depressive disorder. *Neuron*. 28, 335-341.
- Forde, J. E. and Dale, T. C., 2007. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci*. 64, 1930-1944.
- Frodl, T., Schaub, A., Banac, S., Charypar, M., Jager, M., Kummler, P., Bottlender, R., Zetzsche, T., Born, C., Leinsinger, G., Reiser, M., Moller, H. J. and Meisenzahl, E. M., 2006. Reduced hippocampal volume correlates with executive dysfunctioning in major depression. *J Psychiatry Neurosci*. 31, 316-323.
- Fukata, Y., Itoh, T. J., Kimura, T., Menager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H. and Kaibuchi, K., 2002. CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol*. 4, 583-591.
- Fukumoto, S., Hsieh, C. M., Maemura, K., Layne, M. D., Yet, S. F., Lee, K. H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Taylor, W. G., Rubin, J. S., Perrella, M. A. and Lee, M. E., 2001. Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J Biol Chem*. 276, 17479-17483.
- Gelfin, Y., Gorfine, M. and Lerer, B., 1998. Effect of clinical doses of fluoxetine on psychological variables in healthy volunteers. *Am J Psychiatry*. 155, 290-292.
- Geyer, M. and Markou, A., 2000. Animal models of psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*.
- Govindarajan, A., Rao, B. S., Nair, D., Trinh, M., Mawjee, N., Tonegawa, S. and Chattarji, S., 2006. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 13208-13213.
- Graeff, F. G., Guimaraes, F. S., De Andrade, T. G. and Deakin, J. F., 1996. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 54, 129-141.
- Gregus, A., Wintink, A. J., Davis, A. C. and Kalynchuk, L. E., 2005. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav Brain Res*. 156, 105-114.
- Gu, Y. and Ihara, Y., 2000. Evidence that collapsin response mediator protein-2 is involved in the dynamics of microtubules. *J Biol Chem*. 275, 17917-17920.
- Hayley, S., Poulter, M. O., Merali, Z. and Anisman, H., 2005. The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience*. 135, 659-678.
- Holsboer, F. and Barden, N., 1996. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev*. 17, 187-205.
- Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M. and Kaibuchi, K., 2001. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci*. 4, 781-782.
- Inoue, T., Tsuchiya, K. and Koyama, T., 1994. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*. 49, 911-920.
- Johnston-Wilson, N. L., Sims, C. D., Hofmann, J. P., Anderson, L., Shore, A. D., Torrey, E. F. and Yolken, R. H., 2000. Disease-specific alterations in frontal

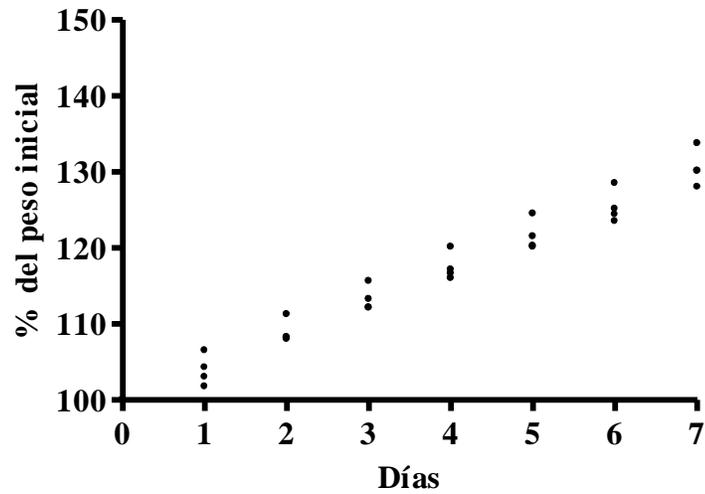
- cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry*. 5, 142-149.
- Kandel, E., Schwartz, J. and James, J., 2001. *Principios de Neurociencia*. McGraw-Hill.
- Khawaja, X., Xu, J., Liang, J. J. and Barrett, J. E., 2004. Proteomic analysis of protein changes developing in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment: Implications for depressive disorders and future therapies. *J Neurosci Res*. 75, 451-460.
- Kim, S. W., Park, S. Y. and Hwang, O., 2002. Up-regulation of tryptophan hydroxylase expression and serotonin synthesis by sertraline. *Mol Pharmacol*. 61, 778-785.
- Lau, W. M., Qiu, G., Helmeste, D. M., Lee, T. M., Tang, S. W. and So, K. F., 2007. Corticosteroid decreases subventricular zone cell proliferation, which could be reversed by paroxetine. *Restor Neurol Neurosci*. 25, 17-23.
- Li, S., Wang, C., Wang, M., Li, W., Matsumoto, K. and Tang, Y., 2007. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. *Life Sci*. 80, 1373-1381.
- Li, W., Herman, R. K. and Shaw, J. E., 1992. Analysis of the *Caenorhabditis elegans* axonal guidance and outgrowth gene *unc-33*. *Genetics*. 132, 675-689.
- Linkowski, P., Mendlewicz, J., Kerkhofs, M., Leclercq, R., Golstein, J., Brasseur, M., Copinschi, G. and Van Cauter, E., 1987. 24-hour profiles of adrenocorticotropin, cortisol, and growth hormone in major depressive illness: effect of antidepressant treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 65, 141-152.
- Lu, B., Pang, P. T. and Woo, N. H., 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*. 6, 603-614.
- Maas, J. W., Katz, M. M., Koslow, S. H., Swann, A., Davis, J. M., Berman, N., Bowden, C. L., Stokes, P. E. and Landis, H., 1994. Adrenomedullary function in depressed patients. *J Psychiatr Res*. 28, 357-367.
- MacQueen, G. M., Ramakrishnan, K., Croll, S. D., Siuciak, J. A., Yu, G., Young, L. T. and Fahnestock, M., 2001. Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression. *Behav Neurosci*. 115, 1145-1153.
- Magarinos, A. M. and 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, 89-98.
- Maier, S. F., 1984. Learned helplessness and animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 8, 435-446.
- Manji, H. K., Drevets, W. C. and Charney, D. S., 2001. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*. 7, 541-547.
- Marti, O., Marti, J. and Armario, A., 1994. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav*. 55, 747-753.
- Martinowich, K., Manji, H. and Lu, B., 2007. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci*. 10, 1089-1093.

- Matthews, K., Christmas, D., Swan, J. and Sorrell, E., 2005. Animal models of depression: navigating through the clinical fog. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 503-513.
- McEwen, B. S. and Chattarji, S., 2004. Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine. *Eur Neuropsychopharmacol.* 14 Suppl 5, S497-502.
- Menager, C., Arimura, N., Fukata, Y. and Kaibuchi, K., 2004. PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J Neurochem.* 89, 109-118.
- Monteggia, L. M., Luikart, B., Barrot, M., Theobald, D., Malkovska, I., Nef, S., Parada, L. F. and Nestler, E. J., 2007. Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biol Psychiatry.* 61, 187-197.
- Mora, S. and Díaz-Véliz, G., 1993. Paradigms for the study of behavior. In: *Methods in Neuroscience*.
- Muijsers, R. B., Plosker, G. L. and Noble, S., 2002. Sertraline: a review of its use in the management of major depressive disorder in elderly patients. *Drugs Aging.* 19, 377-392.
- Muller, M. B. and Holsboer, F., 2006. Mice with mutations in the HPA-system as models for symptoms of depression. *Biol Psychiatry.* 59, 1104-1115.
- Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J. and Monteggia, L. M., 2002. Neurobiology of depression. *Neuron.* 34, 13-25.
- Nestler, E. J. and Carlezon, W. A., Jr., 2006. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry.* 59, 1151-1159.
- Nielsen, J. A., Chapin, D. S., Johnson, J. L., Jr. and Torgersen, L. K., 1992. Sertraline, a serotonin-uptake inhibitor, reduces food intake and body weight in lean rats and genetically obese mice. *Am J Clin Nutr.* 55, 185S-189S.
- Pattabiraman, P. P., Tropea, D., Chiaruttini, C., Tongiorgi, E., Cattaneo, A. and Domenici, L., 2005. Neuronal activity regulates the developmental expression and subcellular localization of cortical BDNF mRNA isoforms in vivo. *Mol Cell Neurosci.* 28, 556-570.
- Paxinos, G. & Watson, C. 1982. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Sydney ; Orlando: Academic Press.
- Popoli, M., Gennarelli, M. and Racagni, G., 2002. Modulation of synaptic plasticity by stress and antidepressants. *Bipolar Disord.* 4, 166-182.
- Rojas, G., González, I., Díaz, B., Miranda, E. and López, F., 1997. Eventos vitales y patología psiquiátrica en el nivel primario de atención. *Acta psiquiátrica y psicológica de América Latina.* 43, 134-140.
- Saarelainen, T., Hendolin, P., Lucas, G., Koponen, E., Sairanen, M., MacDonald, E., Agerman, K., Haapasalo, A., Nawa, H., Aloyz, R., Ernfors, P. and Castren, E., 2003. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci.* 23, 349-357.
- Sandi, C., 2004. Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat Rev Neurosci.* 5, 917-930.

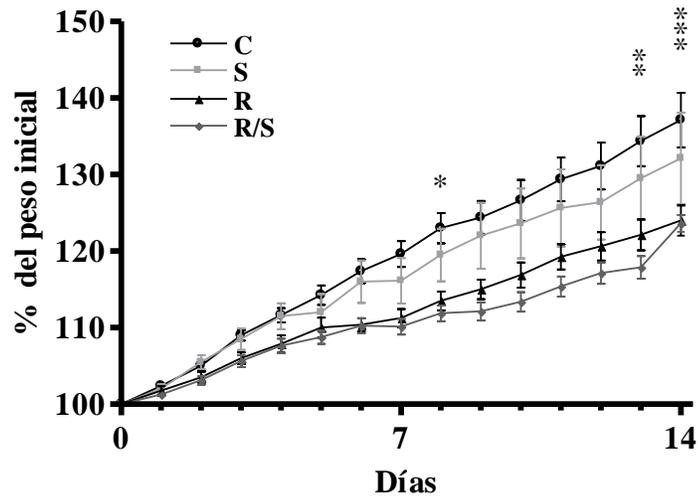
- Sandi, C., Loscertales, M. and Guaza, C., 1997. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur J Neurosci.* 9, 637-642.
- Sapan, C.V., Lundblad, R.L. & Price, N.C. 1999. "Colorimetric protein assay techniques". *Biotechnol Appl Biochem* 29 ( Pt 2): 99-108.
- Schule, C., Baghai, T., Zwanzger, P., Ella, R., Eser, D., Padberg, F., Moller, H. J. and Rupprecht, R., 2003. Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical hyperactivity in depressed patients by mirtazapine. *Psychopharmacology (Berl)*. 166, 271-275.
- Shirayama, Y., Chen, A. C., Nakagawa, S., Russell, D. S. and Duman, R. S., 2002. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci.* 22, 3251-3261.
- Smagin, G. N., Howell, L. A., Redmann, S., Jr., Ryan, D. H. and Harris, R. B., 1999. Prevention of stress-induced weight loss by third ventricle CRF receptor antagonist. *Am J Physiol.* 276, R1461-1468.
- Sortwell, C. E. and Sagen, J., 1993. Induction of antidepressive activity by monoaminergic transplants in rat neocortex. *Pharmacol Biochem Behav.* 46, 225-230.
- Suzuki, Y., Nakagomi, S., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Inagaki, N., Kaibuchi, K., Aizawa, H., Kikuchi, K. and Kiyama, H., 2003. Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured motor neurons of rat. *J Neurochem.* 86, 1042-1050.
- Tafet, G. E. and Bernardini, R., 2003. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27, 893-903.
- Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L. and Arancibia, S., 2004. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol.* 25, 77-107.
- Torres, I. L., Gamaro, G. D., Vasconcellos, A. P., Silveira, R. and Dalmaz, C., 2002. Effects of chronic restraint stress on feeding behavior and on monoamine levels in different brain structures in rats. *Neurochem Res.* 27, 519-525.
- Ulrich-Lai, Y. M., Figueiredo, H. F., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Engeland, W. C. and Herman, J. P., 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291, E965-973.
- Volosin, M., Song, W., Almeida, R. D., Kaplan, D. R., Hempstead, B. L. and Friedman, W. J., 2006. Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J Neurosci.* 26, 7756-7766.
- von Euler, U.S. and Hamberg U., 1949. Colorimetric estimation of noradrenalin in the presence of adrenalin. *Science.* 110, 561.
- Wadsworth, E. J., Moss, S. C., Simpson, S. A. and Smith, A. P., 2005. SSRIs and cognitive performance in a working sample. *Hum Psychopharmacol.* 20, 561-572.

- Wang, L. H. and Strittmatter, S. M., 1996. A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *J Neurosci.* 16, 6197-6207.
- Watanabe, Y., Gould, E. and McEwen, B. S., 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.* 588, 341-345.
- Xu, Y., Ku, B., Tie, L., Yao, H., Jiang, W., Ma, X. and Li, X., 2006. Curcumin reverses the effects of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. *Brain Res.* 1122, 56-64.
- Yoshimura, T., Arimura, N. and Kaibuchi, K., 2006. Molecular mechanisms of axon specification and neuronal disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 1086, 116-125.
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A. and Kaibuchi, K., 2005. GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell.* 120, 137-149.
- Yuasa-Kawada, J., Suzuki, R., Kano, F., Ohkawara, T., Murata, M. and Noda, M., 2003. Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. *Eur J Neurosci.* 17, 2329-2343.
- Zangen, A., Overstreet, D. H. and Yadid, G., 1999. Increased catecholamine levels in specific brain regions of a rat model of depression: normalization by chronic antidepressant treatment. *Brain Res.* 824, 243-250.
- Zazpe, A., Artaiz, I., Labeaga, L., Lucero, M. L. and Orjales, A., 2007. Reversal of learned helplessness by selective serotonin reuptake inhibitors in rats is not dependent on 5-HT availability. *Neuropharmacology.* 52, 975-984.
- Zhang, Z., Ottens, A. K., Sadasivan, S., Kobeissy, F. H., Fang, T., Hayes, R. L. and Wang, K. K., 2007. Calpain-mediated collapsin response mediator protein-1, -2, and -4 proteolysis after neurotoxic and traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 24, 460-472.
- Zorner, B., Wolfer, D. P., Brandis, D., Kretz, O., Zacher, C., Madani, R., Grunwald, I., Lipp, H. P., Klein, R., Henn, F. A. and Gass, P., 2003. Forebrain-specific trkB-receptor knockout mice: behaviorally more hyperactive than "depressive". *Biol Psychiatry.* 54, 972-982.
- Zurita, A., Martijena, I., Cuadra, G., Brandao, M. L. and Molina, V., 2000. Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: reversal by naltrexone pretreatment. *Behav Brain Res.* 117, 163-171.

A



B



**Figura 2. El estrés y la sertralina indujeron una reducción en la ganancia de peso corporal.** Se determinó la ganancia de peso corporal de los animales (n=8 para cada condición). Los valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM del porcentaje del peso inicial de los animales. (A) La ganancia de peso de los animales fue similar durante la semana previa al inicio de los tratamientos. (B) Una vez que se iniciaron los tratamientos los animales fueron separados en cuatro grupos y se observó una reducción en la ganancia de peso en el grupo de animales estresados con respecto al grupo de animales controles, siendo esta diferencia significativa a partir del octavo día del protocolo de estrés. Análisis estadístico ANOVA de dos vías.

\*  $p < 0,05$  C vs R (días 8-12 de tratamiento).

\*\*  $p < 0,01$  C vs R (día 13 de tratamiento).

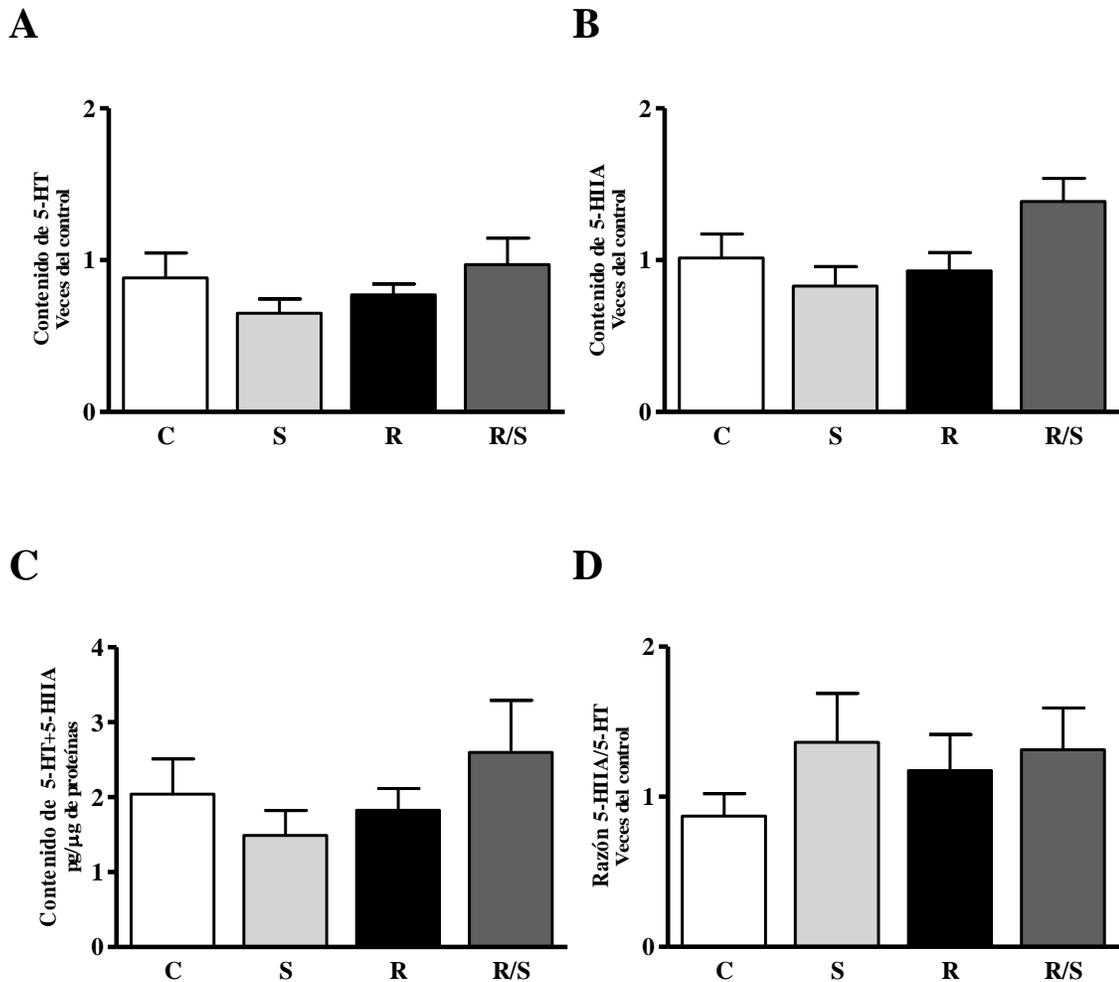
\*\*\*  $p < 0,001$  C vs R (día 14 de tratamiento).

**Tabla 1. Efecto del estrés y de la sertralina sobre la masa de la médula adrenal y el contenido de catecolaminas.**

<b>Condición</b>	<b>Médula adrenal</b> mg de tejido húmedo	<b>Contenido de CAs</b> µg CAs/médula adrenal	<b>Concentración de CAs</b> µg CAs/mg médula adrenal
C	14,5 ± 1,6	13,8 ± 0,9	1,0 ± 0,1
S	16,8 ± 2,3	12,9 ± 0,8	0,8 ± 0,1
R	18,2 ± 2,3	12,9 ± 0,9	0,7 ± 0,1
R/S	19,2 ± 1,4	15,7 ± 1,3	0,8 ± 0,1

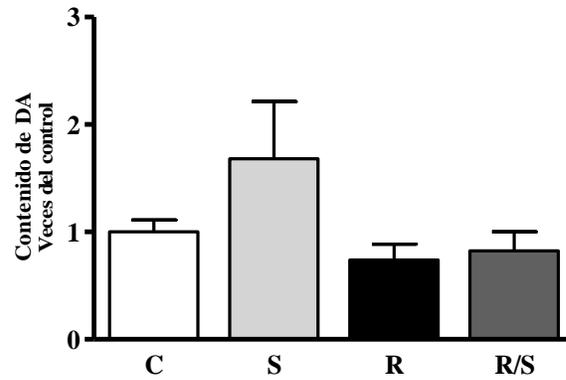
Los valores corresponden al promedio ± EEM, con un n=4 para cada condición. Los valores de masa de la médula adrenal corresponden a los mg de tejido húmedo de la médula obtenida de la glándula adrenal derecha. Los valores de catecolaminas (CAs) se expresan como contenido en µg por médula adrenal y como concentración en µg por mg de médula adrenal.



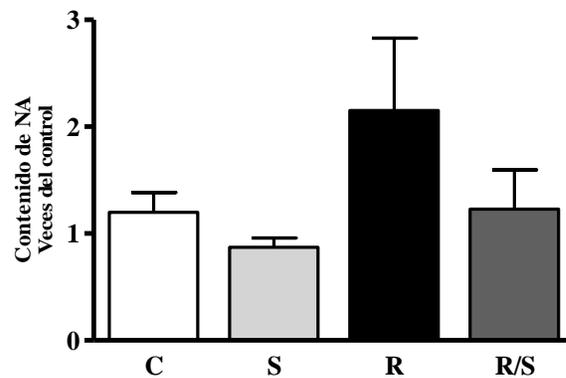


**Figura 4. El estrés y/o la administración de sertralina no produjeron cambios significativos en el contenido de serotonina y ácido 5-hidroxi-indolacético.** Mediante HPLC acoplada a detección amperométrica se determinaron los cambios en el contenido de serotonina (5-HT) y su metabolito el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) en la corteza prefrontal (n=7-8). (A) Contenido de 5-HT expresado como el promedio  $\pm$  EEM del valor normalizado respecto al control. (B) Contenido de 5-HIAA expresado como el promedio  $\pm$  EEM del valor normalizado respecto al control. (C) Suma de los niveles de la 5-HT y 5-HIAA expresados como el promedio  $\pm$  EEM de los pg de la suma por  $\mu$ g de proteína. (D) Razón entre el contenido de 5-HIAA y el 5-HT expresados como promedio  $\pm$  EEM.

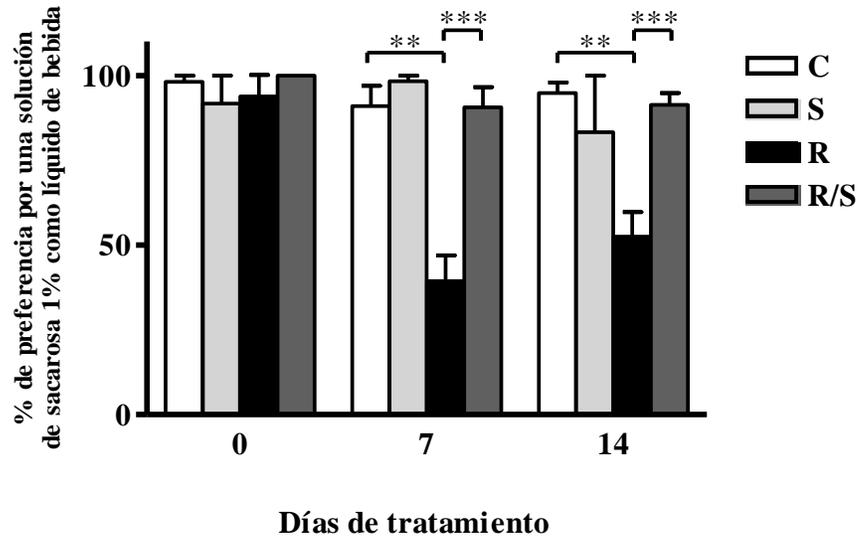
**A**



**B**



**Figura 5. El estrés y/o la administración de sertralina no produjeron cambios significativos en el contenido de dopamina y noradrenalina.** Las catecolaminas de la corteza prefrontal fueron separadas mediante HPLC y cuantificadas por detección amperométrica (n=7-8). (A) Contenido de dopamina (DA) expresado como el promedio  $\pm$  EEM del valor normalizado respecto al control. (B) Contenido de noradrenalina (NA) expresado como el promedio  $\pm$  EEM del valor normalizado respecto al control.



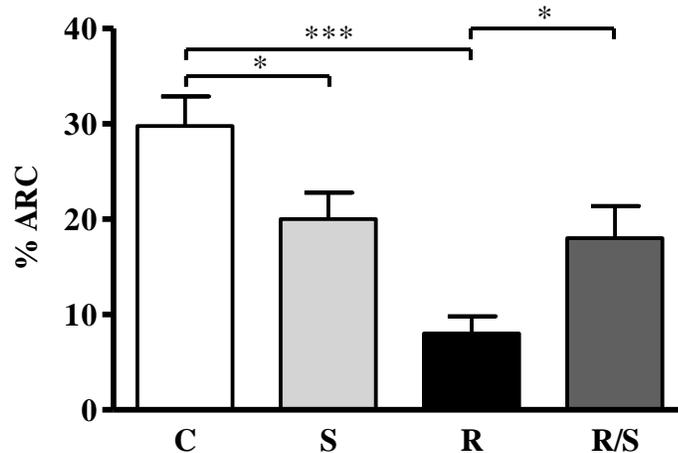
**Figura 6. La administración de sertralina impidió la anhedonia producida por el estrés.**

Se evaluó la condición de anhedonia midiendo la preferencia por el consumo de una solución de sacarosa al 1% como líquido de bebida, antes del inicio, a los 7 y 14 días de los tratamientos (n=4 para cada condición). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  EEM de las preferencias por la solución de sacarosa al 1%. Se observó que los animales expuestos a estrés tuvieron menor preferencia por la solución de sacarosa a los días 7 y 14 de tratamiento con respecto a los animales controles, efecto que fue anulado por la administración de la sertralina. Análisis estadístico ANOVA de dos vías.

\*\*  $p < 0,01$  C vs R a los 7 y a los 14 días de tratamiento.

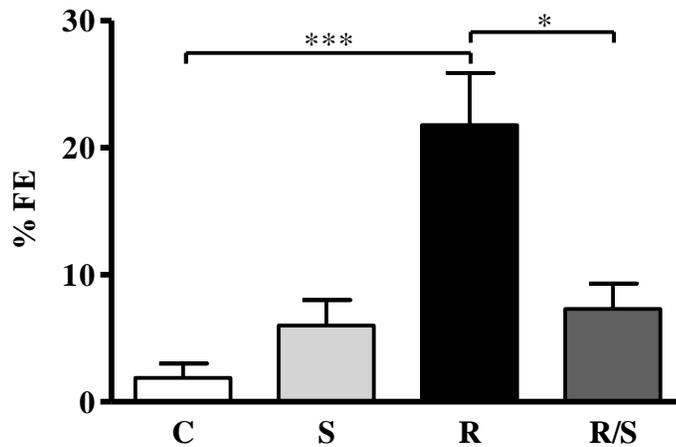
\*\*\*  $p < 0,001$  R vs R/S a los 7 días de tratamiento.

\*\*  $p < 0,01$  R vs R/S a los 14 días de tratamiento.



**Figura 7. La administración de sertralina impidió la reducción en la adquisición de respuestas condicionadas producida por el estrés.** Se determinó la capacidad de la rata para asociar un estímulo aversivo (choque eléctrico en las patas) con un estímulo sensorial (sonido) cuantificando el porcentaje en la adquisición de respuestas condicionadas (% de ARC) (n=8 para cada condición). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  EEM del % de ARC. Los animales sometidos a estrés tuvieron una reducción en el % de ARC respecto a los animales controles, efecto que fue impedido por la administración de la sertralina. Además la administración de sertralina a animales sin estresar produjo una reducción en el % de ARC. Análisis estadístico paramétrico ANOVA, Newman-Keuls.

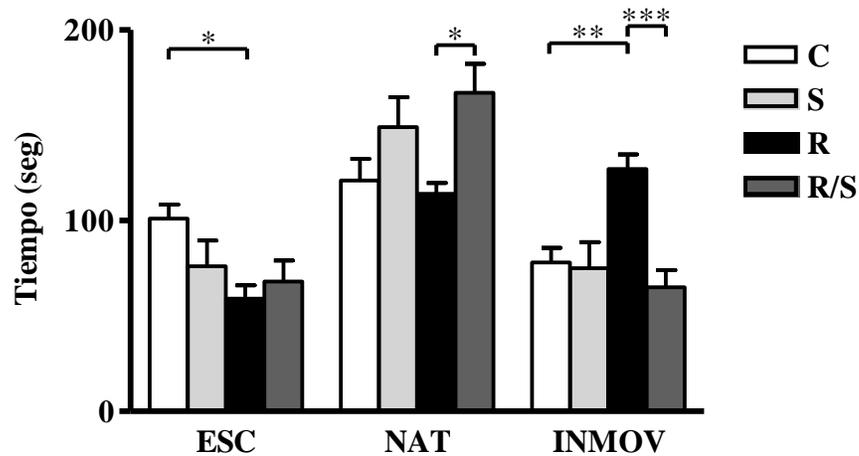
- \*\*\* p<0,001 C vs R.
- \* p<0,05 R vs R/S.
- \* p<0,05 C vs S.



**Figura 8. La administración de sertralina impidió el incremento de las fallas en el escape producida por el estrés.** Se determinaron cambios en la capacidad del animal para evitar activamente un estímulo aversivo (choque eléctrico en las patas) cuantificando el porcentaje en las fallas en el escape (% FE) (n=8 para cada condición). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  EEM del % FE. Los animales sometidos a estrés tuvieron mayor % FE respecto a los animales controles, un efecto que fue prevenido por la administración de la sertralina. Análisis estadístico paramétrico ANOVA, Newman-Keuls.

\*\*\*  $p < 0,001$  C vs R.

\*  $p < 0,05$  R vs R/S.



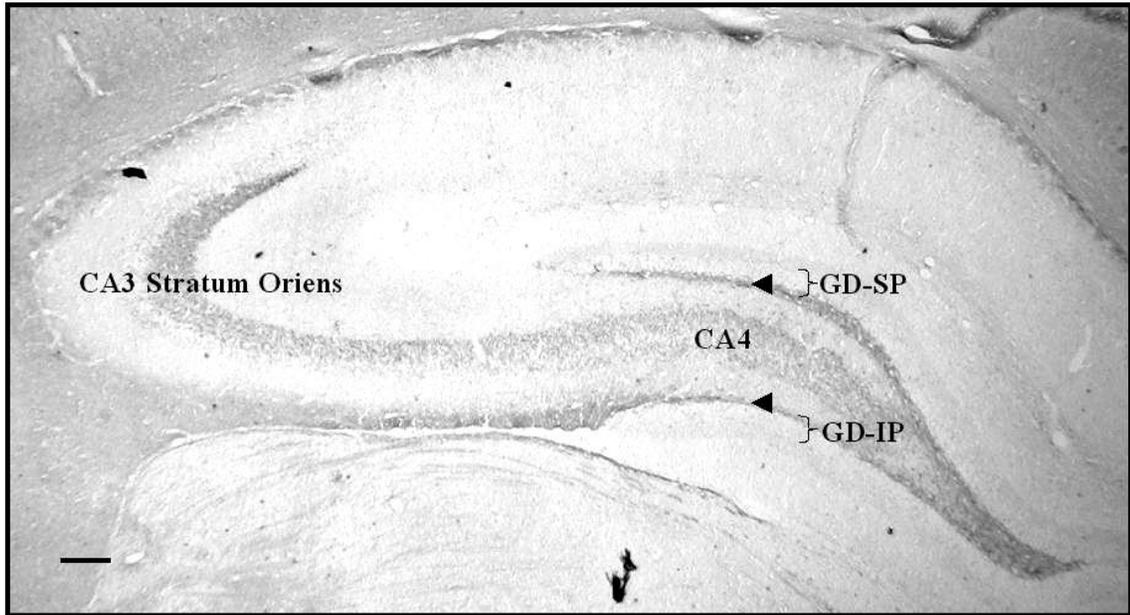
**Figura 9. La administración de sertralina impidió el incremento en el tiempo de inmovilidad producido por el estrés.** Se determinaron cambios en las conductas asociadas al escape (escalamiento y natación) y a la desesperanza aprendida (inmovilidad) poniendo al animal en un cilindro con agua y cuantificando el tiempo que permanece en las conductas activas durante 300 segundos (n=8 para cada condición). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  EEM del tiempo en segundos. Los animales sometidos a estrés presentaron un incremento en el tiempo de inmovilidad con respecto a los animales controles. Este incremento ocurrió a expensas de una disminución en el tiempo de escalamiento. El aumento del tiempo de inmovilidad fue prevenido por la administración de sertralina y además se observó un incremento en el tiempo de natación. Análisis estadístico paramétrico ANOVA, Newman-Keuls.

\*\* p<0,01 C vs R.

\*\*\* p<0,001 R vs R/S para el tiempo de inmovilidad.

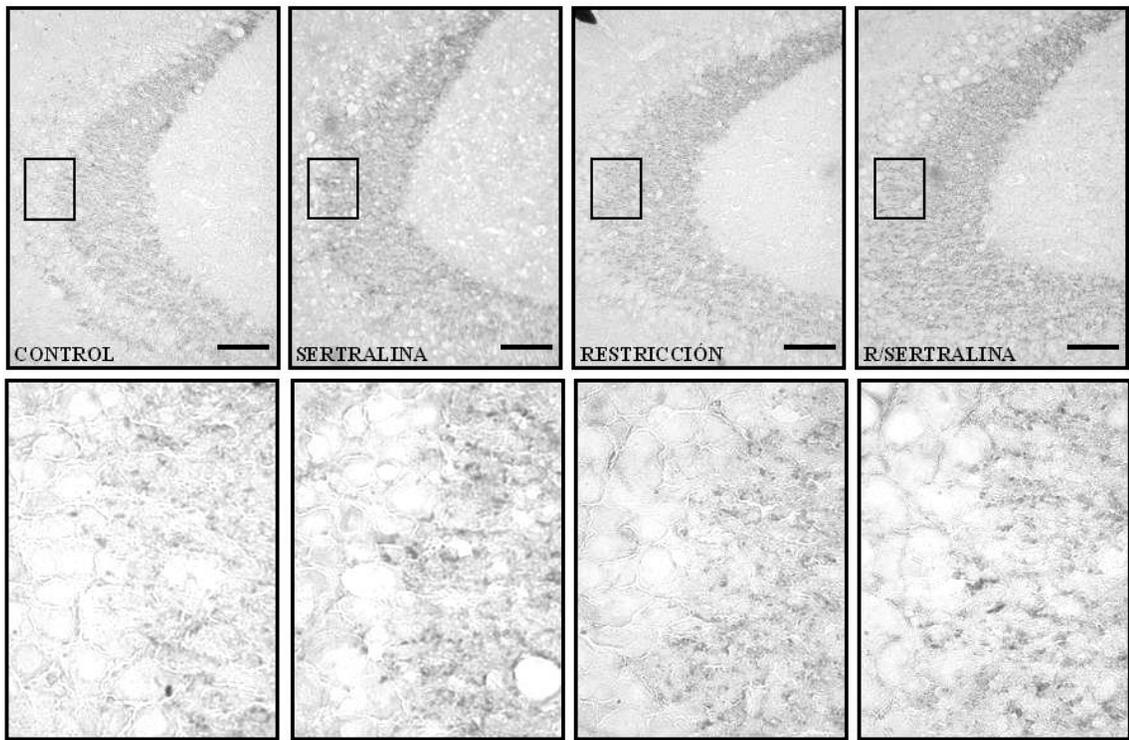
\* p<0,05, C vs R para el tiempo de escalamiento.

\* p<0,05, R vs R/S para el tiempo de natación.

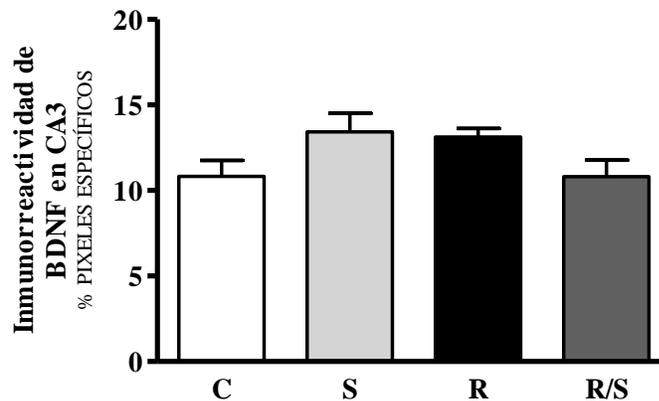


**Figura 10. Distribución de la inmunorreactividad del BDNF en el hipocampo.** Mediante inmunohistoquímica se determinó la inmunorreactividad del BDNF en el hipocampo. Se muestra una microfotografía representativa del BDNF de una rata control (magnificación de 2,5x). La inmunorreactividad se distribuye principalmente en las fibras del stratum oriens, adyacentes al área CA3, en el área CA4 y en las zonas subgranulares (bandas internas indicadas por puntas de flecha) del giro dentado. Los paréntesis indican el área correspondiente a las zonas suprapiramidal (GD-SP) e infrapiramidal (GD-IP) del giro dentado. La barra negra representa 200  $\mu\text{m}$ .

**A**

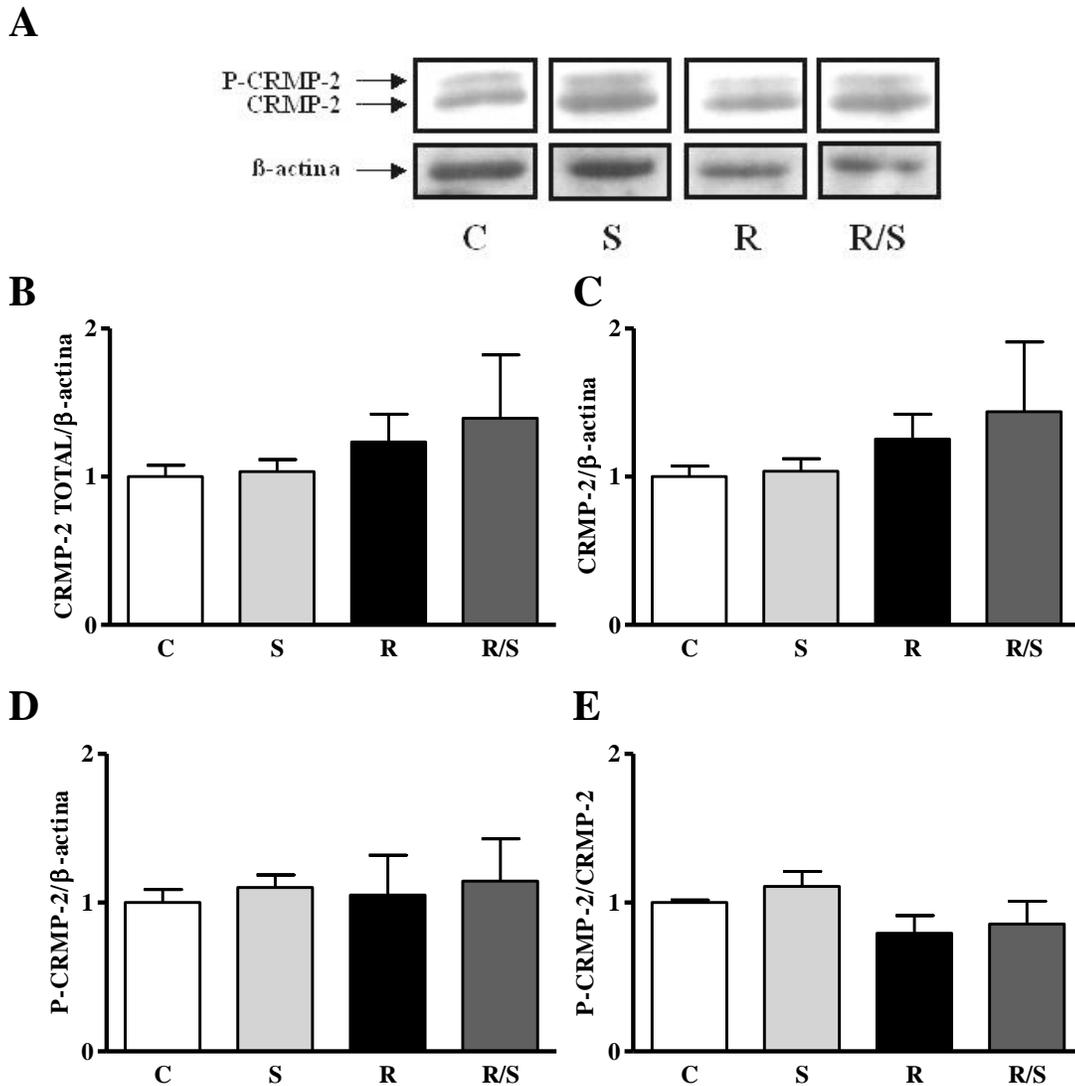


**B**

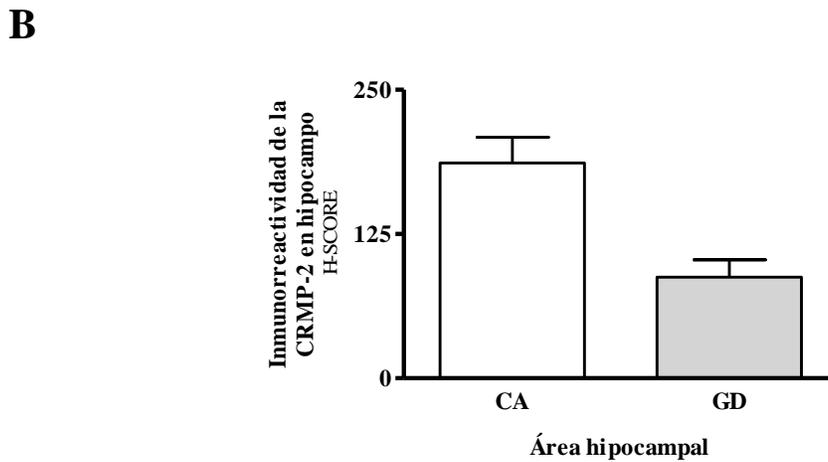
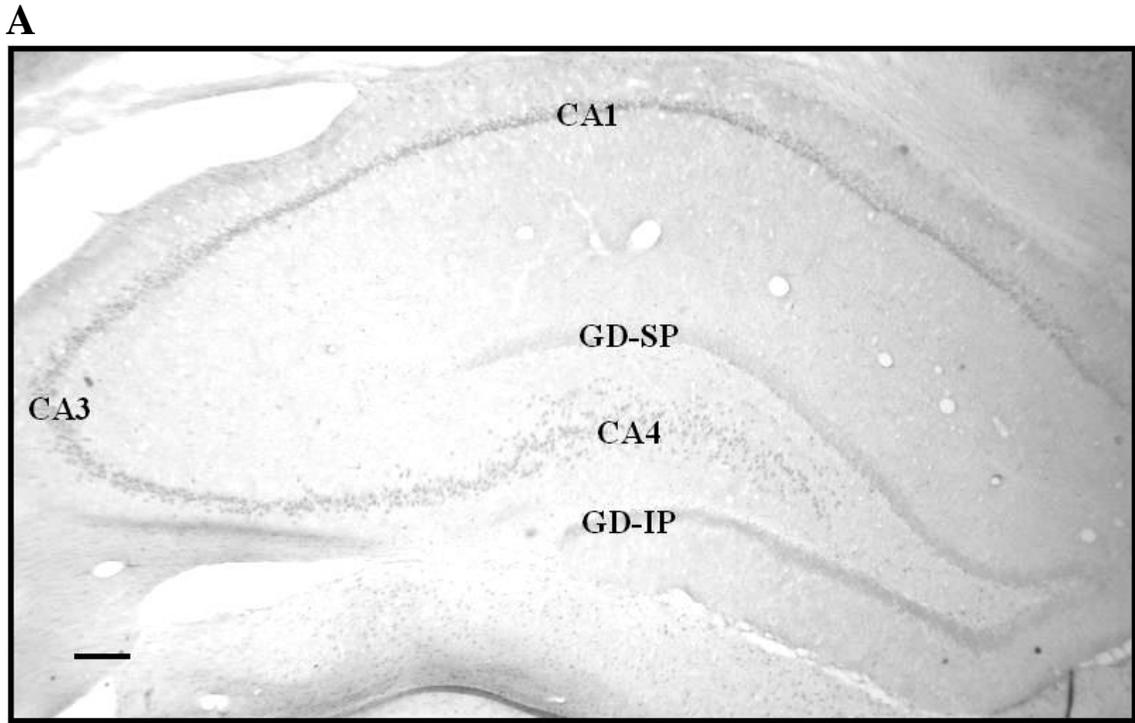


**Figura 11. El estrés y la administración de sertralina no modificaron la inmunorreactividad del BDNF en el hipocampo.** Mediante inmunohistoquímica se determinaron cambios en la inmunorreactividad del BDNF en el hipocampo (n=4 para cada condición). (A) Las microfotografías superiores (magnificación de 40x) muestran la inmunorreactividad representativa del BDNF en el área CA3 del hipocampo, y las microfotografías inferiores (magnificación 160x) muestran que la inmunorreactividad está presente pericelularmente. La barra negra representa 100  $\mu$ m.

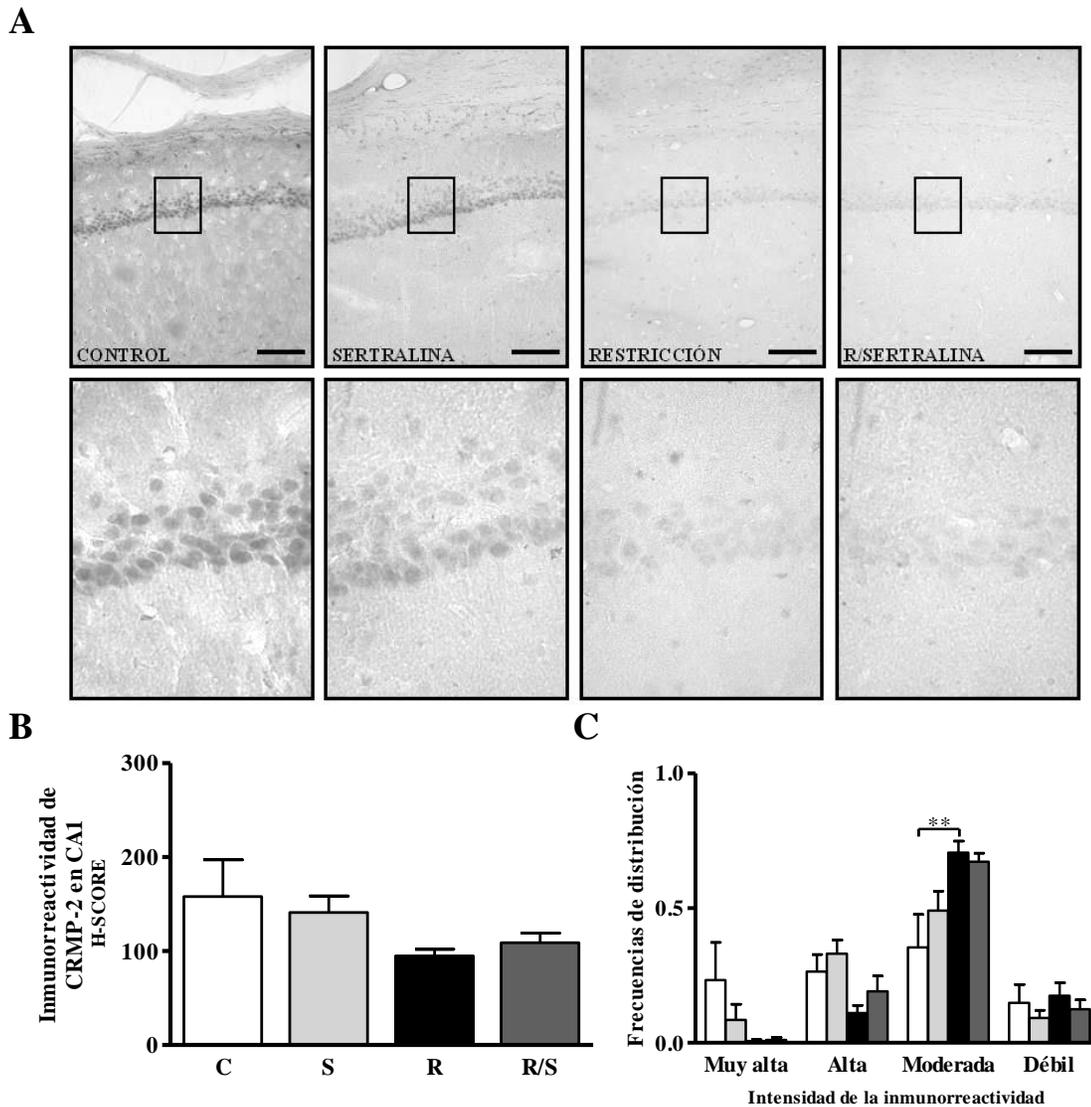
(B) Cuantificación de la intensidad de la inmunorreactividad del BDNF en el área CA3 del hipocampo expresada como promedio  $\pm$  EEM del porcentaje de pixeles específicos.



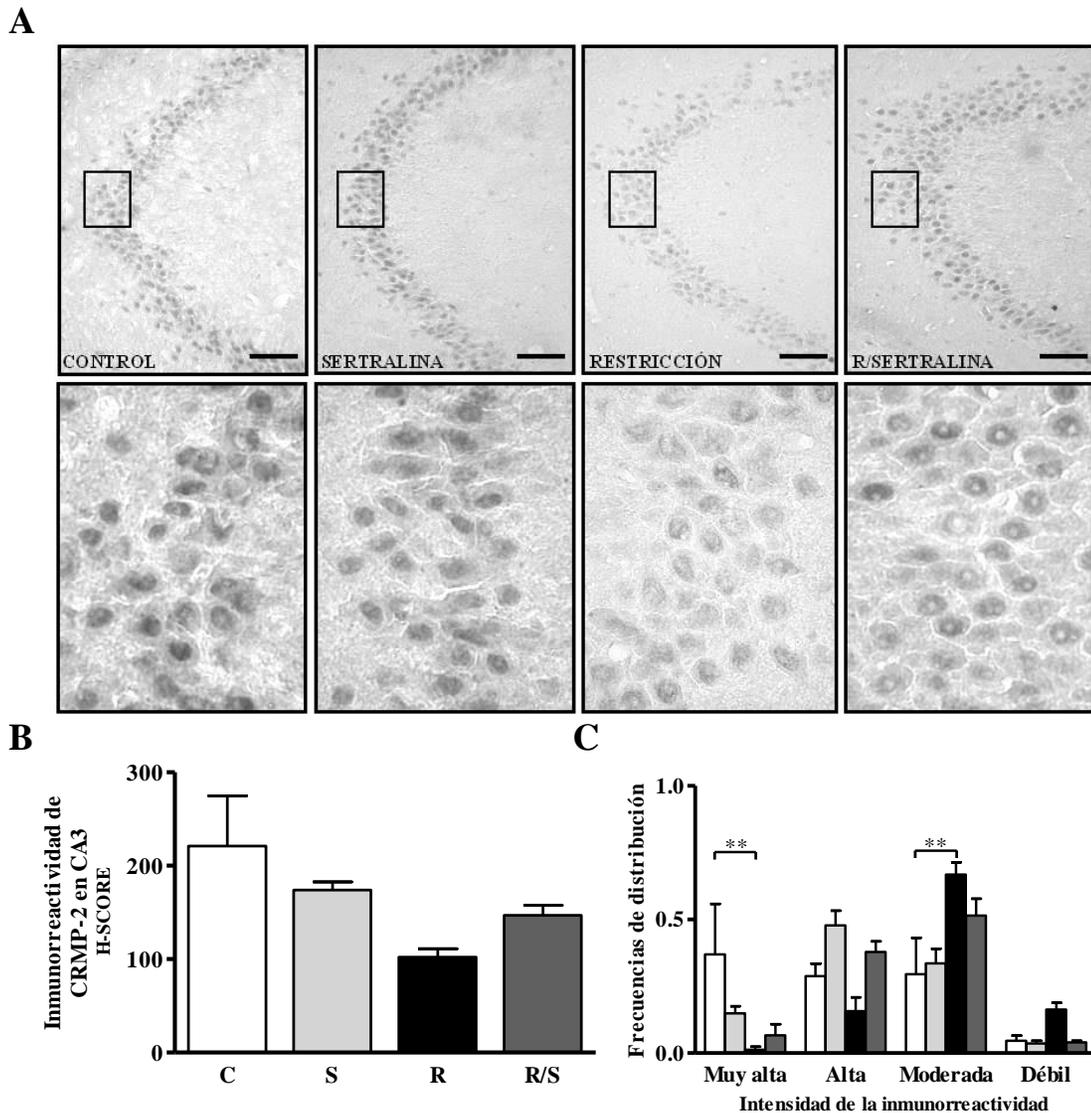
**Figura 12. El estrés y la administración de sertralina no modificaron los niveles de la CRMP-2 en extracto de hipocampo.** Se midieron los niveles de la CRMP-2 en homogeneizado de hipocampo (n=6-8). (A) *Western* representativo dónde se aprecian las bandas que corresponden a la forma fosforilada (P-CRMP-2) y no fosforilada de la CRMP-2 (CRMP-2) y la banda de la  $\beta$ -actina. (B) Cuantificación de la CRMP-2 total (suma de las intensidades de las bandas de la CRMP-2 y la P-CRMP-2) respecto a  $\beta$ -actina; se expresa como el promedio  $\pm$  EEM de los valores estandarizados respecto al valor control. (C) Cuantificación de la CRMP-2 respecto a  $\beta$ -actina expresada como el promedio  $\pm$  EEM de los valores estandarizados respecto al valor control. (D) Cuantificación de la P-CRMP-2 respecto a  $\beta$ -actina expresada como el promedio  $\pm$  EEM de los valores estandarizados respecto al valor control. (E) Cuantificación de la razón entre la P-CRMP-2 y la CRMP-2. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  EEM de los valores estandarizados respecto al valor control.



**Figura 13. Distribución de la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el hipocampo.** Mediante inmunohistoquímica se determinó la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el hipocampo de rata. (A) Microfotografía representativa de la CRMP-2 en una rata control (magnificación de 2,5x). La barra negra representa 200  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la inmunorreactividad promedio de la CRMP-2 en el cuerno de Ammon (áreas CA1, CA3 y CA4) y en el giro dentado (bandas suprapiramidal e infrapiramidal). Los valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM del H-SCORE. La inmunorreactividad de la CRMP-2 se detectó principalmente en las neuronas piramidales del cuerno de Ammon.



**Figura 14. El estrés produjo una reducción en la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el área CA1 del hipocampo.** Mediante inmunohistoquímica se determinaron cambios en la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el área CA1 del hipocampo (n=4 para cada condición). (A) Las microfotografías superiores (magnificación de 40x) muestran la inmunorreactividad representativa de la CRMP-2 en el área CA1 del hipocampo y las microfotografías inferiores (magnificación de 160x) muestran que la inmunorreactividad se presenta principalmente en el soma de las neuronas. La barra negra representa 100  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la inmunorreactividad de la CRMP-2 expresada como promedio  $\pm$  EEM del H-SCORE. (C) Análisis del número de células en los rangos de marca muy alta, alta, moderada y débil. Los valores se expresan como los promedios  $\pm$  EEM de las frecuencias de distribución. En los animales controles se observó una distribución homogénea de células en el rango muy alta, alto y moderado. En los animales sometidos a estrés se observó un aumento en la proporción de células menos inmunorreactivas con respecto a los animales controles, efecto que no fue modificado por la administración de sertralina. Análisis estadístico paramétrico ANOVA, Newman-Keuls. \*\*  $p < 0,01$ , C vs R para la marca moderada.



**Figura 15. La administración de sertralina modificó la reducción de la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el área CA3 del hipocampo producida por el estrés.** Mediante inmunohistoquímica se determinaron cambios en la inmunorreactividad de la CRMP-2 en el área CA3 del hipocampo (n=4 para cada condición). (A) Las microfotografías superiores (magnificación de 40x) muestran la inmunorreactividad representativa de la CRMP-2 en el área CA3 del hipocampo, y las microfotografías inferiores (magnificación de 160x) muestran que la inmunorreactividad se presenta principalmente en el soma de las neuronas. La barra negra representa 100  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la inmunorreactividad de la CRMP-2 expresada como promedio  $\pm$  EEM del H-SCORE. (C) Análisis del número de células en los rangos de marca muy alta, alta, moderada y débil. Los valores se expresan como los promedios  $\pm$  EEM de las frecuencias de distribución. En los animales controles se observó una distribución homogénea de células en el rango muy alto, alto y moderado. En los animales sometidos a estrés se observó un aumento en la proporción de células menos inmunorreactivas con respecto a los animales controles, efecto que fue modificado por la administración de sertralina. Análisis estadístico paramétrico ANOVA, Newman-Keuls. \*\*p<0,01 C vs R para la marca muy alta y moderada.