

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**EFFECTO DEL ESTRÉS SOBRE PROTEÍNAS ASOCIADAS A
CONECTIVIDAD SINÁPTICA Y CITOESQUELETO:
RELACIÓN CON LA ACCIÓN ANTIDEPRESIVA
DE SERTRALINA EN LA RATA.**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para
optar al grado académico de Doctora en Bioquímica por

PATRICIA CASTAÑEDA PEZO

Directora de Tesis

Dra. Jenny Fiedler Temer

Santiago, Chile

2009

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

PATRICIA GEORGINA CASTAÑEDA PEZO

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de la Tesis para optar al grado de Doctora en
Bioquímica, en el examen de defensa rendido con fecha:

.....

Directora de Tesis

Dra. Jenny Fiedler Temer

.....

Comisión Informante de Tesis

Dr. Guillermo Díaz (Presidente)

.....

Dr. Gonzalo Bustos

.....

Dr. Bruce Cassels

.....

Dr. Hernán Lara

.....

A mi muy querida familia

Agradecimientos

Esta tesis de doctorado fue realizada en el Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, y contó con el financiamiento de los proyectos:

- FID-1998-2001. Innovación y Mejoramiento Integral de la Formación Inicial de Docentes. UMCE.
- MECESUP 2005-2009. Fortalecimiento de cuadros académicos en entorno virtual y a distancia. UMCE.

La realización de esta tesis fue posible gracias a la ayuda, compañerismo y amistad de numerosas personas, a quines deseo expresar mis más sinceros agradecimientos:

- A la Dra. Jenny Fiedler, por su valiosa y continua asesoría en las diversas etapas de este trabajo de tesis, por brindarme un espacio de libertad para crear y por su amistad y cálida acogida
- A la Dra. Gabriela Díaz y al Dr. Sergio Mora, no sólo por su generosa ayuda y enseñanza en el estudio de la conducta animal, sino además por poder disfrutar de su fraternal y cálida amistad,
- Al Dr. Francisco Aboitiz, por su buena disposición y ayuda para realizar el estudio de espinas dendríticas,
- Al Dr. Hernán Lara a cuyo laboratorio llegué en un principio y fui acogida con cordialidad, como una más del grupo,
- A todos mis compañeras y compañeros del laboratorio, Paulina Rojas, Karina Araneda, Romina Rojas, Javier Bravo, José Luis Ulloa, Claudio Berríos, Sergio Andrés, por su amistad, compañerismo, ayuda en todo momento. Un agradecimiento especial a David Neira por su generosa ayuda en los diseños gráficos de esta Tesis,
- A Alejandra de Calisto, por su valiosa ayuda con los animales en el bioterio y por brindarme su amistad,
- A la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación por el apoyo brindado para la realización de este doctorado.; en especial al Director del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, Sr. Sergio Sanhueza.,
- A todos aquellos que de una u otra forma hicieron posible la realización de esta tesis.

INDICE GENERAL

	Página
INDICE.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
ABSTRACT.....	ix
RESUMEN.....	xii
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Depresión mayor.....	1
1.2. Alteraciones neuroanatómicas en sujetos con depresión mayor.....	2
1.3. Alteraciones morfológicas del hipocampo asociadas con la depresión.....	3
1.4. Etiología de la depresión y sus diversas hipótesis.....	3
1.4.1. La hipótesis de las monoaminas.....	4
1.4.2. La hipótesis de las neurotrofinas.....	4
1.4.3. La hipótesis neuroendocrina.....	5
1.4.4. La hipótesis de la neuroplasticidad.....	6
1.5. Fármacos inhibidores específicos de la recaptura de serotonina.....	7
1.6. Plasticidad en el proceso de remodelamiento dendrítico.....	9
1.6.1. Proteínas de conectividad sináptica y comunicación intracelular.....	11
1.6.2. Moduladores de conectividad y remodelamiento de citoesqueleto....	14
1.6.3. Proteínas asociadas al citoesqueleto de actina.....	16
1.7. Modelos animales de depresión.....	18

2.	HIPOTESIS.....	20
3.	OBJETIVOS.....	20
3.1.	OBJETIVO GENERAL.....	20
3.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	20
4	MATERIALES Y METODOS.....	21
4.1.	Reactivos generales.....	21
4.2.	Animales.....	21
4.3.	Tratamientos.....	22
4.3.1.	Estrés crónico por restricción de movimiento.....	22
4.3.2.	Tratamientos farmacológicos.....	22
4.4.	Determinación de parámetros fisiológicos.....	22
4.4.1.	Cambios en el peso corporal.....	23
4.4.2.	Determinación de los niveles séricos de corticosterona.....	23
4.5.	Pruebas conductuales.....	24
4.5.1.	Prueba de preferencia por una solución de sacarosa al 1% como agua de bebida.....	24
4.5.2.	Ensayo de la adquisición de una respuesta condicionada.....	25
4.5.3.	Prueba de natación forzada.....	26
4.6.	Preparación de tejidos para inmunohistoquímica.....	27
4.6.1.	Determinación inmunohistoquímica para β -catenina y N-cadherina..	27
4.6.2.	Cuantificación de la inmunoreactividad para β -catenina y N-cadherina.....	29
4.7.	Determinaciones por inmunowestern blot.....	30

4.8.	Preparación de tejidos para impregnación con tinción de Golgi.....	32
4.9.	Determinación del número de espinas dendríticas.....	32
4.10.	Análisis estadístico.....	33
4.10.1.	Análisis estadístico de los datos obtenidos en la inmunohistoquímica y en Immunowetern Blot.....	33
4.10.2.	Análisis estadístico del número de espinas dendríticas.....	33
5	RESULTADOS.....	34
5.1.	Efecto sobre parámetros fisiológicos.....	34
5.2.	Efecto del estrés y la sertralina sobre parámetros conductuales.....	37
5.2.1.	El estrés crónico provoca la disminución de conductas activas, efecto prevenido por la administración de sertralina.....	37
5.2.2.	El estrés crónico provoca un aumento en la conducta de desesperanza aprendida lo cual es prevenido por la administración de sertralina.	38
5.2.3.	El estrés crónico promueve la conducta anhedónica, la cual es prevenida por la administración de sertralina.....	39
5.2.4.	El estrés crónico disminuye la capacidad para adquirir respuestas condicionadas, lo que es prevenido por la administración de sertralina.....	41
5.2.5.	La restricción de movimiento disminuye la capacidad para evitar estímulos aversivos, efecto prevenido por la administración de sertralina.....	42
5.3.	Análisis de la densidad de espinas dendríticas.....	44
5.4.	Cambios moleculares asociados a plasticidad sináptica promovidos por estrés crónico y por la administración de sertralina.....	47
5.4.1.	Efecto del estrés crónico y de la administración de sertralina sobre los niveles de proteínas involucradas en la adhesión celular.....	48
5.4.1.1.	Efecto del estrés crónico y de la administración de sertralina sobre la inmunorreactividad y sobre los niveles de Ncadherina en el hipocampo.....	49

5.4.1.2.	Efecto del estrés crónico y de la administración de sertralina sobre los niveles y la inmunorreactividad de β catenina en el hipocampo...	53
5.4.1.3.	GSK3 β y su relación con los niveles de la β catenina.....	58
5.4.2.	Efecto del estrés crónico y de la administración de sertralina sobre los niveles de proteínas involucradas en el citoesqueleto de actina...	60
5.4.2.1.	RhoA y el citoesqueleto de actina.....	60
5.4.2.2.	Cofilina y el citoesqueleto de actina.....	62
6.	DISCUSIÓN.....	65
6.1.	Evolución del concepto de estrés.....	65
6.2.	Marcadores de estrés y el efecto de sertralina.....	66
6.3.	Efecto del estrés y de sertralina en conductas asociadas a la depresión.....	69
6.4.	El efecto del estrés y de sertralina sobre los niveles de proteínas asociadas a conectividad sináptica y citoesqueleto.....	73
6.4.1.	N-cadherina y β -catenina: proteínas de conectividad sináptica y comunicación intracelular.....	74
6.4.2.	GSK3 β : modulador de conectividad y remodelamiento de citoesqueleto.....	78
6.4.3.	RhoA y cofilina y su participación en el citoesqueleto de actina.....	81
7.	CONCLUSIONES.....	86
8.	LIMITACIONES Y PROYECCIONES DEL ESTUDIO.....	88
9.	REFERENCIAS.....	89

INDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Estructura química de la sertralina. La sertralina (<i>clorhidrato de (1S)-cis-4-(3,4 diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-N-metil-1-naftalenamina</i>) es una Inhibidor Especifico de la Recaptura de la Serotonina (SSRI).....	7
2. Distintos tipos de espinas dendríticas. Se destacan en forma de filamentos (filopodio), prominencia corta (<i>stubby</i>), de callampa o en forma de copa.....	11
3. Modelo propuesto para la retracción neurítica inducida por LPA, que estaría mediada por la activación de GSK3 β a través de RhoA y G α 13.....	15
4. Diagrama que ilustra un corte coronal de hipocampo. Se muestran las distintas regiones del Cuerno de Amon y del Giro Dentado.....	29
5. Ganancia en peso corporal previa al inicio del estrés. Durante la primera semana los cuatro grupos fueron sólo manipulados para pesarlos y posteriormente se iniciaron los tratamientos.....	35
6. El estrés crónico y la administración crónica de sertralina reducen significativamente la ganancia de peso corporal. A partir del 5º día de restricción o administración de Sertralina la diferencia entre C vs CS y entre C y R, se hacen estadísticamente significativas.....	35
7. Conductas activas en el ensayo de natación forzada. El estrés disminuye estas conductas y la sertralina las previene.....	38
8. El estrés crónico incrementa la desesperanza aprendida, efecto prevenido por la sertralina.....	39
9. Prueba de evaluación de la conducta anhedónica. El estrés aumenta la conducta anhedónica y la sertralina la previene	40
10. Adquisición de respuesta condicionada. El estrés gatilla alteraciones cognitivas que son prevenidas por sertralina	42
11. Prueba de evitación activa La sertralina previene la falla en el escape	43

12.	Neurona piramidal del área CA1 con sus dendritas	45
13.	La densidad de espinas dendríticas cambia por el estrés y por el tratamiento con sertralina.	46
14.	Esquema que muestra los marcadores proteicos a determinar en el modelo animal sometido a restricción por movimiento y a la administración de sertralina.....	48
15.	Microfotografía representativa de la distribución de la inmunorreactividad de N-cadherina.....	50
16.	Respuesta de N-cadherina al estrés y a sertralina en la región CA1 del hipocampo.....	51
17.	Respuesta de N-cadherina al estrés y a sertralina en la región CA3 del hipocampo.....	52
18.	El estrés crónico junto con la administración simultánea de sertralina inducen un aumento significativo en los niveles de β-catenina.....	54
19.	Microfotografía representativa de la distribución de la inmunorreactividad de β-catenina.....	55
20.	Cuantificación densitométrica de la inmunoreactividad de βcatenina en el área CA1	56
21.	Cuantificación densitométrica de la inmunoreactividad de βcatenina en el área CA3.....	57
22.	Niveles de GSK3 β y su forma fosforilada.....	59
23.	Microfotografía representativa de la distribución de la inmunorreactividad de RhoA.....	61
24.	El estrés crónico induce un aumento en los niveles de RhoA determinada por western blot.....	62
25.	Niveles de cofilina en extractos de hipocampo determinada por Western blot.....	63
26.	Integración de los resultados conductuales, morfológicos y conductuales..	87

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Parámetros farmacocinéticas y farmacológicos de sertralina.....	9
2.	Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica de β - catenina y N-cadherina.....	28
3.	Anticuerpos y condiciones utilizadas en los ensayos de western.....	31
4.	Efecto del estrés y del tratamiento con sertralina sobre la masa de la adrenal y los niveles séricos de corticosterona.....	36
5.	Resumen del efecto de la restricción de movimiento y la administración de sertralina sobre marcadores fisiológicos del estrés y pruebas conductuales asociadas a desesperanza aprendida.....	44
6.	Resumen del efecto del estrés y de la sertralina sobre marcadores morfológicos y proteicos.....	64

ABREVIATURAS

ACTH	: Hormona adrenocorticotropa
AD	: Antidepresivo
APA	: American Psychiatry Association
ARC	: Adquisición de respuesta condicionada
AVP	: Péptido arginina vasopresina
BDNF	: Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	: Albúmina de suero de bovino
CA1	: Area 1 del Cuerno de Amon
CA3	: Área 3 del Cuerno de Amon
CREB	: Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico
CRH	: Hormona liberadora de corticotropina
DAB	: Diaminobencidina
DM	: Depresión mayor
DSM-IV	: Manual Estadístico y Diagnóstico de Desórdenes Mentales
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	: Etilen- bis(oxonitrilo)]tetra-acetato
FE	: Falla en el escape
GCs	: Glucocorticoides
GD	: Giro dentado
GR	: Receptor de glucocorticoides
HEPES	: 4 (2-hydroxyethyl)- 1 ácido piperazineetanosulfónico
HHA	: Hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal
IHQ	: Inmunohistoquímica
ISRS	: Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
LPA	: Acido Lisofosfatídico
MRI	: Resonancia magnética de imágenes
NGS	: Normal Goat serum
NT	: Neurotransmisor
PBS	: Tampón fosfato salino
PET	: Tomografía de emisión de positrones
PMSF	: Parametilsulfóxido
PVN	: Núcleo paraventricular
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SNC	: Sistema nervioso central
TAE	: Tris-Acetato-EDTA
TBE	: Tris-Borato-EDTA
TEMED	: N,N,N,N'-Tetrametilnediamina
TSH	: Hormona estimulante de la tiroides

ABSTRACT

EFFECT OF STRESS ON PROTEINS ASSOCIATED TO SYNAPTIC CONNECTIVITY AND CYTOSKELETON: RELATIONSHIP WITH ANTIDEPRESSANT ACTION OF SERTRALINE IN RAT.

Depression is one of the most frequent forms of mood disorders and one of the most prevalent mental diseases in Chile. Although the etiology of major depression is not yet fully understood, it has been proposed an impairment of serotonergic and/or noradrenergic neurotransmission within the central nervous system (CNS). These changes are also correlated with a reduction or even an increase in growth factors in specific brain areas. Pharmacological treatments for this disorder are designed to improve serotonin or noradrenaline bioavailability through a blockade of their reuptake from neuron terminals in CNS structures.

Several evidences showed that genetic and environmental factor such as stressful life events may contribute to the development of this psychiatric disorder. Chronic restraint stress increases the sympathetic nervous tonus and the neuroendocrine response of hypothalamic-pituitary-adrenal axis triggering the secretion of adrenal corticoids. About 50% of depressed patients show increased levels of corticoids. It has been shown in animal models that corticoids affect certain brain regions promoting dendrites atrophy mainly in neurons of prefrontal cortex and the hippocampus, a structure related with processes of memory and learning. Also it has been reported changes in the morphology and reduction in the number of dendritic spines, which correspond to specialized cellular compartments involved in the synaptic transmission. Changes in dendrite arborization, spine morphology and cell-adhesion proteins are important for the **recognition of pre- and postsynaptic** components (eg. N-cadherin/ β -catenin) and also are critical for neural network formation and information processing. These modifications probably involve the cytoskeleton and could occur through a dynamic process of extension and retraction of both dendritic tree and spines to form an appropriate synaptic contact. Previous research suggests that depressive disorder is associated with impairments in dendrite remodeling of neurons based on the atrophy observed in some brain areas. Although the precise cellular mechanism underlying the morphological changes in dendrites is still unknown, it is probable that transductional

pathways controlling actin and microtubule polymerization could be affected in major depression. It is postulated that serotonin and noradrenalin neurotransmitters regulate spines actin dynamics through the recruitment of actin regulators. Among these are the Rho-GTPases (small G protein family) which transduces extracellular signals to the actin cytoskeleton thereby regulating axon polarity, formation of synapses during development. In hippocampal organotypic culture, RhoA is present in the dendritic tree and dendritic spines in clusters co-localized with F-actin. Moreover, a negative dominant of RhoA inhibits axonal growth while increases dendritic growth of hippocampal neurons. Cofilin is one effector of RhoA signaling, which in its active form (dephosphorylated) enhances the F-actin depolymerization and severing. Also in major depression is important to establish modifications in proteins related to synaptic recognition and maintenance of neural connections. Among these proteins, the interaction between N-cadherin and β -catenin has been associated with synapse remodeling. Also, β -catenin can act as transcription factor regulating the expression of some neural genes. The levels of β -catenin can be regulated by GSK3 β phosphorylation, a modification that stimulates its degradation by the proteasome. The GSK3 β also has been implicated in several cellular functions, including cytoskeleton dynamics by phosphorylation of microtubule associated proteins such as Tau, MAP-1B and MAP-2. Recently it has been described GSK3 β activation through RhoA-dependent mechanism. These results indicate that GSK3 β could act as a key regulator of synaptic connectivity through β -Catenina and/or in dendrite remodeling. Based on these evidences, following hypothesis was stated:

Chronic stress by restraint of motion, such as animal model of depression, causes changes in both behavioral and levels cytoskeleton-associated protein and synaptic connectivity, effects prevented by sertraline antidepressant.

To study this hypothesis, male Sprague-Dawley rats were subjected to 2.5h of daily restraint stress during 14 days. These animals were chronically injected with either saline or 10 mg/kg sertraline, i.p. Chronic restraint stress reduced the body weight gain and increased adrenal gland weight, being both effect not prevented by sertraline treatment. Chronically restrained animals showed depression-like behaviors including reduction in the preference

for a 1% sucrose solution as drinking water, which resembles anhedonic behavior. Also this animals showed a reduce acquisition of conditioned responses, which correlates with impairments in cognitive abilities. Restraint stress elicited escape deficit in the active avoidance test and increased immobility in the forced swim test, behaviors indicative of learned helplessness. Antidepressant treatment to unstressed animals reduced **acquisition** of conditioned avoidance response in a 30% in comparison to controls and promoted 5% escape failures. These changes suggest that chronic stress affects neural circuitry and therefore it was important to evaluate changes in the spine density of pyramidal neurons of hippocampus as a measure of neuron connectivity and also in proteins related to synapse connectivity and cytoskeleton. Sertraline administration to unstressed animals elicited a reduction in spine density of basal dendrites of CA1 pyramidal neurons, effect which can be related to the cognitive impairment observed in these animals. Similarly, stressed animals revealed a reduction in spine density of CA1 dendrite, effect which could not be prevented by sertraline administration. Thus it is feasible that changes in spine morphology could explain the recovery observed in associative learning and helplessness in animals treated chronically with antidepressant.

Restraint stress reduces N-cadherin but not β -catenin immunoreactivity in CA3 stratum oriens, an effect partially prevented by sertraline. Also, sertraline administration to control animals promoted an increase in β -catenin immunoreactivity in stratum oriens of CA3. In contrast, stressed animals treated with sertraline showed an increase in β -catenin but not in N-cadherin immunoreactivity of CA1 stratum oriens, a result in accordance with the rise of β -catenin observed in immune western assay. The stress protocol and the administration of sertraline to control and stressed animals promoted an increase in GSK3 β determined in hippocampal extracts. In these conditions, a reduction in the ratio pGSK3 β / GSK3 β was observed. Hippocampal extract of stressed animals showed an increase in RhoA levels, an effect not prevented by sertraline treatment. Also the increase in RhoA levels was not correlated with changes in p-cofilin. It may be concluded that stress and sertraline treatment produce differential effect on the hippocampus involving changes in proteins related to synaptic connectivity. These findings give new insights in antidepressant mechanisms of action.

RESUMEN

La depresión es una de las formas más frecuentes de los trastornos del ánimo y es una de las enfermedades mentales más frecuentes en Chile. Aunque la etiología de la depresión mayor aún no es completamente comprendida, se ha propuesto una alteración en el sistema nervioso central (SNC). Esos cambios también se correlacionan con una reducción o un aumento de los factores de crecimiento en áreas específicas del cerebro. Los tratamientos farmacológicos para este trastorno, mejoran la biodisponibilidad de serotonina o noradrenalina a través del bloqueo de la recaptación de estos neurotransmisores por los terminales nerviosos presentes en estructuras del SNC.

Diversas evidencias muestran que factores genéticos y ambientales tales como eventos estresantes podrían contribuir al desarrollo de los desórdenes psiquiátricos. El estrés crónico aumenta el tono nervioso simpático y la respuesta neuroendocrina del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal provocando la secreción de corticoides adrenales. Alrededor del 50% de los pacientes con depresión muestran niveles mayores de corticoides. En modelos animales, se ha mostrado que los corticoides afectan ciertas regiones del cerebro promoviendo atrofia dendrítica principalmente en neuronas de la corteza prefrontal y del hipocampo, una estructura relacionada con procesos de memoria y aprendizaje. También se ha informado de una reducción y cambios en la morfología de las espinas dendríticas, que corresponden a compartimentos celulares especializados e implicados en la transmisión sináptica. Los cambios en la arborización dendrítica, la morfología de las espinas dendríticas y las proteínas de adhesión celular importantes para el reconocimiento de los **componentes pre-y postsinápticos** (por ejemplo, N-cadherina / β -catenina) son eventos fundamentales tanto para la formación de circuitos neuronales como para el procesamiento de información. Estas modificaciones probablemente estén relacionadas con el funcionamiento del citoesqueleto, a través de un proceso dinámico de la extensión y retracción de los árboles y las espinas dendríticas; formando un contacto sináptico apropiado. La atrofia observada en algunas áreas cerebrales sugiere que la depresión se asocia con alteraciones en la remodelación dendrítica en neuronas. Aunque se desconoce el mecanismo celular que da cuenta de los cambios morfológicos observados en las dendritas,

es probable que en la depresión se encuentren afectadas las vías transduccionales que controlan la polimerización de la actina y de los microtúbulos.

Se ha postulado que los neurotransmisores como la serotonina y la noradrenalina regulan la dinámica de la actina en las espinas dendríticas a través del reclutamiento de reguladores de la actina. Entre éstas están las Rho-GTPasas (familia de proteínas G pequeñas), que transducen las señales extracelulares hacia el citoesqueleto de actina con lo que se regula la polaridad del axón y la formación de sinapsis durante el desarrollo. En cultivos organotípicos de hipocampo, la RhoA está presente en el árbol dendrítico y las espinas dendríticas co-localizado con F-actina. Por otra parte, el dominante negativo de RhoA inhibe el crecimiento axonal y aumenta el crecimiento dendrítico de las neuronas del hipocampo. La cofilina es un efector de la señalización de RhoA, que en su forma activa (desfosforilado) mejora la despolimerización de actina y el corte de F-actina.

Se ha postulado que la serotonina y la noradrenalina regulan la dinámica del citoesqueleto de actina a través del reclutamiento de moduladores de actina. Entre éstos están las Rho-GTPasas (familia de proteína G pequeña), las cuales transducen señales extracelulares al citoesqueleto de actina regulando la polaridad del axón, formación de sinapsis durante el desarrollo. En cultivos organotípicos de hipocampo, RhoA está presente tanto en los árboles y espinas dendríticas, colocalizando con F-actina. Más aún, dominantes negativos de RhoA, inhiben el crecimiento axonal, incrementando el crecimiento dendrítico de neuronas hipocampales. Cofilina es un efector de la señal de RhoA, la cual en su forma activa (desfosforilada) aumenta la depolimeración de F-actina.

Durante los cuadros depresivos, también podrían establecerse modificaciones en las proteínas relacionadas con el reconocimiento sináptico y el mantenimiento de las conexiones neuronales. Entre estas proteínas, se ha definido la importancia de la interacción entre N-cadherina y β -catenina la cual se ha asociado con la remodelación de sinapsis. Además, β -catenina puede actuar como factor de transcripción regulando la expresión de algunos genes neuronales. Los niveles de β -catenina pueden estar regulados por fosforilación mediante la GSK3 β , modificación que estimula su degradación por el

proteosoma. La GSK3 β también ha sido implicada en varias funciones celulares, como la dinámica del citoesqueleto al participar en la fosforilación de proteínas asociadas a los microtúbulos, tales como Tau, MAP-1B y MAP-2. Recientemente se ha descrito la activación GSK3 β a través de un mecanismo dependiente de RhoA. Estos resultados indican que GSK3 β podría actuar como un regulador clave de la conectividad sináptica a través de β -catenina y/o en la remodelación de las dendritas.

Basado en estas evidencias, se propuso la siguiente hipótesis: *El estrés crónico por restricción de movimiento, como modelo de depresión animal, provoca cambios tanto conductuales como en los niveles de proteínas asociadas a citoesqueleto y conectividad sináptica, efectos prevenidos por el antidepresivo sertralina.*

Para estudiar esta hipótesis, ratas machos Sprague-Dawley, fueron sometidas a restricción de movimiento por 2,5 h/día durante 14 días. Estos animales fueron inyectados crónicamente vía i.p. con solución salina, 10 mg / kg de sertralina. El estrés crónico redujo la ganancia de peso, incluyendo la reducción en la preferencia por una solución de sacarosa al 1% como agua de bebida, lo cual es análogo a una conducta depresiva. También estos animales mostraron una reducida adquisición de respuestas condicionadas, lo cual se correlaciona con los impedimentos en las habilidades cognitivas. El estrés por restricción provoca déficit en la conducta de escape en la prueba de evitación activa e incrementa la inmovilidad en la prueba de nado forzado, señalando con esto una conducta de desesperanza aprendida. El tratamiento con antidepresivo en animales no estresados mejora en un 30% la capacidad de respuestas condicionadas respecto del control y promueve un 5% el fracaso de la prueba de falla en el escape.

Estos cambios sugieren que el estrés crónico afecta circuitos neuronales y por lo tanto fue importante evaluar cambios en la densidad de espinas de neuronas piramidales del hipocampo, como una medida de la conectividad neuronal y también de proteínas relacionadas con conectividad sináptica y citoesqueleto. La administración de sertralina en animales no estresados induce una reducción en la densidad de espinas dendríticas basales de las neuronas piramidales del área CA1, efecto que podría estar relacionado a los

impedimentos cognitivos observados en los animales. De igual modo los animales estresados mostraron una reducción en la densidad de espinas dendríticas en el área CA1, efecto que no pudo ser prevenido por la administración de sertralina. Así, es posible que cambios en la morfología de las espinas pudieran explicar en parte, lo observado en aprendizaje asociativo y las conductas de desesperanza aprendida en animales tratados crónicamente con antidepresivo.

El estrés por restricción redujo la inmunorreactividad de N-cadherina, pero no de catenina, en la región del estrato oriens correspondiente al área CA3 del hipocampo. Este efecto fue parcialmente prevenido por sertralina. Además la administración de sertralina a los animales controles promovió un aumento en la inmunorreactividad de β -catenina en el estrato oriens de CA3. Por el contrario, los animales sometidos a estrés y tratados con sertralina mostraron un aumento en la inmunorreactividad de β -catenina pero no de N-cadherina en la región correspondiente al estrato oriens de CA1; este resultado se condice con el aumento de β -catenina observado en los ensayos inmunológicos. Tanto el protocolo de estrés como la administración de sertralina a animales controles y sometidos a estrés, promovió un aumento en los niveles de GSK3 β en extractos de hipocampo. En estas condiciones se observó una reducción en el valor de la razón pGSK3 β /GSK3 β . Los extractos hipocampales de los animales sometidos a estrés mostraron un incremento en los niveles de RhoA, efecto que no pudo ser prevenido por el tratamiento con sertralina. El aumento de RhoA no se correlacionó con los cambios en p-cofilina.

Se puede concluir que el estrés y el tratamiento con sertralina producen efectos diferenciales en el hipocampo, que involucran cambios en los niveles de proteínas relacionadas con la conectividad sináptica. Estos resultados abren una nueva vía de investigación centrada en los mecanismos de acción de los antidepresivos.

1. INTRODUCCIÓN.

La depresión es un trastorno del ánimo que puede involucrar alteraciones conductuales, cognitivas y neuro-endocrinas en las personas que la padecen. Debido a la diversa sintomatología observada en sujetos con depresión es probable que la etiología sea compleja y que involucre múltiples alteraciones; sin embargo, se ha propuesto que el estrés crónico podría ser un elemento gatillante de ésta (Nestler y cols. 2002). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud esta patología es un trastorno del ánimo que el paciente no puede eliminar en forma voluntaria y que afecta su calidad de vida y la de quienes lo rodean (APA 1999). Se ha señalado que para el año 2020 la depresión mayor será la segunda causa de consultas médicas en los países desarrollados lo que ha promovido una intensa investigación en este tema (Murray y cols. 1996).

1.1. Depresión mayor

La depresión mayor adquiere cada día más importancia en países desarrollados en donde se ha asociado un alto nivel de estrés y en el caso de Chile afecta a más de un 10% de la población (Rojas y cols. 1997; Vicente 2002). La sintomatología del cuadro depresivo es heterogénea; es decir, los individuos pueden presentar ánimo deprimido, irritabilidad, pérdida de interés por estímulos placenteros (sexo, comida, interacciones sociales), fatiga, baja autoestima, sentimiento de desamparo y culpabilidad y una capacidad reducida de concentración y de aprendizaje. Además, esta sintomatología está asociada a alteraciones neurovegetativas tales como el apetito y el sueño, cambios en el ritmo circadiano y también pueden observarse alteraciones sicomotoras y pensamientos recurrentes de suicidio (Fava y cols. 2000; Nestler y cols. 2002). Aunque se desconoce el origen de esta patología, existen factores de riesgos tanto genéticos como ambientales. Se ha señalado que aproximadamente el 40% del riesgo a la enfermedad podría tener un origen hereditario (Fava y cols. 2000) y se ha inferido que múltiples genes contribuyen al riesgo de la depresión.

Entre los factores no genéticos que predisponen a la patología se encuentran los traumas emocionales, algunas alteraciones endocrinas y el estrés; siendo este último considerado como un elemento gatillante de la depresión (Nestler y cols. 2002). Aunque las bases

anatómicas neuroquímicas y fisiológicas de esta patología están sujetas aún a intensa investigación, se sabe que existen alteraciones anatómicas y funcionales de ciertas áreas cerebrales que pueden ser causa o consecuencia de esta patología (Manji y cols. 2001; Duman 2004).

1.2. Alteraciones neuroanatómicas en sujetos con depresión mayor.

Se ha reportado que sujetos con depresión mayor presentan alteraciones anatómicas asociadas a la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo (Sapolsky 2000; Vakili y cols. 2000; Botteron y cols. 2002; Bowley y cols. 2002). La comparación de tomografía de emisión de positrones (PET) entre pacientes depresivos y controles, ha mostrado anormalidades en el flujo sanguíneo y en el metabolismo de la glucosa tanto en la corteza pre-frontal y límbica (Drevets 2000). Estas diferencias podrían reflejar **cambios en la neurotransmisión** asociados a los síntomas depresivos, ser un reflejo de **alteraciones en el número de células y contactos sinápticos**, o bien corresponder a cambios en la función cerebro-vascular (Botteron y cols. 2002; Drevets y cols. 2002). Algunos estudios post-mortem de sujetos depresivos muestran una **reducción volumétrica** en la corteza cingulada anterior, el hipocampo, la amígdala, y en el estriado ventral (Rajkowska 2000; Drevets y cols. 2002). Esta reducción del volumen se ha correlacionado con una **disminución en el número de células gliales** y acompañada por una **disminución en el tamaño neuronal**, aunque no con una pérdida de éstas (Rajkowska 2000; Eastwood y cols. 2001). Se ha postulado que la reducción del número de células gliales en la amígdala y en la corteza prefrontal, podría explicar las respuestas anormales frente a estímulos emotivos (Ongur y cols. 2000). Las glías están involucradas en el metabolismo activo de la glucosa, siendo éstas el primer sitio de captura de glucosa durante la actividad neuronal y por lo tanto serían muy sensible a los cambios en el metabolismo de este azúcar (Tsacopoulos y cols. 1996). Sin embargo, aún queda por investigar si realmente son los cambios morfológicos los que desencadenan la depresión o bien si éstos son una consecuencia de la patología (Rajkowska 2000).

1.3. Alteraciones morfológicas del hipocampo asociadas con la depresión.

De todas las áreas cerebrales que se ven afectadas en la depresión mayor, el hipocampo es una de las que ha sido intensamente estudiada (Sheline y cols. 1996; Magarinos y cols. 1997; Fuchs y cols. 1998; McEwen 1999; Gould y cols. 2000), debido a que esta área está involucrada en memoria declarativa y episódica, aprendizaje espacial y contextual; que son procesos alterados en la depresión mayor (McEwen y cols. 1995). Más aún, estudios de imágenes por resonancia magnética de imágenes (MRI) y PET muestran cambios en el volumen la densidad celular y en el contenido de agua (Sheline y cols. 1996; MacQueen y cols. 2003). Finalmente, se ha descrito en sujetos depresivos una alteración del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA siendo el hipocampo una de las estructuras que controlan negativamente la actividad de dicho eje (Nestler y cols. 2002; Barden 2004).

Se ha descrito que el estrés y los glucocorticoides serían los principales factores que alteran la función hipocampal (Fuchs y cols. 1998; Gould y cols. 1999; Duman 2004; Nacher y cols. 2004). Estudios realizados en ratas sometidas a estrés por restricción de movimiento ó a altas dosis de corticosterona han mostrado atrofia en las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo; asociada fundamentalmente a **retracción de las dendritas** (Magarinos y cols. 1997; Vyas y cols. 2002) y a su vez a **una reducción en la neurogénesis** en la capa subgranular del giro dentado,(Gould y cols. 1999; McKittrick y cols. 2000; Wood y cols. 2004). En pacientes con depresión mayor recurrente, se ha descrito un **menor volumen del hipocampo** comparado con pacientes controles, lo que se ha atribuido a una atrofia hipocampal (Sheline y cols. 1996); en cambio no se ha encontrado ninguna diferencia de volumen significativa (Vakili y cols. 2000) especialmente cuando el evento depresivo es agudo y no recurrente en el tiempo (Sheline y cols. 1999).

1.4. Etiología de la depresión y sus diversas hipótesis

El mecanismo molecular preciso de los desórdenes del ánimo aún sigue siendo desconocido y la neurociencia aborda la problemática desde diferentes aproximaciones en un intento por avanzar en el entendimiento de estas patologías, entre ellas la depresión. El tratamiento de la depresión ha sido abordado a través de tres aproximaciones diferentes: la farmacoterapia, ciertas formas de psicoterapias y la terapia electroconvulsiva (Nemeroff y

cols. 2002); pero el tratamiento más recurrente sigue siendo el uso de fármacos antidepresivos.

1.4.1 La hipótesis de las monoaminas

La farmacoterapia de la depresión surge por casualidad hace más de 50 años, cuando se observó que la imipramina un fármaco antihistamínico con estructura tricíclica, tenía efectos antidepresivos y la iproniazida, fármaco usado para el tratamiento de la tuberculosis, elevaban el ánimo de los pacientes que lo recibían (Castren 2005). Luego de este descubrimiento, se encontró que la imipramina y la iproniazida incrementaban la concentración extracelular de la serotonina y la noradrenalina porque bloqueaban su recaptura por las terminales nerviosas o porque inhibían a la enzima relacionada a la catabolización de las aminas biogénicas (monoamino oxidasa). De acuerdo a estos antecedentes se propuso que la depresión podría ser producida por una deficiencia en serotonina (5HT) o noradrenalina (NA) lo que pasó a denominarse **hipótesis monoaminérgica** de la depresión (Nestler y *cols.* 2002; Castren 2005; Paez-Pereda 2005). En la actualidad, uno de los neurotransmisores más estudiados es la serotonina y la evidencia a favor de su participación surge de los estudios que muestran que la manipulación farmacológica de ésta atenúa la depresión (Blier y *cols.* 2003). Además, esto se vió avalado por el hallazgo de bajos niveles de su metabolito el ácido 5-hidroxi- indol acético (5-HIAA) en el fluido cerebro espinal sujetos depresivos víctimas de suicidios o personas que han intentado suicidarse (Blier y *cols.* 2003).

1.4.2. La hipótesis de las neurotrofinas

Sin embargo, no sólo los neurotransmisores han sido objeto de estudio en búsqueda de blancos terapéuticos. Investigaciones realizadas en animales han mostrado que la administración crónica y no la aguda, de fármacos inhibidores de la recaptura de 5-HT y NA activan la cascada cAMP – CREB en hipocampo de rata (Duman y *cols.* 1997). Además, estudios en el hipocampo de rata han mostrado que el gen del factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*) es blanco tanto de CREB (Nibuya y *cols.* 1996). Se ha observado que la infusión bilateral de BDNF en el giro dentado, produce un efecto antidepresivo en dos modelos de depresión de ratas; obteniendo resultados comparables en

magnitud con una administración sistémica de antidepresivo (Shirayama *y cols.* 2002). De forma similar, en cerebros post-mortem de pacientes tratados con antidepresivos se observó un aumento del BDNF en el hilus y en el giro dentado del hipocampo (Chen *y col.*, 2001). La participación de BDNF llevó a proponer la **hipótesis de las neurotrofinas**, cuya deficiencia podría ser la causa de la depresión. De hecho, los factores neurotróficos son reguladores del crecimiento y la diferenciación celular durante el desarrollo del sistema nervioso, y en las neuronas adultas tienen un importante papel en la supervivencia y en la plasticidad celular (Castren 2004). Sin embargo, hoy en día esta hipótesis ha perdido fuerza frente a la evidencia de que el inicio de la acción terapéutica de estos fármacos se requieren en general de 2 a 3 semanas, por otra parte el fármaco no eleva el ánimo en individuos sanos. Además, en modelos animales se ha propuesto que el mecanismo de acción de algunos antidepresivos como desipramina y fluoxetina, no requerirían de la participación de CREB como ha sido postulado (Conti *y cols.* 2002; Slattery *y cols.* 2004).

1.4.3. La hipótesis neuroendocrina

Estudios en modelos animales han aportado una fuerte evidencia que una desregulación en el sistema HHA principal eje regulador de la respuesta a estrés, juega un importante papel en la depresión (Holsboer 2000). La principal respuesta endocrina frente al estrés es la vía de activación del eje HHA que provoca la descarga de las neuronas ubicadas en los núcleos paraventriculares (PVN) del hipotálamo, permitiendo la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF) que estimula la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) desde la adenohipófisis, la que a su vez, estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides desde la corteza suprarrenal. A su vez, éstos ejercen una retroalimentación negativa mediante la unión a sus receptores presentes en el hipotálamo y en la hipófisis (Aguilera 1994; Holsboer 2000). Estudios en humanos y en animales han señalado que el estrés provoca una alteración en el ritmo de secreción de glucocorticoides que incide negativamente en las habilidades cognitivas, tales como la capacidad de nuevos aprendizajes y la pérdida de memoria. Además se han observado alteraciones en la morfología dendrítica, inhibición de la neurogénesis, retracción dendrítica en el área CA3 del hipocampo y pérdida de peso corporal (Gould *y cols.* 1999; Kim *y cols.* 2002; Sapolsky 2003; Engelmann *y cols.* 2004). Estas observaciones han llevado a proponer que un alza

sostenida de glucocorticoides – **hipótesis neuroendocrina** - genera alteraciones neuronales que desembocan en depresión.

1.4.4 La hipótesis de la neuroplasticidad

La hipótesis que recientemente se ha ensayado, es la influencia de tratamientos crónico con antidepresivos sobre la neurogénesis y neuroplasticidad (Czeh y cols. 2001; Castren 2004). Estudios realizados en rata con marcadores de división celular muestran que el tratamiento crónico con antidepresivos incrementa el número de nuevas células en la capa granular del giro dentado; observándose una muy buena respuesta a fluoxetina y reboxetina pero no a medicamentos psicotrópicos (Malberg y cols. 2000). Adicionalmente la fluoxetina no sólo incrementa el número de células hipocampales, sino que además éstas maduran y se diferencian a neuronas (Malberg y cols. 2000; Manev y cols. 2001). Esto llevó a proponer la **hipótesis de la neuroplasticidad**, la que sugiere que la acción de los antidepresivos cursa a través de fenómenos lentos como la diferenciación, la prolongación y maduración de los procesos dendríticos; es decir involucra un remodelamiento dendrítico que facilita una eficaz comunicación sináptica. Además se ha observado mediante estudios de imágenes cerebrales, que pacientes depresivos presentan un aumento en el metabolismo de la glucosa en la amígdala y en la corteza cingulada; lo cual se reduce en aquellas personas que responden a la terapia con antidepresivos (Drevets y cols. 2002). En relación al efecto de éstos fármacos sobre el remodelamiento sináptico, estudios realizados en cortes de cerebros de conejo tratados con fluoxetina, muestran que el antidepresivo altera la expresión de neurofilamentos involucrados en la estructura y en el remodelamiento de las sinapsis axo-dendríticas (Guest y cols. 2004). Hasta el momento, existen algunas evidencias experimentales que señalan los efectos de algunos fármacos antidepresivos favorecen la neurogénesis, y probablemente la diferenciación neuronal e incluso se ha detectado la presencia de proteínas marcadoras de proyecciones sinápticas. Sin embargo, aún es poco claro si las células generadas son funcionalmente activas y más aún si se relacionan con las respuestas antidepresivas. La plasticidad neuronal involucra, entre otras cosas, estabilización de la sinapsis activa y una conectividad neuronal óptima (Castren 2004). Al respecto, se ha sugerido que en los desórdenes del ánimo, la conectividad neuronal podría

estar reducida (Castren 2004) basándose en que la atrofia producto del estrés no está asociada a una pérdida neuronal.

1.5. Fármacos inhibidores específicos de la recaptura de serotonina

El interés por buscar nuevos blancos farmacológicos, ha llevado recientemente a investigar las vías de señalización que median la respuesta al estrés y a los desórdenes del ánimo (Gould y cols. 2002; Nguyen y cols. 2003). Un grupo importante de fármacos ampliamente utilizados en los últimos años, son los inhibidores específicos del transportador de la serotonina (SSRI). La recaptura de serotonina bloqueada por los SSRI, incrementa la concentración de ésta en el espacio sináptico dentro de pocos minutos luego de su administración; sin embargo su acción clínica sólo se observa luego de algunas semanas (DeVane 1999). Entre estos fármacos destaca la sertralina (Fig 1) la cual ha demostrado ser clínicamente efectiva y bastante bien tolerada en el tratamiento de la depresión mayor (DeVane 1999). Trabajos recientes han demostrado que el retardo en la acción de este fármaco podría ocurrir vía un aumento en la síntesis de serotonina mediante la regulación positiva tanto de la expresión del gen como de los niveles de la actividad de la triptófano hidroxilasa; enzima que sintetiza serotonina a partir de triptófano (Kim y cols. 2002). Por otra parte, experimentos realizados en ratas señalan que la administración de sertralina, incrementa los niveles de triptófano y de serotonina en todo el cerebro de animales de experimentación (Nakayama y cols. 2003).

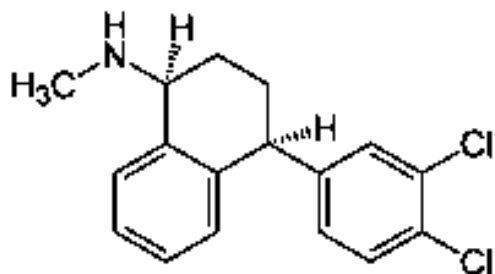


Figura 1. Estructura química de la sertralina. La sertralina (*clorhidrato de (1S)-cis-4-(3,4diclorofenil) - 1,2,3,4-tetrahidro-N-metil-1-naftalenamina*) es un Inhibidor Específico de la Recaptura de Serotonina (SSRI).

La sertralina cuando se administra por vía oral en una dosis única, alcanza su máxima concentración en el plasma después de 6 – 8 horas (Tabla 1). La biodisponibilidad absoluta se estima sobre un 44% y su grado de unión a proteínas plasmáticas se estima sobre un 98,5% (Leonard 1995). Se ha determinado si las dosis efectivas en roedores son comparables a aquellas logradas en humanos, encontrándose que la inyección i.p. de sertralina de 10 mg/Kg durante siete días genera una concentración plasmática de 43.7 ± 2.7 ng/ml y de 23.1 ± 2.7 ng/ml en animales inyectados con 5 mg/Kg (Peng y cols., 2008). Estos niveles son comparables a los detectados (20 – 200 ng/ml) en pacientes depresivos tratados con dosis orales entre 100-200mg/diarios (De Vane, 1999). Mas aún, de acuerdo a la similitud que existe en las K_i para la sertralina por el transportador de serotonina (0,29 nM vs 0.15 nM) sugeriría que la dosis de 10 mg/Kg es apropiada para hacer estudios del efecto del fármaco sobre la conducta y cambios moleculares en sistema nervioso (Tabla 1).

La principal vía de metabolización de este fármaco ha sido establecida en animales y se presume que sería similar en humanos. La eliminación ocurre mediante el metabolismo hepático a través de la familia de citocromos P450, siendo el principal metabolito, la desmetilsertralina que posee muy poca actividad farmacológica tanto *in vitro* como *in vivo* (Gupta y cols. 1994; DeVane 1999). La otra vía metabólica de la sertralina es la formación de ácido carbámico y N-hidroxisertralina, la cual es conjugada con ácido glucurónico y finalmente es excretada por vía urinaria (DeVane 1999). Los efectos secundarios de este fármaco, se relacionan con cefaleas, náuseas y en el hombre con disfunciones sexuales (Waldinger y cols. 1998), y a un incremento en las secreciones gástricas en ratas (Abdel Salam 2004). Sin embargo, la sertralina sigue siendo uno de los inhibidores más potentes de la recaptura de serotonina y es un débil inhibidor del citocromo P450, lo cual la hace poco propensa a interacciones metabólicas que impidan la eliminación de otros medicamentos (Spina y cols. 2003). Sin embargo, la respuesta lenta de los pacientes sometidos al tratamiento con estos fármacos, inhibidores de la recaptura de los neurotransmisores, hace difícil entender por qué si éstos aumentan la disponibilidad del neurotransmisor en el espacio sináptico, tardan semanas en ejercer su efecto terapéutico (Nestler y cols. 2002). A pesar del retardo en la acción terapéutica, la buena tolerancia de sertralina, hace que este antidepresivo sea interesante de estudiar en la búsqueda de su

posible participación en la plasticidad sináptica, lo cual sería otra forma de entender su lentitud en la acción terapéutica. En este sentido, existe una nueva mirada que relaciona la idea de una alteración química - dada por los neurotransmisores - con cambios que ocurren a largo plazo en la producción o en la actividad de moléculas que promueven la comunicación neuronal; es decir, existirían alteraciones en vías o redes neuronales producto de alteración en la expresión de genes importantes en las respuestas plásticas (Castren 2005).

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos y farmacológicos de la sertralina.

	rata	humano
▪ K_i ¹	0.29 nM	0.15 nM
▪ K_d	0.57 nM	
▪ B_{max} ²	821 fmol/mg prot	
▪ $t_{1/2}$ ³	nd	26 h
▪ τ_{max} ³	nd	6 – 8 h

La K_i y la K_d están determinadas en relación al transportador de serotonina, (nd, no descrito). ¹(Shelton 2003), ²(Koe y cols. 1990), ³(DeVane 1999).

1.6. Plasticidad en el proceso de remodelamiento dendrítico.

Los fenómenos de neuroplasticidad incluyen diversos procesos de vital importancia a través de los cuales el cerebro percibe, se adapta y responde a una variedad de estímulos internos y externos. El hipocampo es vulnerable al daño por impacto físico, eventos traumáticos, niveles altos de glucocorticoides y estrés agudo o crónico (McEwen 1999; Lu y cols. 2003; Nacher y cols. 2004). Actualmente se sabe que en roedores, en monos (*Tupaia belangeri* y *Callithrix jacchus*) y en primates del viejo mundo (*Macacca fascicularis* y *Macacca mulatta*), el cerebro produce nuevas células en áreas como el hipocampo (Doetsch y cols. 1997; Gould y cols. 1999; Kornack y cols. 1999). En el hombre, la plasticidad del hipocampo también queda de manifiesto con los estudios post-mortem, que muestran proliferación y diferenciación de nuevas células con características fenotípicas y

morfológicas de neuronas en la capa de células granulares del giro dentado (Eriksson y cols. 1998). Se ha postulado que, durante el periodo de génesis de nuevas neuronas en el giro dentado, éstas serían muy susceptibles a cambios estructurales y a cambios dependientes del tipo de experiencia (Gould, 2000). Las manifestaciones de neuroplasticidad en el sistema nervioso central incluyen además, funcionamiento dendrítico, remodelamiento sináptico, potenciación a largo plazo (LTP), crecimiento axonal, extensión de las neuritas y sinaptogénesis (Mesulam 1999; Manji y cols. 2001).

Aunque el mecanismo celular preciso que subyace a los cambios morfológicos a nivel dendrítico es aún desconocido, las investigaciones indican que los desórdenes del ánimo, están asociados con deterioros en la plasticidad estructural de las neuronas (Manji y cols. 2003). En este proceso de remodelamiento, el desarrollo dendrítico es crítico para la formación de circuitos neuronales y procesamiento de la información (Cline 2001). Se ha demostrado que el crecimiento dendrítico ocurre a través de un proceso dinámico de extensión y retracción de filopodios hasta formar las conexiones sinápticas (Dailey y cols. 1996; McAllister 2000). Esta extensión de la membrana plasmática para llegar a formar el filopodio, se logra con la participación del citoesqueleto de actina y las proteínas asociadas a él, que permiten sostener la deformación de la membrana originándose así el filopodio (da Silva y cols. 2002; Luo 2002). Una vez formado el filopodio éste dará origen a dendritas si se ha formado a partir de la membrana plasmática del soma, o a espinas si se ha formado desde la membrana de la dendrita. Las espinas dendríticas pueden adoptar diversas formas: puntiagudas, dediforme o en forma de callampas, siendo éstas últimas las funcionales para los contactos sinápticos (Ethell y cols. 2005) (Fig. 2). Se ha señalado que la plasticidad morfológica de una neurona está ligada a su funcionalidad; por ejemplo, se ha observado que la depolimerización de F-actina reduce el número de receptores de glutamato en las densidades post-sinápticas excitatorias (Allison y cols. 1998).

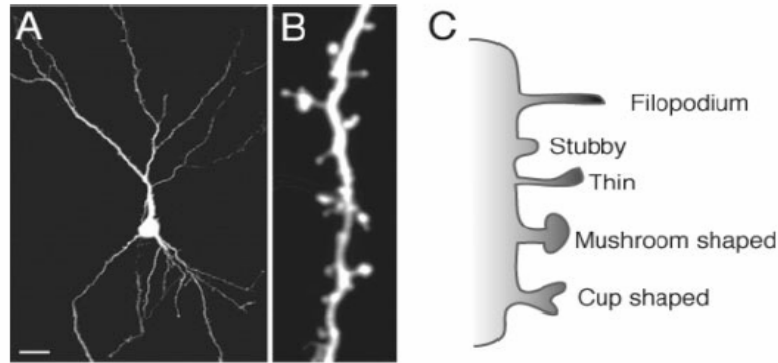


Figura 2. Distintos tipos de espinas dendríticas. Se destacan en forma de filamentos (filopodio), prominencia corta (*stubby*), de callampa o en forma de copa, (Lippman y cols. 2005).

También se ha propuesto que la repetida liberación de glutamato en neuronas del hipocampo induce un alargamiento de las espinas que es acompañado por un aumento en el número de receptores AMPA, efecto prevenido por inhibidores de la polimerización de actina; sugiriendo que la dinámica del citoesqueleto interfiere con la actividad sináptica (Matsuzaki y cols. 2004). Por otra parte, se ha descrito que los neurotransmisores a través de la activación de sus receptores, controlan el secuestro y la activación de proteínas reguladoras de la dinámica del citoesqueleto de actina, como por ejemplo, las GTPasas (Hall 1998). Así el citoesqueleto de actina es el primer blanco responsable de favorecer el logro de una arquitectura funcional en las espinas que permita transmitir las señales extracelulares.

1.6.1 Proteínas de conectividad sináptica y comunicación intracelular

Los circuitos sinápticos son conexiones altamente específicas entre grupos de neuronas separadas que permite el establecimiento de redes de comunicación. Esta conectividad está mediada por diversas proteínas que establecen no sólo la conexión sináptica sino además, la mantención de dicha conexión y la señalización al interior de la neurona (Sudhof 1995; Garner y cols. 2000; Takeichi y cols. 2005). Dentro de estas proteínas, tanto las cateninas como cadherinas han sido relacionadas con el remodelamiento que sufren las superficies sinápticas (Togashi y cols. 2002; Yu y cols. 2003). Al respecto se ha señalado que cadherinas y cateninas están presentes en axones y en dendritas (Benson y cols. 1998) y se

concentran en los contactos axo-dendríticos durante la sinapsis, colocalizando con otras proteínas sinápticas, como por ejemplo, sinapsina (Togashi *y cols.* 2002).

La proteína N-cadherina pertenece a una superfamilia de glicoproteínas transmembranas dependiente de calcio que establecen uniones homofílicas entre los dominios NH₂-terminal, a nivel de la región terminal pre y postsináptica. El dominio citoplasmático COOH-terminal es altamente conservado y se une al citoesqueleto de actina a través de la conexión con α/β catenina (Vleminckx *y cols.* 1999). Experimentos realizados en neuronas de hipocampo han revelado que las N-cadherinas son expresadas inicialmente en todos los sitios sinápticos pero rápidamente se redistribuyen a sitios sinápticos excitatorios quedando ausentes de los sitios inhibitorios (Benson y Tanaka, 1998). Más aún la N-cadherina ha sido encontrada en las terminales de las fibras musgosas del hipocampo y en las proyecciones retino-tectales, siendo común en ambas el uso de glutamato como neurotransmisor (Uchida *y cols.* 1996). Por otra parte, la β -catenina juega un papel importante en la estructura de las uniones adherentes que mantienen la conectividad entre célula y célula mediada por las cadherinas, relacionándose así con el remodelamiento que sufren las superficies sinápticas (Togashi *y cols.* 2002; Yu *y cols.* 2003; Nelson *y cols.* 2004). La dinámica en el remodelamiento sináptico, se ve favorecida además, por la interacción de α/β -catenina con proteínas que modulan la dinámica de la actina, como es la Rho-GTPasa (Gumbiner 1996; Luo *y cols.* 1996; Sin *y cols.* 2002). Recientemente se ha relacionado al complejo α/β -catenina con la dinámica del citoesqueleto de actina a través de la participación de β -catenina con canales de K⁺ activados por Ca²⁺ los cuales se encuentran en las zonas activas presinápticas de las neuronas (Kobielak *y cols.* 2004; Lesage *y cols.* 2004). La proteína β -catenina también ha sido asociada al remodelamiento de los árboles dendríticos mediante su participación en los contactos sinápticos; donde este evento podría ser una señal de detención del crecimiento, ó por el contrario podría promover futuras arborizaciones (Cline 2001). También se ha reportado que β -catenina puede actuar como factor transcripcional de genes que controlan la morfología celular, lo que indica que esta proteína cumple diversas funciones (Novak *y cols.* 1999).

La señalización a través de β -catenina está regulada por su estado de fosforilación y se ha determinado que la quinasa de la glicógeno sintasa ($GSK3\beta$) la fosforila en el NH₂-terminal; siendo ésta modificación una señal para su degradación por la vía proteosomal (Wodarz y cols. 1998; Miyoshi y cols. 2003). Con el objeto de verificar la relación entre $GSK3\beta$ y β -catenina se han realizado experimentos *in vivo* con un inhibidor $GSK3\beta$ que muestra un aumento en los niveles de β -catenina en hipocampo de ratas (Kaidanovich-Beilin y cols. 2004). Es decir, la reducción en la fosforilación de la β -catenina por $GSK3\beta$ permite el aumento de la proteína, lo que revela la importancia de $GSK3\beta$ en su regulación. Por otra parte, en cultivos de células hipocampales, se ha demostrado que la sobreexpresión de β -catenina aumenta la arborización dendrítica, mientras que su secuestro produce una disminución en las ramificaciones (Yu y cols. 2003). Estos resultados demuestran la importante participación que tiene β -catenina en procesos de plasticidad dendrítica.

Tratar de entender cómo ocurre el fenómeno de la plasticidad neuronal, cómo una neurona puede remodelar árboles dendríticos para reacomodar sus contactos sinápticos y cómo esto se articula con los circuitos neuronales, resulta vital para entender el efecto de los fármacos antidepresivos en los procesos de plasticidad sináptica. Existe numerosa literatura que apunta al efecto positivo que tienen los fármacos antidepresivos sobre la neurogénesis pero no sobre la plasticidad sináptica (Rossby y cols. 1999; Castren 2004; McEwen y cols. 2004). El proceso de neurogénesis comienza con la proliferación de células progenitoras que migran y se diferencian emitiendo neuritas, las que se diferencian en axón o en dendritas y finalmente ocurre la formación y el establecimiento de la sinapsis (Yu y cols. 2004). Las proteínas que participan en el desarrollo de la arborización dendrítica y en la mantención de la conectividad son críticas, tanto para la formación de los circuitos neurales como para el procesamiento del ingreso de la información (Yu y cols. 2003). Hasta la fecha existe escasa literatura que asocie la participación de β -catenina a la depresión mayor. Sin embargo, se ha reportado que fármacos antipsicóticos como clozapina, haloperidol y risperidona incrementan significativamente los niveles de β -catenina y $GSK3\beta$ (Alimohamad y cols. 2005) Así, la identificación de proteínas relacionadas con cambios morfológicos que median la plasticidad sináptica con la cual las

neuronas responden frente a agresiones como el estrés, abre un campo interesante de investigación en esta patología.

1.6.2. Moduladores de conectividad y remodelamiento de citoesqueleto de actina.

La proteína GSK3 β ha sido relacionada con diferentes funciones celulares, entre ellas plasticidad celular a través del remodelamiento del citoesqueleto (Hetman y cols. 2000; Frame y cols. 2001; Orme y cols. 2003). El estado de fosforilación de esta proteína es hasta la fecha el mecanismo mejor caracterizado que regula su actividad, aunque la regulación de su distribución subcelular e interacciones con otras proteínas también contribuyen a controlar su acción (Tanji y cols. 2002; Jope y cols. 2004). Se ha descrito que la actividad catalítica de la GSK3 β disminuye cuando se encuentra fosforilada en Ser-9; en cambio cuando se encuentra fosforilada en Tyr-216 esta se activa (Bhat y cols. 2000; Cohen y cols. 2001). La fosforilación en Ser-9 puede ser realizada por diferentes quinasas, entre ellas AKT/PKB, PKA y PKC, indicando que múltiples vías de señalización convergen sobre GSK-3 para regular su actividad (Doble y cols. 2003). En oposición a la regulación inhibitoria por la fosforilación en Ser-9, la activación de GSK3 β facilitada por fosforilación en Tyr-216 podría ocurrir por autofosforilación o por participación de las quinasas Fyn, Csk y Pyk2 (Frame y cols. 2001; Jope y cols. 2004; Sayas y cols. 2006).

La GSK3 β juega un importante papel tanto en la diferenciación como en el desarrollo neuronal y existe evidencia que regula el remodelamiento axonal a través de su acción sobre los microtúbulos (Lucas y cols. 1997; Hall y cols. 2000). Al respecto, se ha demostrado que la inhibición de su actividad por litio, resulta en cambios en la fosforilación de tres proteínas asociadas a microtúbulos: Tau, MAP-1B y MAP-2 (Lucas y cols. 1998; Sanchez Martin y cols. 1998) además bajo estas mismas condiciones se induce la acumulación de sinapsina I en áreas semejantes a conos de crecimiento (Lucas y cols. 1997). Estudios realizados en cultivos de células Neuro-2a con inhibidores específicos de GSK3 β muestran una inducción en el crecimiento neurítico (Orme y cols. 2003). De acuerdo a esto la GSK3 β podría estar participando en el remodelamiento sináptico. Al respecto, experimentos realizados en cultivos neuronales estimulados por el ácido lisofosfatídico (LPA), han demostrado que la retracción neurítica y el colapso de los conos

de crecimiento inducidos por la presencia de LPA, está mediado por la participación de GSK3 β . En este mismo modelo experimental, también se ha estudiado el efecto de la inhibición de PI3K en la respuesta neuronal, y se ha encontrado que la inactivación de PI3K, con wortmanina, provoca retracción neurítica, la cual es aún mayor si GSK3 β se encuentra activa (Sayas y cols. 1999; Sanchez y cols. 2001). Estos resultados permiten suponer que GSK3 β tiene participación en el fenómeno de plasticidad neuronal; y más aún si se considera que experimentos en células de neuroblastoma, la GSK3 β es activada por G α 12 /G α 13 a través de un mecanismo dependiente de RhoA (Fig. 3) (Sayas y cols. 2002). El mecanismo por el cual RhoA activa a GSK3 β es aún desconocido; sin embargo, un aumento en la actividad de GSK3 β se acompaña de un aumento en la fosforilación de Tyr-216 provocando su activación. Recientemente en cultivos neuronales, tales como, Neuro-2a, PC12, SH-SY5Y neuroblastoma, se ha demostrado que GSK3 β es fosforilada por Pyk2, una tirosina quinasa sensible a calcio, como consecuencia directa de la activación de fosfolipasa C (Sayas y cols. 2006). Así, pareciera ser que existiría una vía que involucraría la activación de GSK3 β por G α 12 /G α 13, a través de RhoA en el fenómeno de retracción neurítica. Hasta la fecha sólo se ha propuesto la participación de esta vía en la retracción de neuritas en cultivos neuronales estimulados por LPA (Kranenburg y cols. 1999; Sayas y cols. 2002). Estos resultados señalan que GSK3 β podría actuar como un modulador entre la conectividad sináptica mediante β -catenina o en el remodelamiento del citoesqueleto de actina, mediante RhoA.

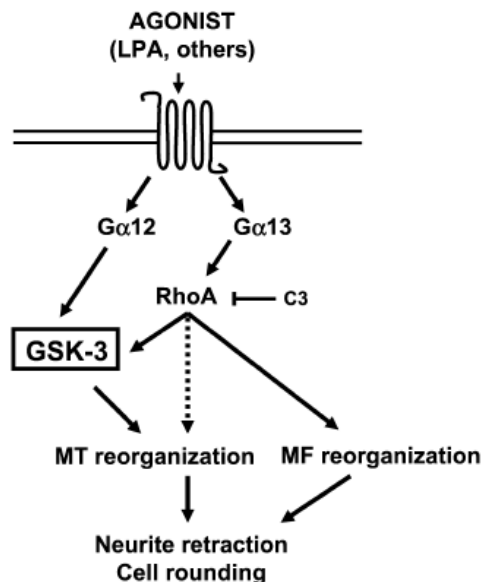


Figura 3. Modelo propuesto para la retracción neurítica inducida por LPA, que estaría mediada por la activación de GSK3 β a través de RhoA y G α 13 (Sayas y cols. 2002).

1.6.3. Proteínas asociadas al citoesqueleto de actina

Aunque el mecanismo celular preciso que subyace a los cambios morfológicos a nivel dendrítico es aún desconocido, las investigaciones indican que los desórdenes del ánimo, están asociados con deterioros en la plasticidad estructural de las neuronas (Manji y cols. 2003). En este proceso de remodelamiento, el desarrollo dendrítico es crítico para la formación de circuitos neuronales y procesamiento de la información (Cline 2001) el cual ocurre a través de un proceso dinámico de extensión y retracción de filopodios hasta formar ya sea una nueva dendrita; e incluso para la formación de una espina que también comienza con la aparición de un pequeño filopodio desde la dendrita (Dailey y cols. 1996; McAllister 2000). Se ha sugerido que la dinámica del citoesqueleto de actina, al interior de un filopodio o de una espina es muy activa; en donde el citoesqueleto se polimeriza y despolimeriza permanentemente permitiendo que ocurra la movilidad de la dendrita o de la espina hasta el momento del contacto sináptico (Rao y cols. 2000; Luo 2002; Govek y cols. 2005). Paradójicamente, el arreglo del filamento de actina puede también actuar como el primer soporte del citoesqueleto que sostiene la aparición de una estructura estable que facilite la creación de un contacto sináptico, como lo es por ejemplo una espina (Rao y cols. 2000; Luo 2002). Así los filamentos de actina podrían en un momento soportar una estructura estable y en otros momentos despolimerizarse para dar origen a un nuevo lamelopodio que posteriormente se transformará en filopodio y éste a su vez en dendrita o en espina, según de donde provenga el lamelopodio (Rao y cols. 2000; Luo 2002).

En este proceso de polimerización y despolimerización del citoesqueleto de actina, la participación de diversas GTPasas, entre ellas RhoA, es fundamental. La vía transduccional que relaciona a Rho con la formación de filamentos de actina, ha sido caracterizada. La Rho promueve la polimerización de actina a través de la activación de mDia, una proteína que se une a los extremos del filamento de actina y promueve su elongación lineal. Rho también activa a Rho quinasa la cual fosforila e inactiva a la fosfatasa de cadena liviana de miosina. Esto conduce a un incremento en la actividad de miosina II la cual entrecruza los filamentos de actina y genera la fuerza contráctil necesaria para un cambio de estructura (Govek y cols. 2005; Negishi y cols. 2005). Durante este proceso de formación de nuevas estructuras neuronales, participan tanto neurotrofinas, proteínas de

matriz extracelular, proteínas de citoesqueleto y proteínas de la familia Rho GTPasa (McAllister 2000). Experimentos realizados en cultivos neuronales de hipocampo, han mostrado que RhoA se encuentra mayoritariamente distribuida en dendritas y una sobreactivación de esta GTPasa produce una drástica simplificación de los árboles dendríticos (Nakayama y cols. 2000; da Silva y cols. 2002). Respecto de la localización celular de algunos componentes de esta última familia de proteínas, se ha demostrado por ejemplo que en cultivos hipocampales, Rac1 está presente en axones, Cdc42 es abundante en axones y dendritas, y **RhoA se encuentra sólo en dendritas** una vez que las neuronas están polarizadas (McAllister 2000; Santos Da Silva y cols. 2004). Se ha reportado que la forma del árbol dendrítico está fuertemente regulada por la participación de estas GTPasas pequeñas (Nakayama y cols. 2000), y en donde el ensamblaje de los monómeros de actina está regulado, entre otras, por la participación de la vía RhoA/Rho Kinasa- LIMK - cofilina (Meng y cols. 2003; Leemhuis y cols. 2004). Además, la funcionalidad del árbol dendrítico también es dependiente de la funcionalidad de las espinas que se han distinguido desde el punto de vista (Lippman y cols. 2005) (Fig. 2).

La proteína cofilina participa directamente en la dinámica del citoesqueleto de actina, y en experimentos *in vitro* ésta corta y depolimeriza el filamento de actina, aumentando el extremo no protegido del filamento el cual como sitio para continuar con la polimerización y extensión del filamento (Maciver y cols. 2002). Además la cofilina también participa en el desensamblaje del filamento de actina porque promueve la disociación de los monómeros de actina desde los extremos del filamento. Ambas actividades parecen ser importantes en la deformación que sufre la membrana plasmática cuando forma, por ejemplo, un lamelopodio que dará origen posteriormente a una espina (Carrier y cols. 1999; Galkin y cols. 2003; Pavlov y cols. 2007). La cofilina es altamente regulada por fosforilaciones que ocurren principalmente a través de LIMK, la cual a su vez es activada por Rho quinasa (ROCK) una quinasa activada por Rho y aparentemente esta vía permite la estabilización, del filamento actina (Maekawa y cols. 1999). Recientemente se ha sugerido que la dinámica de la sinápsis requiere de un reordenamiento continuo de los filamentos de actina, ya sea en el extremo presináptico para un eficiente flujo de vesículas que permitan la liberación de neurotransmisores, o en el extremo postsináptico para la organización y tráfico de

receptores, o para el ensamblaje de proteínas de andamio que anclen complejos proteicos asociados a cambios morfológicos de la dendritas y de las espinas sinápticas (Cingolani y cols. 2008). Por lo tanto, las proteínas que participan en el desarrollo de la arborización dendrítica y en la mantención de la conectividad sináptica, son críticas tanto para la formación de los circuitos neurales como para el procesamiento del ingreso de la información (Yu y cols. 2003).

1.7. Modelos animales de depresión

A pesar de toda la investigación realizada, no se ha podido generar aún un modelo que compile el mecanismo de acción de los antidepresivos (Rossby y cols. 1995; Duman y cols. 1997; Duman y cols. 2001; Harwood y cols. 2003; Slattery y cols. 2004)(Rossby y col., 1995. Los modelos más utilizados para estudiar el fenómeno de la depresión, son animales sometidos a estrés (Malberg y cols. 2000; Czeh y cols. 2001). De las numerosas respuestas que desencadena el estrés, se ha demostrado que los animales sometidos a estrés crónico presentan atrofia de las dendritas apicales en las neuronas hipocampales de la zona CA3, acompañado por un déficit cognitivo específico en el aprendizaje y en la memoria espacial (Magarinos y cols. 1996; McEwen 1999). Esta respuesta de atrofia dendrítica, podría relacionarse con el tiempo de acción que requieren los fármacos antidepresivos para promover vías de señalización que gatillen un remodelamiento de los árboles dendríticos.

Cualquiera sea el mecanismo a través del cual operan los fármacos antidepresivos en el ser humano, ha sido de gran dificultad poder desarrollar un modelo animal que de cuenta de la sintomatología observada en personas que padecen de depresión. Los modelos que han generado más consenso son aquellos basados en los efectos del estrés sobre la conducta de los animales; en este sentido la prueba de nado forzado, la conducta hedónica, el test de suspensión de la cola, la prueba de respuesta condicionada, son algunas de las más utilizadas para ensayar la actividad de fármacos AD frente a un estímulo aversivo, como por ejemplo, la restricción crónica de movimiento (Cryan y cols. 2002).

Uno de los mejores avances, ha sido poder consensuar que la prueba de nado forzado revela que agentes catecolaminérgicos disminuyen la inmovilidad pero incrementan la conducta

de escalamiento, mientras que compuestos relacionados con la serotonina tales como los inhibidores específicos de la recaptura (SSRI) también disminuyen la inmovilidad pero incrementan la conducta de nado (Lucki 1997; Cryan y cols. 2000).

En resumen, el estudio de la participación de las proteínas que modulan tanto el desarrollo de la arborización dendrítica necesarias para el reforzamiento de la sinápsis y en la conectividad celular, son críticas tanto para la formación de los circuitos neurales como para el correcto procesamiento del ingreso de información (Yu y cols. 2003). Si efectivamente la depresión produce atrofia dendrítica (Sheline y cols. 1996) y la acción de los antidepresivos apuntan a favorecer la neurogénesis de células del giro dentado (Castren 2004), este proceso requerirá de un continuo remodelamiento del citoesqueleto que de cuenta de los cambios que sufren las arborizaciones dendríticas; puesto que finalmente estas estructuras alojan los puntos de contacto entre neurona y neurona. Por lo tanto estudiar proteínas que participan en las conexiones sinápticas y en el remodelamiento del citoesqueleto de actina, resulta de interés para aportar conocimiento que permita entender de mejor manera el fenómeno de plasticidad y el efecto que tienen los antidepresivos en esta respuesta.

Algunas preguntas que surgen en este contexto son si los fármacos antidepresivos afectan algunas proteínas de conectividad sináptica como N-cadherina y β -catenina o si afectan a proteínas de citoesqueleto, que pudiesen estar relacionadas con el remodelamiento dendrítico, como GSK3 β , RhoA y cofilina.

2. HIPÓTESIS

El estrés crónico por restricción de movimiento, como modelo de depresión animal, provoca cambios tanto conductuales como en los niveles de proteínas asociadas a citoesqueleto y conectividad sináptica, efectos prevenidos por el antidepresivo sertralina.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL:

Analizar en el modelo de rata sometida a restricción de movimiento, el efecto del estrés y del fármaco antidepresivo sertralina, en la conducta y en proteínas asociadas tanto al citoesqueleto de actina como a la conectividad sináptica.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

3.2.1. Evaluar el impacto que tiene la restricción de movimiento crónica y la presencia de sertralina sobre marcadores de estrés y en la conducta de los animales.

3.2.2. Investigar si el estrés y la presencia de sertralina, se traducen en cambios morfológicos que pudiesen afectar la sinapsis, como por ejemplo, alteraciones en las densidades de espinas dendríticas.

3.2.3. Estudiar si en este modelo de depresión animal hay cambios en (i) los niveles de proteínas asociadas a la dinámica del citoesqueleto de actina, como RhoA, cofilina, y GSK3 β ; y (ii) en proteínas que participan en la conectividad sináptica como N-cadherina y β -catenina.

3.2.4. Determinar si el antidepresivo sertralina provoca cambios en proteínas relacionadas a la dinámica del citoesqueleto y conexión sináptica, en forma dependiente ó independiente del estrés.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Reactivos generales

- BioRAD Laboratories (CA, EE.UU.): azul de bromofenol, persulfato de amonio, bis, N,N' -metilen-bis-acrilamida, acrilamida.
- Merck (Darmstadt, Alemania): Tris-HCl, KCl, MgCl₂, NaCl, SDS, etanol absoluto (p.a.), Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, ditiotreititol, glicerol, acrilamida, glicina, Tween-20, ácido bórico.
- Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE.UU.): rojo Ponceau, HEPES, EGTA, Tris-acetato, NaPPI, NaF, leupeptina, aprotinina, PMSF, Na₃VO₄, Triton X-100.
- United States Biologicals (Swampscott, MA, EE.UU.): Tris-base.
- Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.): TEMED, marcador de peso molecular para geles de proteínas (Bench Mark), agarosa ultra pura.

Para preparar las soluciones se utilizó agua destilada, obtenida de un equipo SCHOTT perteneciente al laboratorio.

4.2. Animales

En todos los experimentos se emplearon ratas macho (*Rattus norvegicus*, cepa Sprague-Dawley, 200-240 g), criadas en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en condiciones estandarizadas, con ciclo luz–oscuridad de 12 horas, a una temperatura de 22°C y una humedad de un 45%. Los animales recibieron alimento estéril y agua filtrada *ad libitum*. En este estudio no se consideró la utilización de ratas hembras puesto que éstas presentan ciclo estral (4 días) donde se observan variaciones de hormonas sexuales (estradiol y la progesterona) las cuales pueden influir sobre los parámetros evaluados. Se usó el número mínimo de animales, y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (FONDECYT-108-0489).

4.3. Tratamientos

4.3.1. Estrés crónico por restricción de movimiento.

Para este modelo de estrés, los animales fueron colocados en cilindros de acrílico transparente (de 80 mm de diámetro) con perforaciones para permitir la entrada de aire, durante 2,5 h diarias y por 14 días consecutivos de acuerdo a protocolos establecidos en el laboratorio (Bravo y cols. 2009). Este aparato limita la movilidad del animal, pero no lo inmoviliza completamente. Durante este período los animales no tuvieron acceso a alimento o agua y cada sesión de estrés se realizó siempre entre las 9:00 AM y 12:00 PM de forma que el procedimiento fuese temporalmente reproducible (Bravo y cols. 2009).

4.3.2. Tratamientos farmacológicos.

Se utilizó el antidepresivo sertralina (Sander y Co), un inhibidor de la recaptación de serotonina en una dosis de 10mg/kg de peso corporal del animal el que se inyectó intraperitonealmente (i.p.) (Leonard 1995; Frechilla y cols. 1998). El fármaco fue disuelto en agua tibia a una concentración de 10 mg/mL. Los animales se clasificaron en los siguientes grupos: (i) animales controles sin estresar e inyectados diariamente con una solución vehículo de NaCl 0,9% (Control+Salino = **C**); (ii) animales estresados crónicamente por 14 días e inyectados con la solución salina, 10 min. previo a la sesión de restricción de movimiento (Restricción+Salino = **R**); (iii) animales no estresados a los que se les inyectó la sertralina 10mg/kg por los 14 días de tratamientos (Control+sertralina = **CS**) y (iv) animales estresados por restricción de movimiento a los que se les administró el antidepresivo durante los 14 días (Restricción+sertralina = **RS**).

4.4. Determinación de parámetros fisiológicos.

Con el objeto de determinar el efecto del estrés y de la administración del fármaco antidepresivo, se procedió a evaluar factores fisiológicos y conductuales de los animales a lo largo o posterior a los tratamientos.

4.4.1. Cambios en el peso corporal.

Con el objeto de determinar si los diferentes tratamientos inducían variaciones en el peso corporal de los animales, éstos fueron pesados diariamente antes de iniciar el protocolo de tratamiento.

4.4.2. Determinación de los niveles séricos de corticosterona.

Al momento de eutanasiar los animales, se recolectó sangre en tubos de vidrio sin anticoagulante, para luego ser centrifugada a 4.000 x g durante 15 min. El suero obtenido se almacenó a -20°C para la determinación cuantitativa de los niveles séricos de corticosterona mediante un ensayo inmuno-enzimático con un límite de sensibilidad de 27 pg/mL (Correlate-EIATM, Enzyme Immunoassay Kit, Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI, EEUU) de acuerdo a lo establecido en el laboratorio (Bravo y cols. 2009). Las diluciones de los estándares de la hormona (32, 160, 800, 4000, 20000 pg/mL) y de las muestras (1:40), se realizaron en el tampón proporcionado por el fabricante.

Al momento de la cuantificación, se realiza la dilución de los estándares de hormona (32, 160, 800, 4000, 20000 pg/mL) y de las muestras (1:40) en el tampón proporcionado por el kit. Se colocaron 100 µL de las diluciones en una placa de 96 pocillos la cual estaba previamente recubierta con un anticuerpo (anti cabra Ig G) contra el anticuerpo que reconoce específicamente la corticosterona (preparado en cabra). Sobre ella se agregó 50 µL de corticosterona conjugada a fosfatasa alcalina que compite con la hormona presente tanto en las muestras como estándares por la unión al anticuerpo anticorticosterona presente en la placa. Posteriormente se adicionó a todos los pocillos excepto al blanco y unión no específica, 50 µL de un anticuerpo policlonal contra la corticosterona que reacciona con la hormona libre (conjugada y no conjugada). Luego se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave y posterior a 3 lavados con 400 µL del tampón provisto en el kit, 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 ácida provista por el kit. La lectura de la densidad óptica a 405 nm se realizó en un lector de placa Asys Hitech modelo Expert 96. La lectura de la densidad óptica de la curva estándar se usó para calcular la concentración de corticosterona

(CORT) presente en los sueros de los animales. Por el diseño de este ensayo, la intensidad del producto de color amarillo, es inversamente proporcional a la concentración de CORT presente tanto en los estándares como en las muestras.

4.5. Pruebas conductuales.

Para evaluar si en el modelo de estrés crónico por restricción de movimiento, los animales generan conductas con características similares a la depresión, fue necesario evaluar sus conductas luego de 24 h de los tratamientos farmacológicos y/o de estrés crónico. Estas conductas incluyeron evaluación de la anhedonia o pérdida por el placer, alteraciones en la capacidad por adquirir respuestas condicionadas, las cuales que se relacionan con fallas en la capacidad cognitiva, y conductas de desesperanza aprendida o desamparo.

4.5.1 Prueba de preferencia por solución de sacarosa al 1% como agua de bebida.

Uno de los síntomas más recurrentes en los cuadros depresivos es la falta de interés por acciones placenteras (anhedonia). Para evaluar esta conducta, los animales fueron entrenados para que pudiesen optar por una solución de sacarosa al 1% como agua de bebida o por agua sola. Este entrenamiento se realizó por 3 h diarias por el lapso de 7 días, previos a los procedimientos de estrés y tratamiento farmacológico de acuerdo a lo descrito (Bravo y cols. 2009). El entrenamiento consistió en colocar diariamente por 3h a cada animal en una jaula individual, donde se colocaron 2 tubos: uno con agua sola y el otro con la solución de sacarosa. Los tubos eran alternados diariamente y en forma aleatoria, con la finalidad de evitar efectos de aprendizaje por asociación del contenido de los tubos con la posición de éstos (Zurita y cols. 2000; Bravo y cols. 2009). Finalizada la semana de entrenamiento, se evaluó el porcentaje de preferencia por el agua endulzada en función del volumen total de líquido consumido (día cero). Una vez iniciado el protocolo de restricción de movimiento y el tratamiento farmacológico, se evaluó la preferencia por la bebida endulzada a los 7 y 14 días. Esto se realizó colocando a los animales en las jaulas individuales y enfrentándolos a la elección de agua sola o agua azucarada, pero sólo durante 1 h. Terminada la prueba, se evaluó el porcentaje de preferencia por el agua endulzada en función del volumen total de líquido consumido. Los cambios en la preferencia por la solución de sacarosa al 1% permitieron evaluar la conducta de los

animales por una actividad placentera, o conducta hedónica. La falta de preferencia por el agua endulzada refleja una condición de anhedonia, condición que también se observa en pacientes con depresión mayor (APA 1999).

4.5.2. Ensayo de la adquisición de una respuesta condicionada.

Otro de los síntomas que se observan en los pacientes depresivos, son las alteraciones cognitivas, las cuales pueden manifestarse por la falta de concentración, lentitud en el pensamiento analítico, disminuida capacidad para aprender. Uno de los ensayos que apuntan a medir la capacidad cognitiva de los animales es la prueba de respuesta condicionada frente al estímulo sonoro y posterior descarga eléctrica en las patas (Mora y cols. 1993). En esta prueba, cada animal fue colocado individualmente en una caja compuesta por dos unidades modulares de acero inoxidable, entre las cuales hay una compuerta abierta para que el animal pase de un lado al otro (*Two-way shuttle box* [Lafayette Instrument Co., Lafayette, IN, EE UU]). Cada unidad esté equipada con una rejilla de 18 barras metálicas en el piso, a través de la cual se puede aplicar un shock eléctrico de intensidad variable; dos ampolletas de 28V DC y un generador de tonos audibles (Mallory Sonalert 2.800 Hz, Lafayette Instrument Co., Lafayette, IN, EE UU). Los shocks 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. Se realizaron un total de 50 ensayos, los que duraron un total de 30 min. Cada ensayo se inició aplicando un estímulo condicionante (tono) durante 5s seguido de una descarga eléctrica de 0,2 - 0,5mA en las rejillas del piso, la que actúa como estímulo aversivo, el que dura 10s. La descarga eléctrica se mantuvo hasta que el animal escapó hacia la otra caja que no estaba electrificada. Cada animal se puso a prueba durante 10 min, aplicando el sonido seguido del shock cada 30seg, con una duración máxima del shock de 10s. Luego, el ensayo se realizó durante 30min. Una respuesta de condicionamiento se define cuando el animal escapó de la caja electrificada a la otra dentro de los primeros 5seg del sonido (adquisición de respuesta condicionada, (ARC). En cambio, si la rata no escapa a la otra caja durante la aplicación del

shock eléctrico, se considera como falla en el escape (FE) (Mora y cols. 1993; Bravo y cols. 2009). Esta prueba permitió evaluar de qué manera el estrés por restricción de movimiento era capaz de modificar la capacidad del animal por adquirir una respuesta condicionada, y en cierta medida evaluar la capacidad de aprendizaje de éste.

4.5.3. Prueba de natación forzada

La prueba de natación forzada, tiene por objetivo visualizar la conducta de “desesperanza” que manifiesta el animal frente a la imposibilidad de escapar del medio adverso al cual se ve obligatoriamente enfrentado (Cryan y cols. 2002). En este caso, interesaba evaluar si el estrés crónico por restricción de movimiento era capaz de promover una conducta de desesperanza y si el fármaco antidepressivo ayudaba a prevenir tal conducta.

La prueba de natación forzada consiste en someter al animal a nadar durante 5 min previo un breve entrenamiento de 15 min que se realiza el día anterior a la prueba. Se cuantifica el tiempo en que el animal permanece nadando, o escalando o detenido en el interior del estanque con agua. Esta prueba se realizó en 2 días: en el primer día (día 13 de cada tratamiento) los animales fueron colocados durante 15min en un cilindro de acrílico de 20 cm de diámetro por 50 cm de alto, que se llena con agua (24°C-25°C) hasta 30 cm de altura (Bravo y cols. 2009). En el segundo día (día 14 de cada tratamiento), se evaluaron las conductas de escape que el animal intenta realizar. En esta determinación, y durante 5 min se evaluó la conducta de escape en tres parámetros: i) escalamiento: el animal trata de subir por las paredes del tubo, ii) natación: el animal nada en busca de la salida, y por último, la diferencia del tiempo en que el animal no realiza ninguna de las conductas anteriores se considera como: iii) inmovilidad, donde la rata no hace ningún esfuerzo por buscar una salida, sólo intenta mantenerse a flote. Para la determinación de la conducta de inmovilidad, se resta el tiempo en que el animal realizó las otras dos conductas de escape. Un animal con desesperanza, es decir con incapacidad de responder adecuadamente a una nueva condición adversa, va a tener menos conductas de escape y va a permanecer más tiempo inmóvil durante la prueba (Cryan y cols. 2005; Cryan y cols. 2002). Esta condición de desesperanza aprendida también puede ser observada en pacientes con depresión mayor (APA 1999).

4.6 Preparación de tejidos para inmunohistoquímica.

Luego de 14 días de estrés y tratamientos farmacológicos, y luego de pruebas conductuales, los animales fueron eutanasiados mediante decapitación o perfusión con solución fijadora previa anestesia mediante una inyección i.p. de ketamina-xilacina 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 aproximadamente de 14 mL/min. Posteriormente se perfundió con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS (NaCl 0,15 M; Na₂HPO₄ 0,08 M; NaH₂PO₄ 0,02 M pH 7,4), al mismo flujo anterior. Después se extrajo el encéfalo de los animales, se postfijaron en la misma solución fijadora y finalmente se colocaron en una solución de sacarosa al 30% en PBS durante 3 días y posteriormente fueron congelados rápidamente en isopentano (Riedel-de Haën, Hanover, Alemania) enfriado en nitrógeno líquido y guardaron en un congelador a -80° C hasta su utilización. 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 G, y cols.1982). Los cortes se colocaron alternadamente sobre portaobjetos silanizados y se almacenaron en un congelador a -80° C hasta su utilización. Los cortes se realizaron en un crióstato (Microm HM5000, Microm, Walldorf, Alemania) de 12 µm de grosor y se colocaron alternadamente sobre porta objetos silanizados. Posteriormente se almacenaron a -80°C hasta ser utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica.

4.6.1. Determinaciones inmunohistoquímicas para β-catenina y N-cadherina.

A través de inmunohistoquímica, se realizó la determinación de β-catenina y N-cadherina, en las distintas regiones del hipocampo con el objeto de evaluar el efecto del estrés y de la Sertralina en la distribución e inmunorreactividad de estas proteínas. Los cortes de tejido se descongelaron, se lavaron 3 veces con PBS para luego realizar recuperación antigénica de los tejidos. Éstos se sumergieron en una solución tampón de citrato de sodio 0,1 M pH 6,0 y mantenida a 95°C en una vaporera (Oster, EE UU) durante 20 min y posteriormente se enfriaron hasta 30-37 °C en la misma solución. Los cortes se lavaron en abundante agua destilada y posteriormente dos veces en PBS para ser finalmente permeabilizados con

Triton X-100 al 1% en PBS durante 10 min. Para bloquear los sitios de unión inespecífica del anticuerpo primario al tejido, se realizó una incubación con suero normal de cabra (NGS) al 3% en PBS durante 30 min. Luego se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios para las diferentes proteínas de interés (β -catenina, N-cadherina) en NGS 3% en PBS pH 7,4 durante toda la noche a 4°C. Los tejidos se lavaron y se llevó a cabo la detección con un método indirecto utilizando el anticuerpo secundario anti IgG de conejo ó ratón conjugado con biotina. Los tejidos se incubaron con una dilución de 1:200 en NGS 1% en PBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se incubó durante 1 hr con el complejo peroxidasa estreptavidina a 37°C. Finalmente para el desarrollo de color se utilizó como sustrato diaminobenzidina (DAB), el cual se caracteriza por dar color marrón (Elite Rabbit Ig G ABC Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE UU). Las diluciones de los anticuerpos utilizados se indican en la Tabla 2. Para la validación de los resultados de la coloración inmunohistoquímica se procedió a la realización de un control negativo. Para este efecto la muestra se procesó remplazando el anticuerpo primario por NGS 1% en PBS pH 7.4.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica de β -catenina y N-cadherina.

Anticuerpo primario	Dilución del anticuerpo	Tipo de anticuerpo	Dilución anticuerpo secundario
anti β -catenina (Santa Cruz,H-102, Sc-7199)	1: 100	Policlonal	1:200
anti N-cadherina (BD Transduction Laboratories)	1:100	Monoclonal	1: 10.000

Se indican los anticuerpos primarios y secundarios respectivos para cada proteína estudiada y sus respectivas diluciones.

4.6.2. Cuantificación de la inmunoreactividad para β -catenina y N-cadherina.

La intensidad de la marca se cuantificó en cada área del hipocampo con la ayuda del programa computacional de análisis de imagen UN-SCAN-IT version 4.1 para Windows (Silk Scientific INc. Orem, UT, EEUU). Se realizaron mediciones de la intensidad de la marca en una escala de grises capturada como pixeles. Por cada hipocampo se consideraron 20 áreas diferentes del estrato oriens en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo (Fig. 4). La toma de muestras inmunoreactivas, consideró para cada proteína, igual tamaño de áreas respecto a la marca basal. Para la obtención de la marca basal, se escogió 20 áreas en zonas de la corteza. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la marca específica respecto de la marca basal. Para cada animal se evaluaron la áreas inmunoreactivas en al menos tres cortes coronales correspondientes a cada uno de los 4 animales existentes en cada condición experimental.

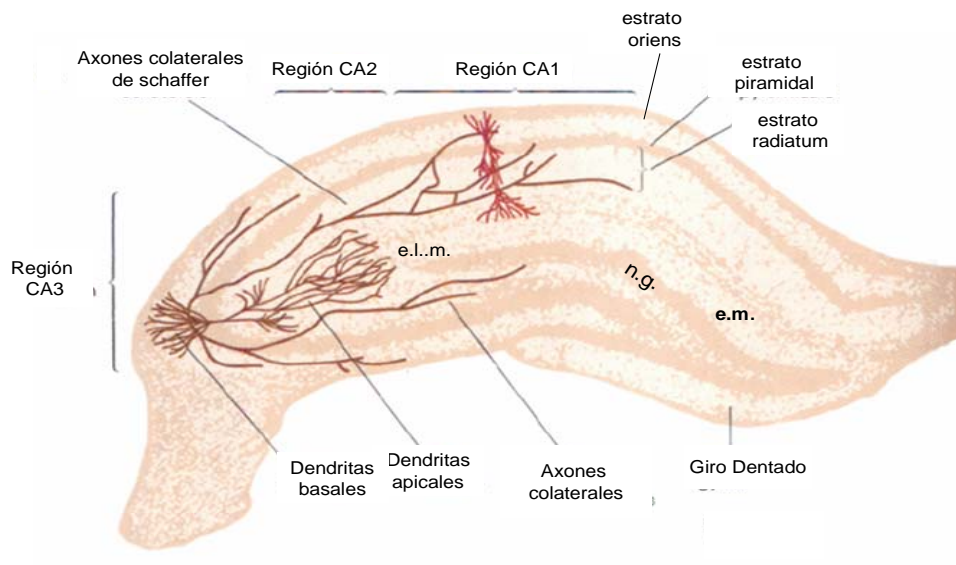


Figura 4. Diagrama que ilustra un corte coronal de hipocampo.

Se muestran las distintas regiones del Cuerno de Amón (CA1, CA2, CA3), el estrato oriens, el estrato piramidal, las dendritas basales y apicales de una neurona piramidal. Se muestra además, las neuronas granulares (n.g.), el estrato molecular (e.m.) y el estrato lacunoso molecular (e.l.m.) ubicados en el Giro Dentado.

4.7. Determinaciones por Inmunowestern blot.

De dos series experimentales se obtuvieron los hipocampos, los que fueron homogeneizados en un homogenizador vidrio-vidrio a 4 °C en cinco volúmenes de solución tamponada para lisis (Tris HCl 75 mM pH 7,0; KCl 10 mM, NaCl 75 mM EGTA 0,5 mM, EDTA 0,5mM, DTT 0,5 mM, Na₃VO₄ 0,125 mM, PMSF 0,1 mM, aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml, NaF 2,0 mM, NaPPi 0,025 mM y Tritón X-100 1 %). Las muestras se sonicaron (Transsonic Digital D-78224 SinGen/HTW, ELMA, Alemania) a 4°C durante 5 min y se centrifugaron (Labofuge 400, Heraeus Instruments, Alemania) a 17.860 x g durante 30 minutos a 4°C y el precipitado se desechó. En el sobrenadante se cuantificaron las proteínas mediante el método del ácido Bicinonínico (Sapan y cols. 1999), usando BSA (Sigma, St. Louis, MO, EE UU) como estándar para la curva de calibración. Las muestras fueron desnaturaladas con una solución de carga tamponada en una relación de 4:1 (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) y hervidas durante 10 minutos en un termociclador (PTC-100, MJ Research Inc, EE.UU.) y congeladas a -80 °C. Se resolvieron 75 µg de proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) al 10% (β-catenina) ó 15% (GSK3β) o 12% (RhoA) o 15% (cofilina) a 80 V en una solución tamponada de Tris 2,5 mM, SDS 0,01%, y Glicina 19 mM. Se cargaron 4 µL de estándar de peso molecular preteñido (Invitrogen-Carlsbad, CA, EE.UU). Luego se realizó la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de poro 0,2 µm (BioRad, Richmond, CA, EE UU), durante 1 hora 30 minutos a 100 V y a 4 °C, en una solución de transferencia tamponada de glicina 19 mM, y Tris 2.5 mM, metanol 20%. Como control de la transferencia de proteínas, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con Rojo Ponceau al 0,2 %, ácido sulfosalicílico 3%, tricloroacético 3%. Posteriormente la membrana se lavó con una solución de tamponada de Tris HCl 25 mM, NaCl 140 mM y KCl 2m M a pH 7,4 (TBS), con Tween-20 al 0,1% (Merck, Darmstadt, Alemania) (TBS-T 0.1%). Para bloquear las uniones no específicas del anticuerpo, la membrana se incubó con leche descremada ya sea al 1% o 3% disuelta en la solución TBS-Tween 20 al 0.1% de acuerdo a cada proteína. Finalmente la membrana se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario respectivo a la dilución adecuada, (Tabla 3). Al día siguiente se realizaron dos lavados por 5 minutos con una solución de TBS con agitación y a temperatura ambiente. La membrana se incubó con el anticuerpo

secundario acoplado a peroxidasa durante dos horas con agitación a temperatura ambiente y luego sometida a dos lavados con una solución de TBS por 5 minutos cada uno. Las bandas se revelaron incubando las membranas con el substrato de quimioluminiscencia para peroxidasa por 1 minuto (Perkin-Elmer, Boston, MA, EE UU) exponiéndolas luego, a distintos tiempos (30 s-30-min) en un film fotográfico (Kodak, Rochester, NY, EE UU). El film fue puesto 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 en los niveles de proteínas, la intensidad de banda de las proteínas se normalizó respecto a la intensidad de banda de la proteína constitutiva como β -actina.

Tabla 3. Anticuerpos y condiciones utilizadas en los ensayos de western.

Anticuerpo	Dilución Ac 1°	Tipo de anticuerpo	Solución de bloqueo	Solución de lavado	Dilución Ac 2°
Anti RhoA (Sta. Cruz,c418)	1:100	Monoclonal	Leche 3% TBS-T 0,1%	TBS-T 0,1%	1:10.000
Anti N-Cadherina (BD Transduction Lab)	1:100	Monoclonal	Leche 3% TBS-T 0,1%	TBS-T 0,1%	1:10.000
Anti GSK3 β (Sta. Cruz,sc418)	1:100	Monoclonal	Leche 3% TBS-T 0,1%	TBS-T0,1%	1: 10.000
Anti P-GSK3 β (Sta. Cruz, sc11757)	1:100	Policlonal	Leche 3% TBS-T 0,1%	TBS-T0,1%	1: 10.000
β -catenina (Sta. Cruz H-sc 7199)	1: 750	Policlonal	Leche 3% TBS-T 0,1%	TBS-T0,1%	1: 10.000
Cofilina (Cytoskeleton ACFL02)	1: 3.000	Policlonal	Leche 3% TBS-T 0,1%	TBS-T0,1%	1: 5.000
p-Cofilina (Cell Signaling 77G2)	1 : 500	Policlonal	BSA 2%-TBS-T 0.1%	TBS-T0,1%	1 : 10.00

Se indica para cada anticuerpo utilizado la dilución adecuada, solución tamponada en la que se hizo el bloqueo, y solución con la que se hicieron los lavados. Los anticuerpos primarios y secundarios respectivos para cada proteína fueron disueltos en la solución de bloqueo respectiva.

4.8. Preparación de tejidos para impregnación con tinción de Golgi.

Una vez finalizado el protocolo de restricción y administración de Sertralina, los animales fueron anestesiados y perfundidos. Luego de 15 min de perfusión, los cerebros fueron removidos cuidadosamente del cráneo y el cerebro se separó en ambos hemisferios.. Luego de lavados en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 los tejidos fueron inmersos en una solución de impregnación que contiene dicromato de potasio/cloruro de mercurio (solución A) y dicromato de potasio (solución B), en partes iguales (Kit FD RapidGolgiStain™, FD NeuroTechnologies. Consulting & Services, Inc. EE UU). Los cerebros se mantuvieron en frascos de plástico, protegidos de la luz, a temperatura ambiente y luego de 24 h se reemplazó la solución por una fresca y los tejidos fueron mantenidos por un período de 2semanas. Luego fueron transferidos a una solución C y dejados a 4°C por 48 h para finalmente realizar secciones de 100 µm 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 cols. 1982). Las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados y lavadas 2 veces con agua destilada, 2 minutos cada vez. Posteriormente las secciones fueron teñidas con una solución D, E y agua destilada en una proporción 1: 1: 2, respectivamente. A continuación, se deshidrataron con una batería de etanol (50%, 70% y 95%) ascendente, 4 minutos en cada una de ellas, para finalmente montarlas en portaobjetos y cubrirlas con resina (Entellan, Merck, Alemania).

4.9. Determinación del número de espinas dendríticas

El estudio del número de espinas dendríticas se realizó en dendritas primarias de neuronas piramidales del área CA1, restringidas a las coordenadas Bregma: -2,8 a -3,8 de cortes coronales de hipocampo. Se consideró dendritas primarias a aquellas originadas directamente desde el soma neuronal. Las espinas se contaron desde el origen de la ramificación y a lo largo de 80 µm de longitud, los cuales fueron a su vez divididos en 10 secciones de 8 µm cada una. En cada uno de estos segmentos, se realizó el conteo de las espinas dendríticas de cada uno de los animales correspondiente a cada condición. El número de espinas para cada uno de los segmentos de 8 µm, a una distancia dada, fue promediado para cada uno de los animales. Se consideró espina dendrítica, cualquier

protrusión que emergiera desde la superficie de ésta. Las espinas se contaron bajo aumento 100x con microscopía óptica.

4.10. Análisis estadístico

4.10.1. Análisis estadístico de los datos obtenidos en la inmunohistoquímica y en Inmunowestern Blot.

La estadística de los datos obtenidos fue ANOVA-no paramétrico, seguido del test de comparaciones múltiple Newman-Keuls o Bonferroni. El programa computacional utilizado fue el GraphPadPrisma versión 4.0 (GraphPadSoftware incorporated).

4.10.2 Análisis estadístico del número de espinas dendríticas.

La estadística de los valores promedios de cada grupo experimental fueron analizados con ANOVA-no paramétrico de comparaciones múltiple de Newman-Keuls y post-test de Dunns. El efecto de los tratamientos sobre la ganancia de peso, se analizó por el análisis de dos vías para mediciones repetidas, usando el pos-test de Bonferroni. El número de animales en cada ensayo se indica al pie de cada figura.

5. RESULTADOS

El estrés asociado por ejemplo a eventos vitales ó aquel que se presenta en forma recurrente al manejar en forma inapropiada nuevos desafíos, es un factor que se ha asociado a la depresión (McEwen y cols. 1995; Radley y cols. 2005; Robbins 2005). El estudio de la depresión ha requerido la generación de modelos biológicos para someterlos a experimentación farmacológica. El modelo de estrés animal generado por restricción de movimiento, puede ser monitoreado a través de las respuestas fisiológicas y conductuales promovidos por el agente estresor, al igual que aquellas gatilladas en respuesta al tratamiento con fármacos antidepresivos (Papp y cols. 1996; Cryan y cols. 2005). Los resultados de este trabajo de tesis, muestran los efectos del estrés crónico por restricción de movimiento y de la administración del antidepresivo sertralina sobre parámetros: fisiológicos, conductuales, bioquímicos y morfológicos, los cuales podrían ser asociados a fenómenos de plasticidad sináptica.

5.1. Efecto sobre parámetros fisiológicos.

Uno de los factores que ha sido asociado a la depresión, es el estrés persistente generado por la presencia de situaciones adversas e insuperables. Entre los parámetros fisiológicos que se ven alterados frente al estrés se encuentra una desregulación del eje HHA que se manifiesta por un incremento en los niveles plasmáticos de cortisol (Cerqueira y cols. 2005). El registro de las variaciones en el peso corporal de los animales, a lo largo de los 21 días de protocolo, muestra patrones diferentes en la ganancia de peso. Por una parte, durante los primeros 7 días correspondientes al entrenamiento, la variación en la ganancia de peso entre los cuatro grupos de animales no mostró diferencia; es decir, todos los animales presentaron una ganancia de peso similar (Fig. 5). Posterior a este período, los animales se sometieron a restricción de movimiento y a la administración de sertralina (10 mg/peso) de acuerdo a lo descrito (Becker y cols. 2004). Los resultados muestran que a partir del 5° día, se observa una clara disminución en la ganancia de peso en los animales estresados en comparación con los animales controles (Fig. 6).

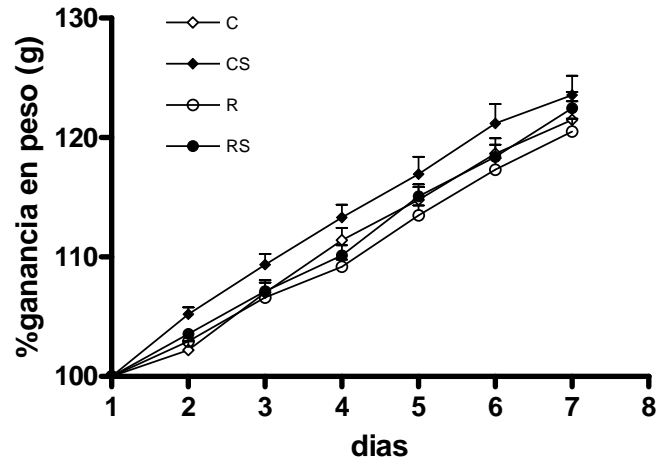


Figura 5. Ganancia en peso corporal previa al inicio del estrés.

Los animales fueron separados azarosamente en cuatro grupos de tratamientos, denominados: (◇) Control (C), (◆) Control + sertralina (CS), (◊) Restricción (R), (●) Restricción + sertralina (RS). Durante la primera semana los cuatro grupos fueron sólo manipulados para pesarlos y posteriormente se iniciaron los tratamientos. Los datos son expresados como promedio (%) del peso inicial \pm EEM. Durante la primera semana de manipulación los grupos de animales no mostraron diferencia en la ganancia de peso corporal. (Análisis de ANOVA de dos vías para mediciones repetidas). n=14 para cada condición experimental.

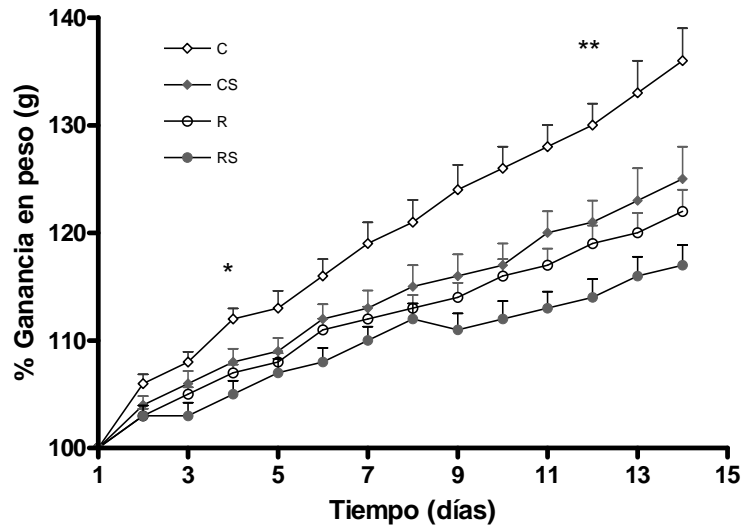


Figura 6. El estrés crónico y la administración crónica de sertralina reducen significativamente la ganancia de peso corporal. Serie experimental en que se incluye (◇) Control, (◆) Control +sertralina, (◊) Restricción, (●) Restricción + sertralina. A partir del 5° día de restricción o administración de Sertralina la diferencia entre C vs CS y entre C y R, se hacen estadísticamente significativas. Los datos están expresados como promedio del % del peso inicial del animal \pm EEM. (Análisis de ANOVA de dos vías para mediciones repetidas). n=14 para cada condición experimental. * $p < 0,05$ desde el día 3 – 11; ** $p < 0,01$ desde el día 12 – 14.

Los animales controles tratados con sertralina presentan una ganancia en el peso corporal similar a los animales controles inyectados con salino. Al comparar el efecto de la administración de sertralina en animales estresados, se observa que el fármaco no previene la disminución en la ganancia de peso provocada por la restricción (Fig. 6). También se ha señalado que el estrés crónico altera el ritmo de secreción de glucocorticoides, hormona que provoca alteraciones en el hipocampo (Sapolsky 1986). En este estudio, el estrés aumenta significativamente la masa de la adrenal, en un 32% respecto al control; efecto concordante con una hipertrofia cortical descrita previamente en modelos similares de estrés (McEwen 2007). Con el objeto de determinar si este cambio se acompañaba por un aumento en la secreción de corticosterona, se cuantificaron los niveles séricos de esta hormona en muestras obtenidas 48 h posteriores al término de los procedimientos experimentales. En la Tabla 4, se muestra que tanto la administración de sertralina como la restricción de movimiento no provocan un aumento estadísticamente significativo de corticosterona en comparación con los animales controles.

Tabla 4. Efecto del estrés y del tratamiento con sertralina sobre la masa de la adrenal y los niveles séricos de corticosterona.

Tratamiento	Masa glándula adrenal (mg)	Corticosterona (µg/dL)
Control	20,47 ± 1,22	2,02 ± 0,71
sertralina (10 mg/Kg)	24,86 ± 1,73	3,99 ± 2,15
restricción	26,92 ± 1,47*	6,14 ± 1,80
restricción/sertralina	25,46 ± 1,21	4,68 ± 1,38

Los valores representan el promedio ± EEM de 12 animales en cada condición experimental. Las muestras de tejido y de suero fueron obtenidas 48 h pos-tratamiento. Los datos fueron analizados por el test de ANOVA ($p < 0,02$) seguido del Test de Comparaciones Múltiples Bonferroni.

* $p < 0,05$ restricción versus control.

El conjunto de estos resultados, muestran que el estrés crónico y la restricción de movimiento provocan un aumento en la masa de la glándula adrenal y una reducción en la ganancia de peso corporal. Estos cambios podrían ser producto de un alza en la corticosterona, cambio que no fue probablemente permanente durante el período de estrés. Por otra parte, la administración repetida de sertralina provoca una disminución en la ganancia de peso corporal en niveles semejante a los animales estresados; probablemente por un mecanismo independiente de la activación del eje HHA.

5.2. Efecto del estrés y la sertralina sobre parámetros conductuales.

Para determinar en nuestro modelo animal la acción antidepresiva de la sertralina, se analizó si el fármaco era capaz de prevenir los efectos conductuales causados por la restricción crónica de movimiento. Se realizaron pruebas para determinar las conductas activas, la de desesperanza aprendida, la respuesta condicionada y la respuesta de evitación de estímulos aversivos. Esta última es una de las conductas que se ve mayormente afectada en los casos de depresión.

5.2.1. El estrés crónico provoca la disminución de conductas activas, efecto prevenido por la administración de sertralina.

Al someter a los animales a la prueba de natación forzada por un período de 300 segundos, se observa que las **conductas activas** reflejadas en la sumatoria de los tiempos de **escalamiento y natación** en los animales sometidos a restricción de movimiento, se ven significativamente ($p < 0,01$) disminuidos en comparación a lo observado en los animales controles (Fig. 7).

También, en la misma figura se observa que si junto con la restricción de movimiento se administra sertralina, ésta previene significativamente ($p < 0,01$) el efecto del estrés; lo que se ve reflejado en un aumento del tiempo en que los animales permanecen activos en el cilindro con agua.

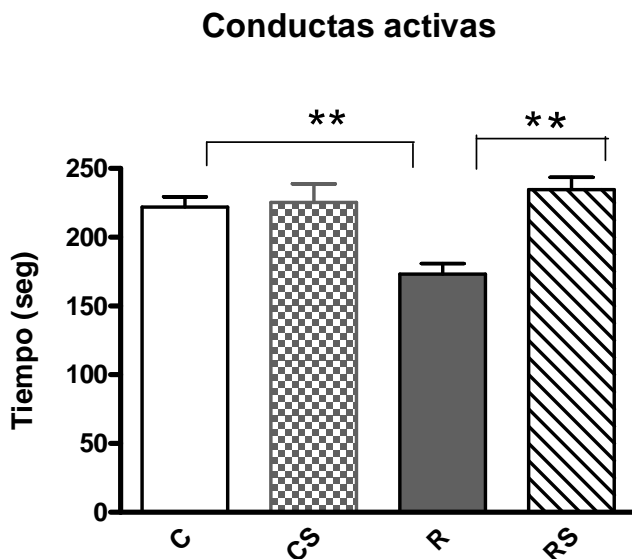


Figura 7. Conductas activas en el ensayo de natación forzada. La figura muestra la sumatoria de los tiempos en que los animales nadaron o escalaron el cilindro con agua. La restricción de movimiento provocó la disminución de estas conductas; mientras que la administración simultánea de sertralina en presencia del estrés, previno tal disminución. Los valores corresponden al promedio \pm EEM del tiempo en segundos. (Análisis de ANOVA y post-test de Newman-Keuls; $n=8$, para cada condición experimental).

** $p < 0,01$ control vs restricción; ** $p < 0,01$ restricción vs restricción + sertralina.

5.2.2. El estrés crónico provoca un aumento en la conducta de desesperanza aprendida, lo cual es prevenido por la administración de sertralina.

La **inmovilidad** en la prueba de nado forzado, es la conducta que mejor refleja el estado de **desesperanza aprendida** del animal, entendiendo por ésta, aquel estado que es percibido como algo incontrolable frente al cual no se puede hacer nada para cambiarlo (Lucki 1997). En la Fig. 8 se muestra el efecto del estrés sobre la prueba de la natación forzada, contabilizando el período de tiempo en que los animales presentan conductas activas como el escalamiento y natación. En esta prueba se observa que los animales estresados permanecen significativamente más tiempo inmóviles en comparación con los animales controles ($p < 0,01$), lo cual refleja un aumento en la conducta de desesperanza aprendida. Sin embargo, esta conducta es prevenida significativamente ($p < 0,001$), si simultáneamente

al estrés se administra sertralina. La desesperanza aprendida es una de las conductas que mejor refleja el estado depresivo en personas afectadas por esta patología.

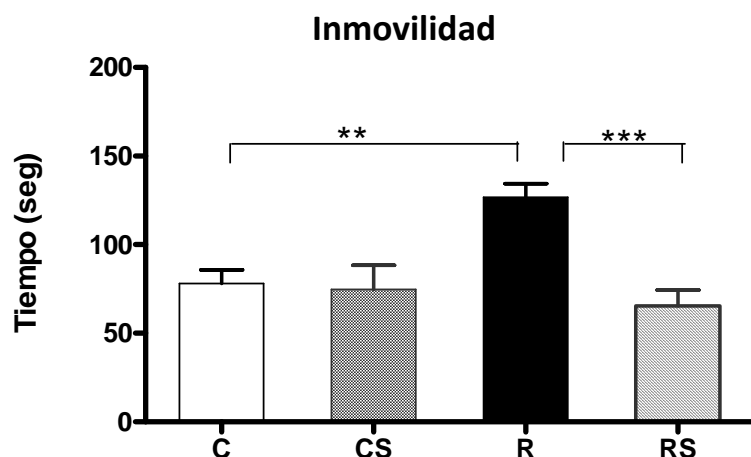


Figura 8. El estrés crónico incrementa la desesperanza aprendida, efecto prevenido por la sertralina. La figura muestra el tiempo en que los animales permanecieron inmóviles en el cilindro con agua. La restricción de movimiento provocó un aumento de esta conducta; mientras que la administración de sertralina a los animales estresados, previno tal conducta. Los valores corresponden al promedio \pm EEM del tiempo en segundos. (Análisis de ANOVA y post-test de Newman-Keuls; $n=8$ para cada grupo experimental).

** $p < 0,01$ control vs restricción; *** $p < 0,001$ restricción vs restricción + sertralina.

5.2.3. El estrés crónico promueve la conducta anhedónica, la cual es prevenida por la administración de sertralina.

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos al someter a los animales a la prueba de preferencia por una solución de sacarosa al 1% como agua de bebida. Esta prueba evalúa la condición anhedónica de los animales, es decir, la pérdida de interés por un estímulo placentero, como lo es el agua azucarada.

Se observa (Fig. 9) que antes de iniciar el protocolo de restricción de movimiento o la administración del fármaco (día 0), los animales muestran un 100% de preferencia por la solución azucarada. Sin embargo al cabo de 7 y 14 días posteriores a la restricción, ésta provoca una disminución significativa ($p < 0,01$) en la preferencia por la solución azucarada en comparación con los animales controles. Por otra parte, la sertralina por sí sola no ejerce ningún efecto sobre la preferencia por la solución de sacarosa. Sin embargo, si ésta se

administra simultánea con la restricción de movimiento, se observa que se previene significativamente ($p < 0.001$ y $p < 0.01$) la anhedonia provocada por el estrés, tanto a los 7 como a los 14 días respectivamente. Estos resultados muestran que los animales restringidos crónicamente disminuyen fuertemente la preferencia por beber una solución azucarada; es decir, muestran una conducta anhedónica que es prevenida por la administración de sertralina.

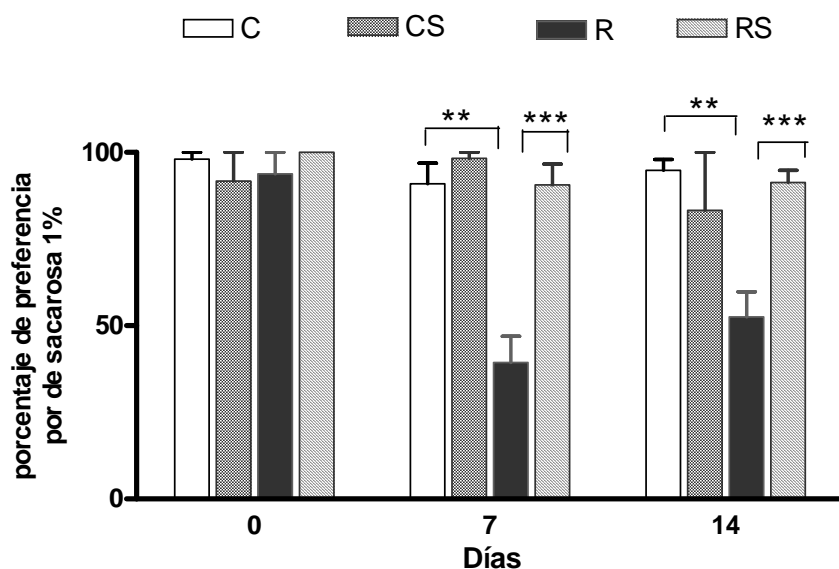


Figura 9. Prueba de evaluación de la conducta anhedónica. La restricción de movimiento genera una conducta anhedónica en los animales tanto a los 7 como a los 14 días en comparación con los animales controles. La administración de sertralina a los animales estresados previene la aparición de la conducta anhedónica. Los valores corresponden al promedio \pm EEM de las preferencias por la solución de sacarosa 1%. (ANOVA, no paramétrico, Kurskal-Wallis, $n=4$ para cada condición).

** $p < 0,01$ control vs restricción a los 7 y 14 días de tratamiento.

*** $p < 0,001$ restricción vs restricción/sertralina a los 7 y a los 14 días de tratamiento.

5.2.4. El estrés crónico disminuye la capacidad para adquirir respuestas condicionadas, lo que es prevenido por la administración de sertralina.

Una de las alteraciones más manifiestas en la depresión es la que ocurre a nivel de los procesos cognitivos. Para evaluar en nuestro modelo de estudio, si los animales con restricción de movimiento exhiben respuestas que se asocian a alteraciones cognitivas y, si la Sertralina previene tal conducta, se procedió a someterlos a la prueba de evitación activa. Esta prueba se basa en la clásica respuesta condicionada la cual es el eje del aprendizaje asociativo, en donde se reflejan las condiciones cognitivas del animal. En ella se determina la capacidad para asociar un estímulo aversivo (por ejemplo, choque eléctrico en las patas) con un estímulo sensorial (sonido). En nuestro modelo, esta respuesta se cuantificó como el porcentaje en la adquisición de respuesta condicionada (ARC) luego de un tiempo definido de estimulación eléctrica (0,2 a 0,5 mA por 10 segundos) el cual se repitió a lo largo de 30 minutos.

En la Fig. 10 se observa que los animales sometidos a restricción de movimiento presentan una disminución significativa ($p < 0,001$) en la capacidad para adquirir respuesta condicionada en comparación con los animales controles. Los animales estresados sólo logran un 10% de la ARC en comparación con el 30% en los animales controles. Estos resultados señalan que la restricción por movimiento provoca un deterioro en la capacidad asociativa y por ende en la capacidad cognitiva de los animales. La sertralina por sí sola también gatilla una disminución significativa ($p < 0,05$) en la capacidad de adquirir respuesta condicionada, respecto de los animales controles. Los animales con administración de fármaco sólo logran un 20% de ARC en comparación con un 30% de ARC en los animales controles. Sin embargo, cuando existe de por medio un estrés como el que genera la restricción de movimiento, se observa que se previene significativamente ($p < 0,05$) el deterioro cognitivo. (20% ARC en RS versus 10% ARC en R).

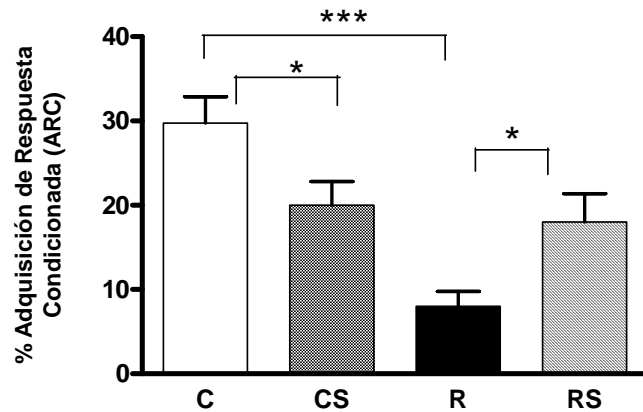


Figura 10. Adquisición de Respuesta Condicionada. La restricción de movimiento gatilla alteraciones cognitivas que son prevenidas por la administración de sertralina. Los valores corresponden al promedio \pm EEM del % de ARC. (ANOVA, no paramétrico, Newman-Keuls, $n=8$ para cada condición experimental). * $p<0,05$ control vs sertralina; * $p<0,05$ restricción vs restricción/sertralina; *** $p<0,001$ control vs restricción.

5.2.5. La restricción de movimiento disminuye la capacidad para evitar estímulos aversivos, efecto prevenido por la administración de sertralina.

La prueba de evitación activa también entrega información respecto a la capacidad de los animales para evitar el choque eléctrico en las patas después de estimularlos con un tono audible. Esta respuesta fue medida como el porcentaje de fallas en el escape (FE) que es un reflejo de la condición de desesperanza aprendida.

Los animales con restricción de movimiento (Fig 11) fracasan en un alto porcentaje (aproximadamente un 25%) al momento de escapar del shock eléctrico dado en las patas, posterior al tono audible; es decir, estos animales fracasan tanto en la asociación como en su capacidad de escapar, de moverse; permaneciendo en el compartimento de la jaula electrificada, la totalidad del tiempo que dura el estímulo eléctrico. Esta conducta ha sido interpretada como una condición de desesperanza aprendida. Bajo esta condición de restricción, la administración de sertralina mejora la capacidad de evitar el choque eléctrico.

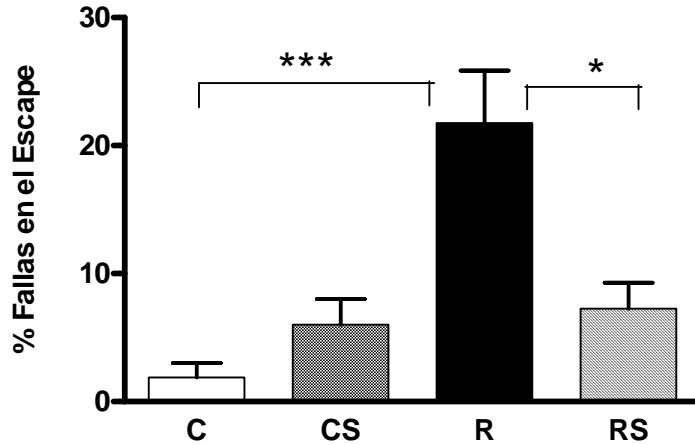


Figura 11. Prueba de evitación activa. La administración de sertralina previno el aumento en la incapacidad de evitar activamente estímulos aversivos provocados por la estimulación eléctrica en las patas. Los valores corresponden al promedio \pm EEM del % de FE. (Análisis de ANOVA y post-test de Newman-Keuls, $n=8$ para cada condición experimental).

* $p<0,05$ restricción vs restricción/sertralina *** $p<0,001$ control vs restricción

El conjunto de estos resultados muestran que el estrés por restricción de movimiento promueve cambios en algunos marcadores de estrés (ganancia en peso corporal) pero no en otros (como los niveles de corticosterona) (Tabla 5). De igual forma, el efecto de la restricción crónica de movimiento genera cambios en las conductas de los animales algunos de los cuales son prevenidos por la administración de sertralina.

Tabla 5. Resumen del efecto de la restricción de movimiento y la administración de sertralina sobre marcadores fisiológicos del estrés y pruebas conductuales asociadas a desesperanza aprendida.

	Sertralina	Restricción	Restricción + Sertralina
Marcadores de estrés			
Ganancia de peso	↓	↓	No Previene
Corticosterona	No afecta	No afecta	No afecta
Masa adrenal	No afecta	↑	No Previene
Conductas			
Anhedónica	No afecta	↑	Previene
Natación forzada (conductas activas)	No afecta	↓	Previene
Desesperanza (inmovilidad)	No afecta	↑	Previene
Aprendizaje asociativo	↓	↓	Previene

5.3. Análisis de la densidad de espinas dendríticas.

Las espinas dendríticas proporcionan parte del sustrato funcional en donde se lleva a cabo la sinápsis. Se ha señalado que el estrés crónico altera tanto la longitud de las dendritas como la densidad de las espinas (Magarinos y cols. 1996). Sin embargo, la administración crónica de fluoxetina en ratas juveniles, previene la aparición de espinas dendríticas en el hipocampo (Norrholm y cols. 2000). Por lo tanto resultó interesante evaluar en nuestro modelo, la densidad de espinas dendríticas frente a la administración de sertralina y al estrés crónico. En la Fig. 12-A se observa una fotografía representativa de una neurona piramidal del área CA1 del hipocampo, proveniente de cerebros impregnados con la tinción de Golgi. Se consideró como espina toda protrusión que emergiera desde la superficie de las dendritas, (Fig. 12- B).

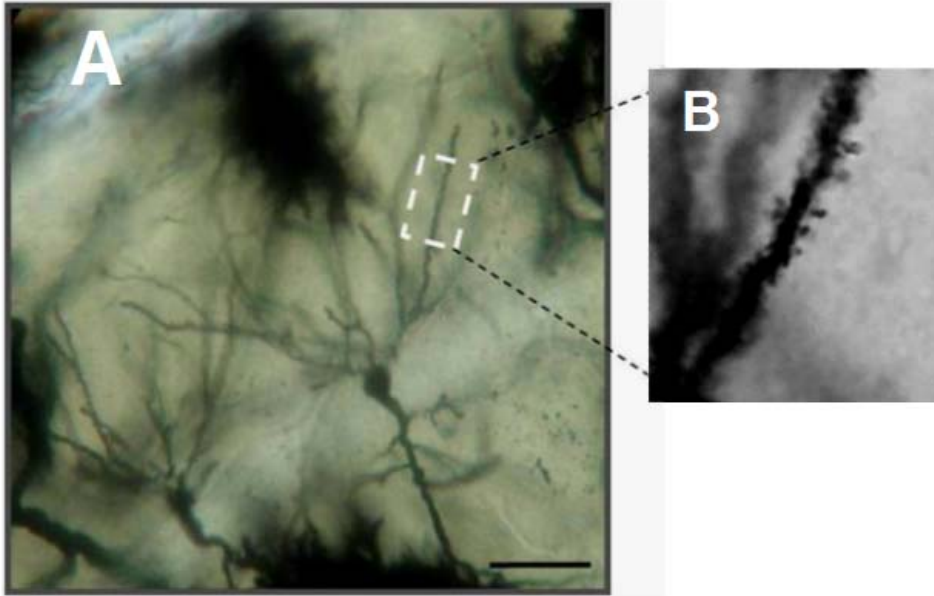


Figura 12. Neurona piramidal del área CA1 (A) con sus dendritas. En el recuadro se muestra una magnificación de una dendrita basal con sus espinas (B). La barra corresponde a 40 μm .

El recuento de espinas se inició desde el origen de la dendrita primaria a lo largo de 80 μm de longitud, dividida en 10 segmentos sucesivos de 8 μm cada uno. Los resultados muestran que en los primeros tres segmentos (Fig. 13-A), la densidad de espinas no cambia en ninguna condición experimental. Sin embargo, esta situación varió a medida que el conteo se distanció del soma neuronal (Fig. 13-B), observándose que los animales controles presentaban mayor densidad de espinas respecto a las otras condiciones. Para visualizar mejor estas diferencias, el análisis se realizó comparando el control con aquellos animales tratados con sertralina o bien sometidos a restricción.

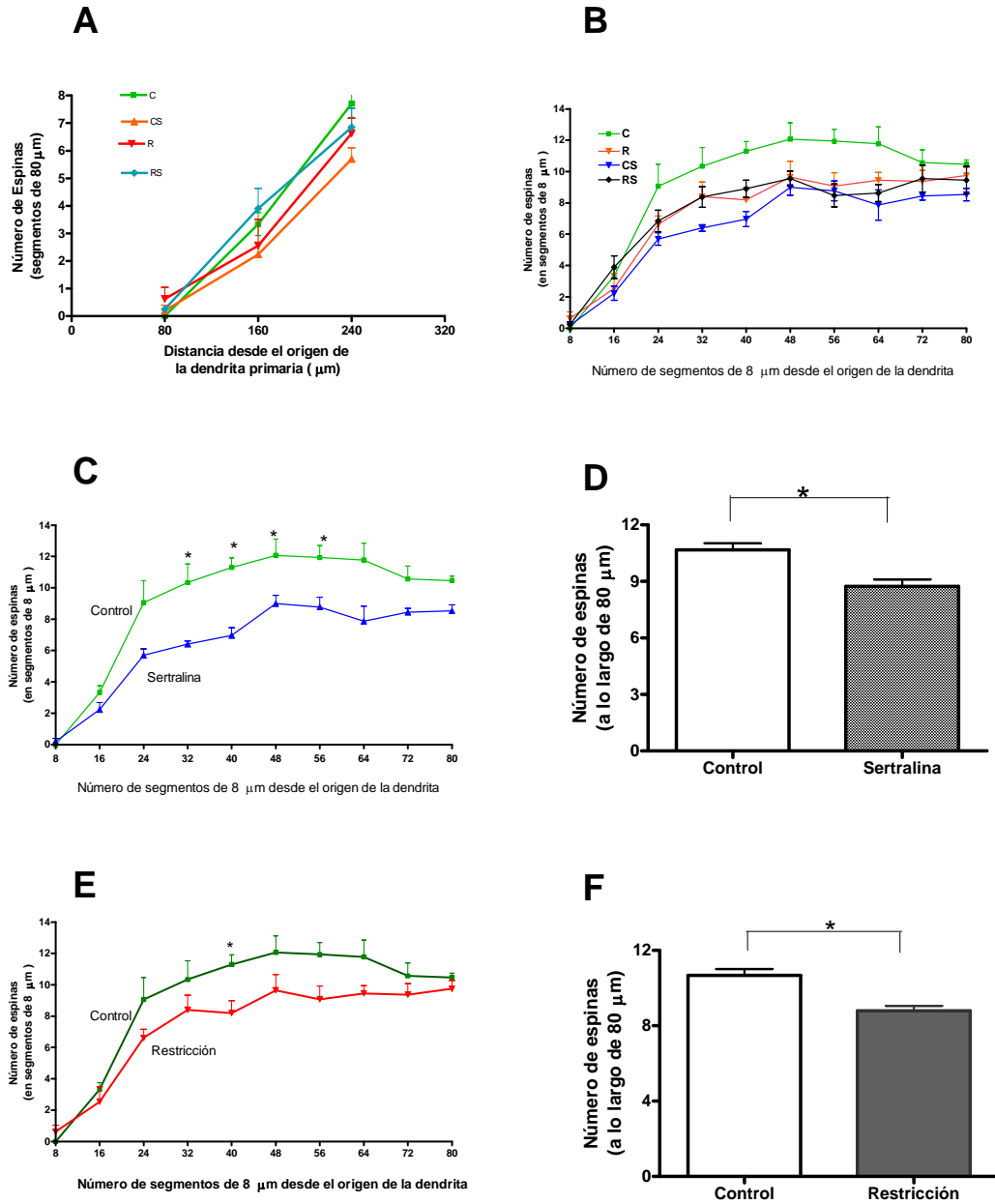


Figura 13. La densidad de espinas dendríticas cambia por el estrés y por el tratamiento con sertralina. La densidad de espinas en los 3 primeros no varía en ninguna condición experimental (A); sin embargo cambia en la parte más distal de la dendrita (B). Esta diferencia es significativa tanto en algunos segmentos como en la sumatoria del total de espinas entre el control y los administrados con sertralina o sometidos a restricción de movimiento (C-D; E-F).

Estas diferencias se hacen significativas en algunos segmentos; evidenciándose que la sertralina administrada en forma crónica reduce el número de espinas totales contabilizadas desde el cuarto segmento (Fig. 13 C- D). Por otra parte, el estrés crónico produjo una reducción significativa en el número de espinas totales (Fig. 13 E-F). Estos resultados permiten concluir que tanto la sertralina como el estrés promueven una disminución en la densidad de espinas, en la parte más distal de la dendrita primaria.

5.4. Cambios moleculares asociados a plasticidad sináptica promovidos por estrés crónico y por la administración de sertralina.

En la búsqueda de asociación de cambios conductuales en sujetos depresivos con alteraciones moleculares, se ha propuesto que fenómenos de plasticidad sináptica, como el remodelamiento dendrítico y el de espinas, podrían estar mediando los efectos de los fármacos antidepresivos (D'Sa *y cols.* 2002; Spedding *y cols.* 2003; Fuchs *y cols.* 2004). El hipocampo es una de las estructuras límbicas que ha sido extensamente estudiada en personas con depresión, aquí yacen procesos cognitivos y emocionales los que se ven alterados como consecuencia de esta enfermedad (McEwen *y cols.* 1995). Una de las hipótesis, propone que existiría un remodelamiento sináptico en áreas límbicas como el hipocampo, en donde habrían modificaciones tanto en las prolongaciones del árbol dendrítico como en las espinas que en él se desarrollan (Magarinos *y cols.* 1997; McEwen 1999; McKittrick *y cols.* 2000).

En nuestro modelo se estudiaron proteínas asociadas al establecimiento de los contactos sinápticos y al remodelamiento del citoesqueleto de actina (Fig. 14) como una aproximación al remodelamiento dendrítico; hipotetizando que este remodelamiento pudiese verse alterado en su dinámica producto del estrés y, en el cual la administración de sertralina probablemente pudiese prevenir dichos cambios.

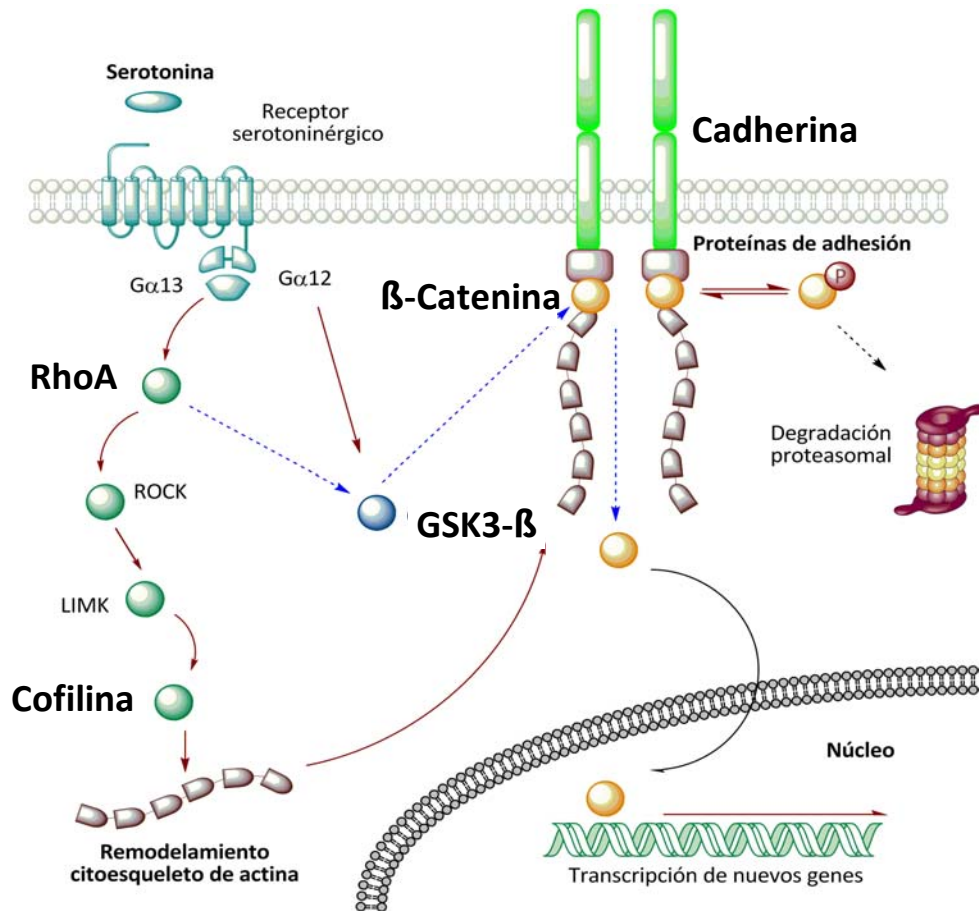


Figura 14. Esquema que muestra los marcadores proteicos a determinar en el modelo animal sometido a restricción por movimiento y a la administración de sertralina. Como marcadores de adhesión se estudiarán: N-cadherina y β-catenina; y como marcadores de la dinámica del citoesqueleto de actina: RhoA, cofilina y GSK3-β.

5.4.1. Efecto del estrés crónico y de la administración de sertralina sobre los niveles de proteínas involucradas en la adhesión celular.

Las cadherinas corresponden a proteínas consideradas como moléculas de adhesión celular que participan en la formación de la sinapsis, a través de interacciones homofílicas entre sus ectodominios presentes entre el elemento pre y postsináptico (Togashi y cols. 2002). A través de estas interacciones, el citoesqueleto de actina puede ser modulado, puesto que

la porción C-terminal de las N-cadherinas interactúa con α/β -catenina, y las ancla al citoesqueleto de actina, permitiendo así que estas interacciones regulen la dinámica de los contactos sinápticos (Yu y cols. 2004). De acuerdo a las modificaciones conductuales observadas luego del estrés crónico y su prevención por la administración del antidepressivo, se determinó si frente a estas condiciones experimentales, se inducen cambios en la inmunoreactividad de N-cadherina y β -catenina que pudiesen asociarse a los cambios en la anhedonia, la desesperanza aprendida y adquisición de respuesta condicionada.

5.4.1.1. Efecto del estrés crónico y de la administración de sertralina sobre la inmunoreactividad y sobre los niveles de N-cadherina en el hipocampo.

En la Fig. 15 se observa la distribución de la inmunoreactividad de N-cadherina en el hipocampo de un animal control. A nivel del Giro Dentado (GD) se observa ausencia de inmunoreactividad en los somas de las neuronas granulares; sin embargo en el estrato molecular (e.m.) y estrato lacunoso molecular (e.l.m.), se detecta la presencia de N-cadherina. Ambos estratos corresponden a proyecciones de los somas neuronales. En el hipocampo se observa inmunoreactividad de N-cadherina en el estrato más externo o polimórfico denominado estrato oriens (e.o) y en el estrato radiatum (e.r.). Por otro parte, el estrato piramidal compuesto por neuronas que envían sus proyecciones fuera del hipocampo y que comprenden las áreas del Cuerno de Ammon (CA) CA1, CA2 y CA3 no presentan inmunoreactividad para N-cadherina. Por otro lado, el estratum lucidum adyacente al CA3 también presenta inmunoreactividad para esta proteína.

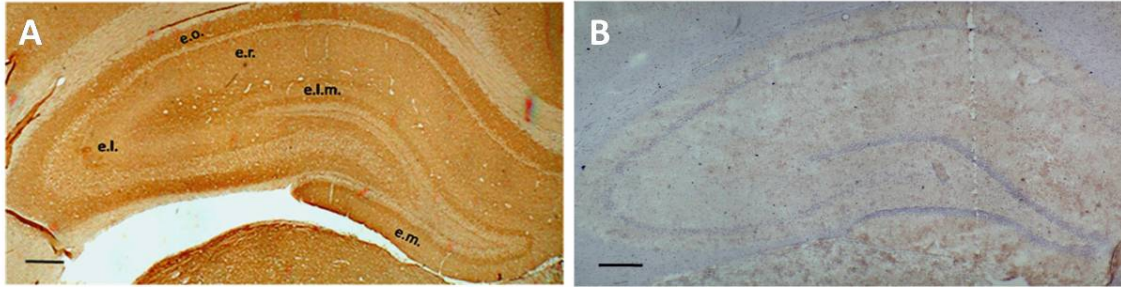


Figura 15. Microfotografía (5x) representativa de la distribución de la inmunoreactividad de N-cadherina. (A) En todas las condiciones experimentales la proteína se localiza a nivel del Cuerno de Amón en los estratos oriens (e.o.), radiatum (e.r.) y lacunoso (e.l.). A nivel del Giro Dentado el estrato molecular (e.m.) y el lacunoso molecular (e.l.m.) adyacente a la capa de neuronas granulares del GD, presentan una intensa inmunoreactividad. (B) Control negativo realizado sólo en ausencia del anticuerpo contra N-cadherina y post-tinción de Nissl. (La escala de la barra: 100 μ m).

Dada la intensidad de la inmunoreactividad observada en el estrato oriens y radiatum, se determinó si el estrés y la administración del antidepresivo, provocaban cambios en la inmunoreactividad para la N-cadherina en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo. La cuantificación densitométrica indica que la inmunoreactividad de esta proteína en el estratum oriens sobre el área CA1 (Fig. 16), no se modifica bajo ninguna condición experimental ensayada. Por el contrario, en el área CA3 la intensidad relativa de la marca de N-cadherina (Fig. 17) disminuye significativamente en los animales sometidos a estrés en comparación con los animales controles ($p < 0.05$). La disminución en la inmunoreactividad de N-cadherina en el área CA3, no es prevenida cuando a los animales estresados se les administra sertralina en forma crónica.

Estos resultados señalan que la inmunoreactividad para la N-cadherina, cambia diferencialmente frente al estrés, siendo el área CA3 del hipocampo más sensible. Por otra parte, la administración de sertralina no provoca cambios en la inmunoreactividad en ninguna de las dos áreas estudiadas, y no es capaz de prevenir la disminución en la marca inmunoreactiva de N-cadherina promovida por el estrés en el área CA3 del hipocampo.

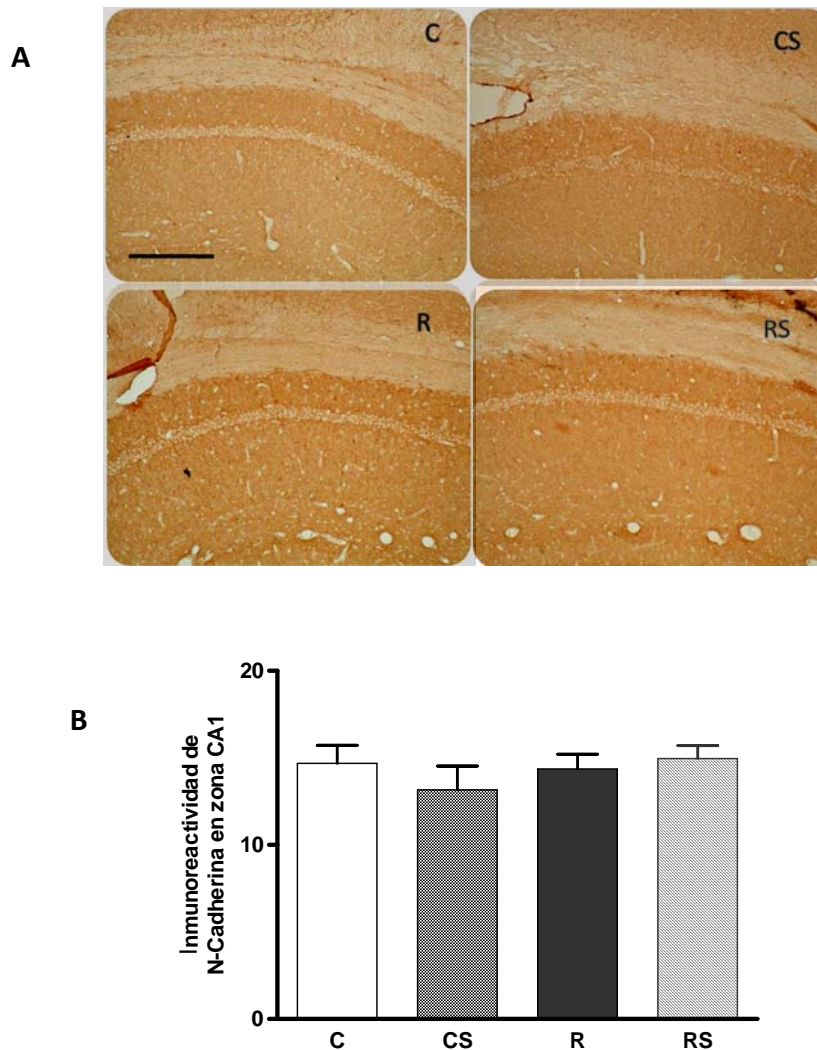


Figura 16. Respuesta de N-cadherina al estrés y a sertralina en la región CA1 del hipocampo. **A:** Microfotografías (5x) representativas de la inmunohistoquímica de N-cadherina en el estrato oriens de la zona CA1. C: control; CS: control + sertralina; R: estrés y RS: estrés + sertralina. (Escala: 100 μ m). **B:** La cuantificación densitométrica de la marca inmunoreactiva de la zona CA1 muestra una distribución pareja para cada una de las condiciones ensayadas. Los valores representan el promedio \pm EEM del porcentaje de píxeles específicos. (Análisis de ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis y post-test de Dunns, n=4) (La escala de la barra: 1000 μ m).

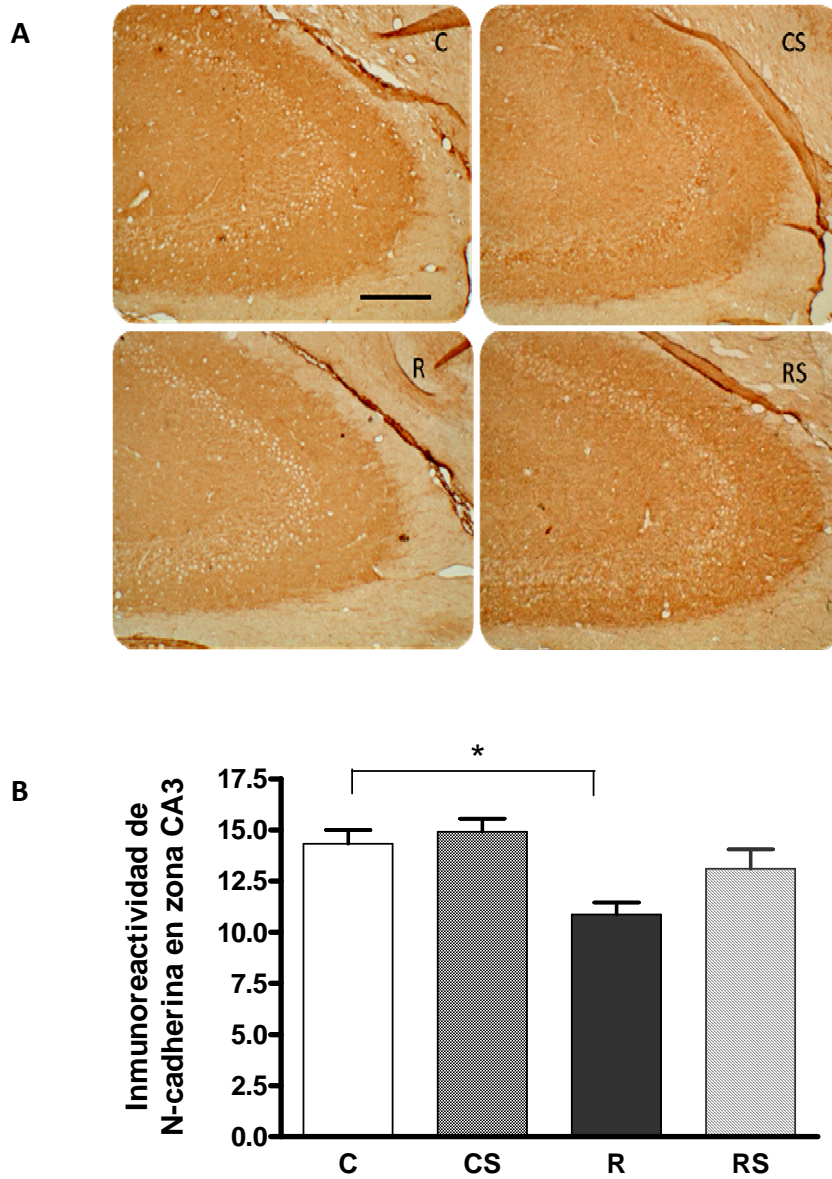


Figura 17. Respuesta de N-cadherina al estrés y a sertralina en la región CA3 del hipocampo **A:** Microfotografías (5x) representativas de la inmunohistoquímica de N-cadherina, en el estrato oriens de la zona CA3. C= control; CS = control + sertralina; R= estrés; RS= estrés + sertralina. Se observan cambios en la inmunoreactividad de N-cadherina en la zona CA3 dependiendo de la condición experimental (Escala: 100 μ m). **B:** Estos cambios se reflejan en la cuantificación densitométrica de la marca inmuno-reactiva en esta zona. Los valores representan el promedio \pm EEM del porcentaje de pixeles específicos. (Análisis de ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis y post-test de Dunns. * $p < 0.05$; $n=4$, para cada grupo experimental) (La escala de la barra: 1000 μ m).

5.4.1.2. Efecto del estrés crónico y de la administración de sertralina sobre los niveles y la inmunoreactividad de β -catenina en el hipocampo.

Se ha descrito que la transmisión sináptica requiere, entre otras condiciones, la estabilización entre el elemento pre y postsináptico, lo cual está dado por la presencia de uniones adherentes, en donde participa β -catenina junto con N-cadherina (Uchida y cols. 1996). La proteína β -catenina requiere por tanto estar localizada cercana a la membrana plasmática, tanto del elemento pre y postsináptico, para así facilitar la estabilización junto a proteínas de citoesqueleto. Se evaluó si la distribución de la inmunoreactividad, así como los niveles de β -catenina en el hipocampo se modificaba en respuesta al estrés y a la administración crónica del antidepresivo sertralina.

En la Fig. 18 se muestra un western representativo de β -catenina, en donde se observa que el anticuerpo utilizado detecta una banda de aproximadamente 90 kDa en extractos de hipocampo. Para el análisis densitométrico se utilizó, la razón de la intensidad de las bandas de β -catenina respecto a las bandas de β -actina, expresadas ambas en píxeles.

Los resultados muestran que la sertralina en animales controles no provoca cambios en la cantidad de esta proteína a nivel del hipocampo. Sólo los animales estresados y sometidos a la administración de sertralina presentan un aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de β -catenina respecto de los animales con restricción de movimiento y a los controles administrados con sertralina. Este resultado señala que los niveles de β -catenina son afectados por la presencia conjunta del fármaco antidepresivo sumado al estrés por restricción de movimiento.

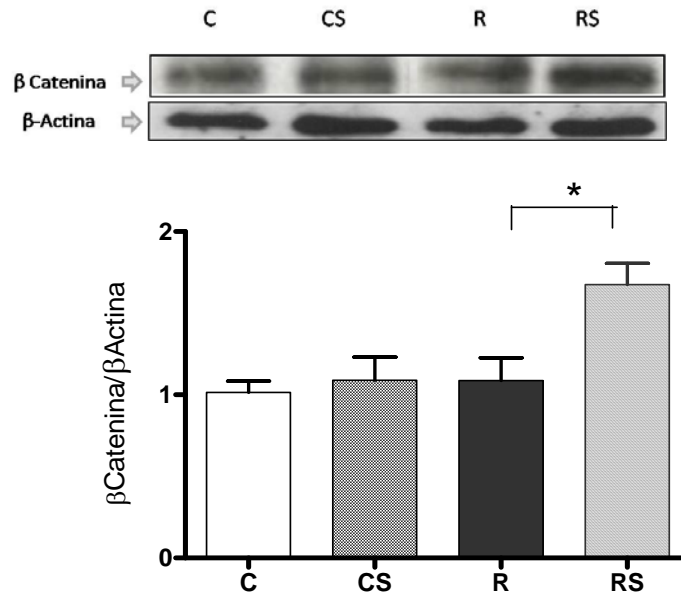


Figura 18. El estrés crónico junto con la administración simultánea de sertralina inducen un aumento significativo en los niveles de β -catenina determinada por Western blot, a partir de extractos de hipocampo. Los resultados son expresados como el promedio \pm EEM de los valores estandarizados respecto al valor control representado por β -actina. (Análisis de ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis y post-test de Dunns). * $p < 0.05$; $n = 8$, para cada grupo experimental.

En la Fig. 18 se muestra la distribución de la inmunoreactividad de β -catenina en el hipocampo. Se observa que en general la proteína tiene una distribución diferente en los animales controles respecto del resto de las condiciones experimentales. En los animales controles la proteína se localiza mayoritariamente en los núcleos de las neuronas del CA y del GD (Fig. 19-A), lo que no se observa en el resto de las condiciones experimentales (Fig. 19-B). En los animales controles, los estratos oriens, lucidum y radiatum presentan baja inmunoreactividad para β -catenina (Fig. 19-A), a diferencia de lo que se observa en N-cadherina; en cambio en el resto de las condiciones, la β -catenina se localiza principalmente en fibras del estrato oriens pero escasamente en los somas de las neuronas piramidales (Fig. 19-B).

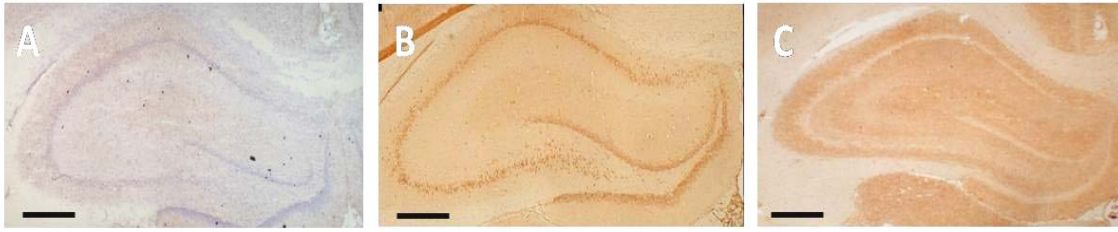


Figura 19. Microfotografía (5x) representativa de la distribución de la inmunoreactividad de β -catenina. (A) Se muestra un control negativo en el cual se omitió el anticuerpo primario. Se muestra, a modo de ejemplo, un corte histológico correspondiente a un animal control (A) y a modo de ejemplo, un corte de un animal tratado con sertralina (C). (La escala de la barra = 100 μ m)

Para tener una aproximación más cuantitativa de estos cambios, se comparó la intensidad de la marca inmunoreactiva de β -catenina en el estrato oriens correspondiente al área CA1 y CA3 de las neuronas piramidales del Cuerno de Amon. Los resultados muestran que en el área CA1 el estrés por sí solo no modifica la intensidad de β -catenina en este estrato; en cambio, la administración de sertralina promueve un aumento en la inmunoreactividad en comparación a los animales controles, sólo en éstos animales se observa localización de la proteína en los somas, tanto en el estrato piramidal del Cuerno de Amon como en las neuronas granulares del Giro Dentado. (Fig. 20). En forma similar, en los animales estresados la administración del fármaco incrementa significativamente ($p < 0,05$) la inmunoreactividad en comparación a su control. Estos resultados indican que la administración del fármaco promueve una variación en la inmunoreactividad de la β -catenina en las fibras del estrato oriens cercano a la zona CA1.

En la Fig. 21, se muestra el resultado de la inmunohistoquímica para β -catenina en el área CA3 del hipocampo. En el caso de los animales controles se observa una marca en núcleos de las neuronas piramidales mucho más intensa que en el resto de las condiciones experimentales (Fig. 21-A y 21-B). De forma similar a lo que ocurre en el estrato oriens del área CA1, la administración de sertralina indujo un aumento significativo de β -catenina respecto al control ($p < 0,05$) (Fig. 21 – C) en el zona CA3 del hipocampo.

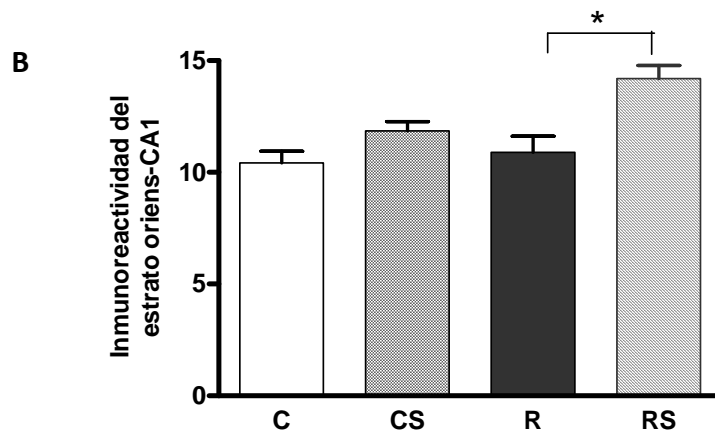
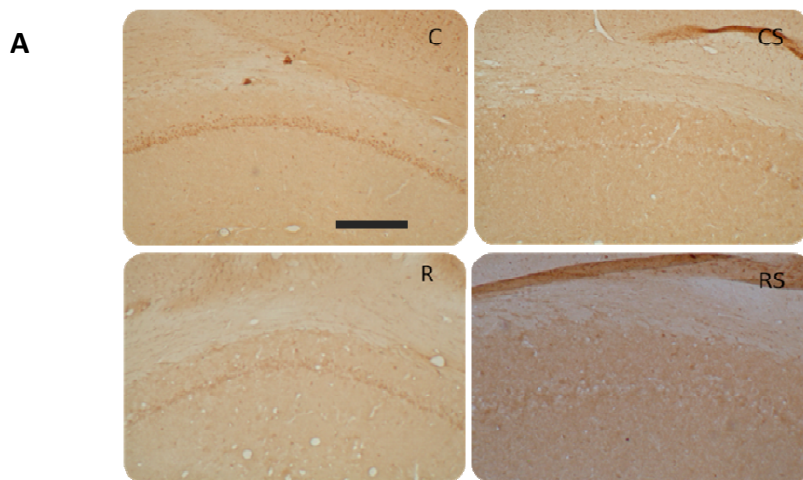
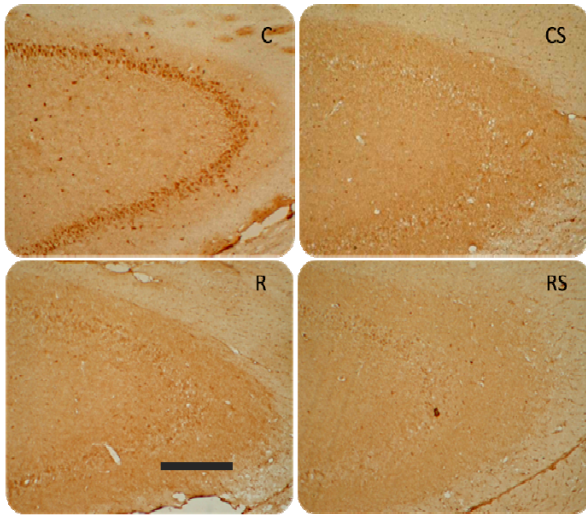


Figura 20. Cuantificación densitométrica de la inmunoreactividad de β -catenina en el área CA1 del Hipocampo, expresada como promedio \pm EEM del porcentaje de pixeles. El estrés crónico simultáneo con la administración de sertralina inducen un aumento significativo en los niveles de β -catenina determinada por inmunohistoquímica. (Análisis de ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis y post-test de Dunns). * $p < 0.05$; $n=8$, para cada grupo experimental. (La escala de la barra: 1000 μ m).

A**B**

	CONTROL	+++++++
	CONTROL SERTRALINA	++++
	RESTRICCION	++++
	RESTRICCION SERTRALINA	++++

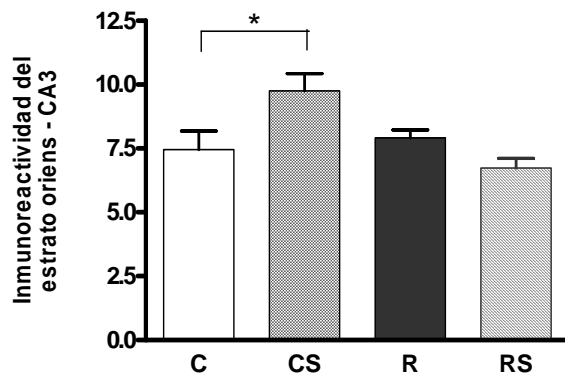
C

Figura 21. Cuantificación densitométrica de la inmunoreactividad de β -catenina en el área CA3. **A:** Microfotografías (5x) representativas de la inmunohistoquímica de β -catenina en el estrato oriens. **B:** Se muestra un detalle (10x) de la presencia de β -catenina a nivel de los somas de las neuronas piramidales del área CA3. **C:** Cuantificación densitométrica de la inmunoreactividad de β -catenina en el área CA3 del hipocampo, expresada como promedio \pm EEM del porcentaje de pixeles. La administración de sertralina induce un aumento significativo en los niveles de β -catenina determinada por inmunohistoquímica.. (Análisis de ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis y post-test de Dunns). * $p < 0.05$; $n = 8$, para cada grupo experimental). (La escala de la barra = 1000 μm).

Por otra parte, ni el estrés ni la administración de sertralina en animales estresados, provocó cambios en la intensidad de la marca de β -catenina en la zona CA3. Estos resultados sugieren que dependiendo de la zona hipocámpal la inmunoreactividad de la β -catenina cambia en respuesta a la administración de sertralina. El conjunto de estos resultados, muestra que si bien los niveles de β -catenina no cambian excepto en animales que han sido estresados y además han recibido el antidepresivo; la presencia de sertralina por sí sola, provoca una distribución de β -catenina principalmente en las fibras del estrato oriens, más que en los somas de las neuronas piramidales.

5.4.1.3. GSK3 β y su relación con los niveles de β -catenina

Se ha señalado que la GSK3 β es una proteína quinasa activa constitutivamente y su inactivación es regulada por fosforilaciones (Ali y cols. 2001). Entre las proteínas que fosforila se encuentra β -catenina, con lo cual se favorece su degradación vía proteosomal impidiendo así que actúe como factor transcripcional. Por otra parte, GSK3 β ha sido relacionada con desórdenes del ánimo y es blanco de fármacos para el tratamiento de estas patologías (Jope y cols. 2004). La Fig. 22-A muestra un gel representativo de los niveles de GSK3 β determinados mediante Western. El análisis densitométrico, determinado como la razón de la intensidad de las bandas de GSK3 β respecto a las bandas de β -actina expresadas ambas en píxeles, muestra una banda de aproximadamente 48 kDa, cuya intensidad aumenta significativamente en aquellos animales sometidos a la administración del fármaco ($p < 0,05$) o al estrés ($p < 0,05$) (Fig. 22- B). Estos resultados indican que la masa de la GSK3 β incrementa bajo el tratamiento crónico de sertralina o por la restricción de movimiento. Sin embargo, se ha descrito que la actividad de esta enzima es regulada pos-traduccionalmente por fosforilaciones en residuos de tirosina y serina. La fosforilación en Ser-9 provoca la reducción de su actividad enzimática y por tanto fue importante determinar cambios en el estado de fosforilación inhibitoria. El análisis densitométrico de los niveles de pGSK3 β respecto a la intensidad de las bandas de β -Actina señala que ninguna de las condiciones experimentales provoca cambios en la cuantía de la fosforilación de esta quinasa (Fig. 22 - C). Como se mostró en la Fig. 22-B, los niveles totales de esta enzima incrementaron por los tratamientos; sin embargo los niveles de pGSK3 β en relación a los niveles de GSK3 β total se reducen significativamente ($p < 0,01$).

Estos resultados indican que aunque la masa total de la quinasa aumenta; este cambio no se correlaciona con cambios en los niveles de fosforilación inhibitoria de la quinasa. Estos resultados permiten inferir que la reducción en la forma inhibida de la GSK3 se correlaciona con un aumento en la forma activa de la quinasa, basándose en el cambio de la masa de ésta. Sin embargo, los cambios en los niveles de la β -catenina analizados por Western, no podrían correlacionarse con cambios en la actividad GSK3 β .

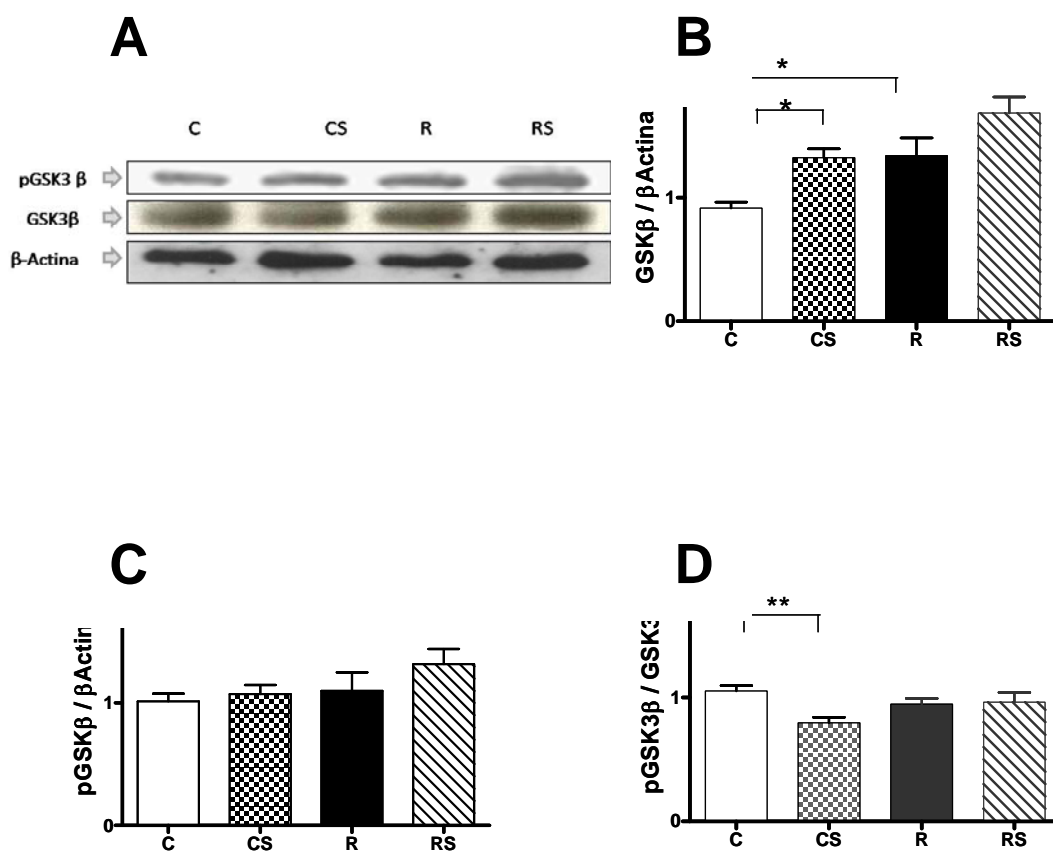


Figura 22. Niveles de GSK3 β y su forma fosforilada. Los resultados son expresados como el promedio \pm EEM de los valores estandarizados respecto al valor control representado por β -actina o GSK3 β . (A) Se muestra un aumento significativo en los niveles de GSK3 β frente a la administración de sertralina y a la restricción por movimiento. (B) Se muestra que la isoforma fosforilada en ser-9 GSK3 β no presenta modificaciones en sus niveles en ninguna condición experimental respecto a los niveles de β -actina. (C) Se muestra el aumento de la forma activa de la proteína frente a la administración de sertralina. (Análisis de ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis y post-test de Dunns). * $p < 0.05$; $n = 8$, para cada grupo experimental.

5.4.2. Efecto del estrés crónico y de la administración de sertralina sobre los niveles de proteínas involucradas en citoesqueleto de actina.

El crecimiento dendrítico ocurre a través de un proceso dinámico de extensión y retracción de filopodios hasta formar las conexiones sinápticas (Dailey y cols. 1996; McAllister 2000). A su vez, la estabilidad de la sinápsis está regulada, entre otras, por la participación de GTPasas pequeñas asociadas al citoesqueleto de actina, como RhoA; las que modulan la morfogénesis y la plasticidad de espinas dendríticas, lugar donde ocurre la sinápsis (Nakayama y cols. 2000; Luo 2002). Existe evidencia que una de las proteínas claves en la polimerización y despolimerización del citoesqueleto de actina, es la cofilina, quien se asocia a los cambios morfológicos de las espinas dendríticas (Racz y cols. 2006).

5.4.2.1. RhoA y el citoesqueleto de actina.

En la Fig. 23 se muestra la distribución general de la inmunoreactividad de RhoA en todo el Hipocampo. En la zona del Cuerno de Amon, la marca de la proteína es más notoria en el estrato oriens en comparación con el estrato radiatum, y está ausente en los somas de las neuronas piramidales. Además el estratum lucidum de esta última zona también presenta inmunoreactividad para esta proteína. A nivel del giro dentado, se observa ausencia de inmunoreactividad en los somas de las neuronas granulares; sin embargo en el estrato molecular y estrato lacunoso molecular se detecta la presencia de RhoA. Esta distribución es coincidente con la observada para β -catenina y N-cadherina.

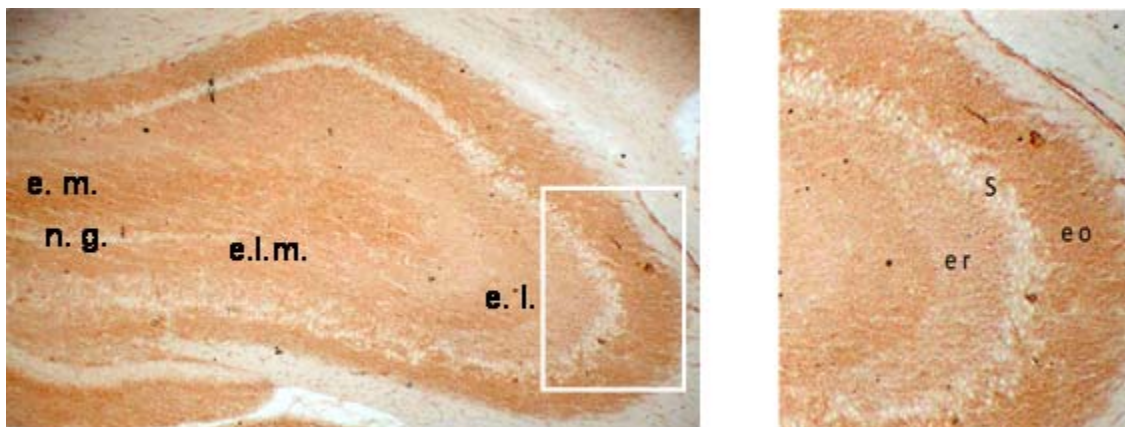


Figura 23. Microfotografía (5x) representativa de la distribución de la inmunoreactividad de RhoA. La distribución de RhoA ocurre preferentemente en las fibras del estrato oriens (e.o.) de las neuronas piramidales en comparación con el estrato radiatum (e.r.). Los somas (s) de estas neuronas se observan completamente blancos, sin marca. A nivel de Giro Dentado, se observa marca inmunoreactiva en los estratos lucidum (e.l.), molecular (e.m.) y lacunoso molecular (e.l.m.); observándose además ausencia de marca en los somas de las neuronas granulares (n.g.).

En la Fig. 24 se muestra un resultado representativo de los niveles de RhoA determinados mediante Western blot. El análisis densitométrico, indicado como la razón de la intensidad de las bandas de RhoA respecto a las bandas de β -actina, expresadas ambas en píxeles, muestra una banda de aproximadamente 21 kDa cuya intensidad aumenta en aquellos animales sometidos a restricción de movimiento respecto de los animales controles. La administración de sertralina no modifica los niveles de la proteína y si se administra en los animales sometidos a restricción de movimiento no previene el aumento observado en respuesta al estrés por restricción. Estos resultados señalan que el estrés gatilla modificaciones en los niveles de la proteína RhoA, la cual se sabe se encuentran asociada al citoesqueleto de actina; lo que hace suponer que podrían existir modificaciones morfológicas asociadas al fenómeno del estrés frente a la cual la administración de sertralina no es capaz de prevenir tal modificación.

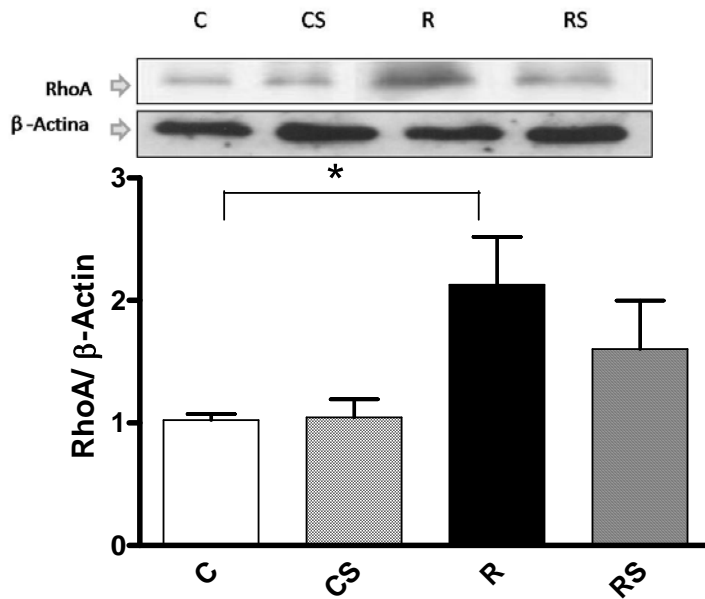


Figura 24. El estrés crónico inducen un aumento en los niveles de RhoA determinada por Western blot. Los resultados son expresados como el promedio \pm EEM de los valores estandarizados respecto al valor control representado por β -actina. (Análisis de ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis y post-test de Dunns).

* $p < 0.05$. (n = 10 animales para cada condición experimental).

5.4.2.2. Cofilina y el citoesqueleto de actina

En la Fig. 25 se muestra un resultado representativo de los niveles de cofilina determinados mediante Western blot. El análisis densitométrico, indicado como la razón de la intensidad de las bandas de p-cofilina Ser-9 respecto a las bandas de cofilina total, expresadas ambas en pixeles, muestra una banda de aproximadamente 19 kDa la que no muestra cambios significativos en ninguna de las condiciones ensayadas.

El conjunto de los resultados de estas proteínas asociadas al citoesqueleto de actina, muestran que RhoA aumenta significativamente frente a la restricción de movimiento; sin embargo no promueve cambios significativos en los niveles de p-cofilina. Por otra parte, la administración de sertralina no promueve cambios en ninguna de las dos proteínas, lo cual sugiere que si existiese un cambio a nivel de proteínas del citoesqueleto, probablemente la vía de participación pudiese ser otra y no la vía de la LIMK.

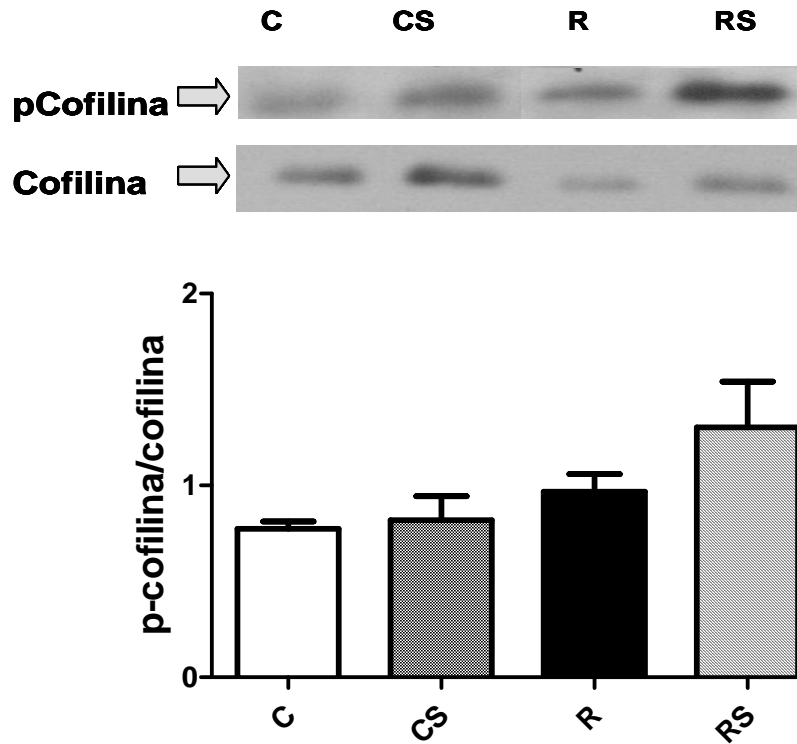


Fig. 25. Niveles de cofilina en extractos de hipocampo, determinada por Western blot. Los resultados son expresados como el promedio \pm EEM de los valores estandarizados respecto al valor control representado por Cofilina total (n=8 en cada condición experimental).

El conjunto de estos resultados muestran que el estrés por restricción de movimiento promueve cambios en algunos marcadores proteicos pero no en otros (Tabla 6). De igual forma, el efecto de la restricción crónica de movimiento genera cambios en las proteínas de adhesión celular los cuales son prevenidos por la administración de sertralina.

Tabla 6. Resumen del efecto del estrés y de la sertralina sobre marcadores morfológicos y proteicos.

	Marcadores		C	C+S	R	R+S
	Densidad de espinas (CA1)		-	↓	↓	↓
Proteínas de adhesión	N-cadherina	CA1	-	-	-	-
		CA3	-	-	↓	-
	β-catenina	CA1	-	-	-	↑
		CA3	-	↑	-	-
		WB	-	-	-	↑
Proteínas asociadas a regulación de citoesqueleto	p-GSK3β		-	↓	-	-
	RhoA		-	-	↑	↑
	p-cofilina		-	-	-	-

En el análisis se comparó, el efecto de la sertralina (CS) y del estrés (R) respecto del control (C); y por otro lado el efecto de la sertralina administrada en animales restringidos (RS) versus el efecto del estrés (R) por sí solo.

- : corresponde al valor del control.

↑ o ↓ : corresponden a aumentos o a disminuciones.

6. DISCUSION

6.1. Evolución del concepto de estrés.

El estrés persistente en el tiempo, se ha propuesto como uno de los factores más importantes en gatillar alteraciones psiquiátricas, entre ellas la depresión (Mazure y cols. 1997; Kendler y cols. 2000; van Praag 2004). La capacidad de responder a estímulos estresantes compromete la participación de diversos componentes del organismo por lo tanto se considera que es un proceso generalizado y conservado evolutivamente en todos los organismos. Sin embargo, el tipo de respuesta y la intensidad de ésta varían incluso entre los individuos de una misma especie. Algunas de las interrogantes que surgen en este contexto, es definir cuándo y bajo qué condiciones un estímulo se vuelve estresante, o por qué un mismo estímulo puede resultar dañino para un individuo e indiferente para otro, o cómo un factor ambiental -que es algo externo al individuo- se transforma en un riesgo para la salud mental de una persona, o a través de qué mecanismos los mediadores del estrés se transforman en elementos desencadenantes de patologías (de Kloet y cols. 2005).

El concepto de estrés se fue construyendo desde los aportes realizados por Claude Bernard (1865) quien propuso la existencia de un medio interno constante que rodeaba a las células, lo que fue acuñado como “homeostasis” por Cannon (1929), quien también aludió a que cualquier situación psicosocial (por ejemplo, pánico traumático), que gatillara un cambio agudo en la secreción de la glándula adrenal representaba una amenaza a la homeostasis, frente a la cual el organismo desarrollaba una respuesta de “fight or flight” (pelea o escape). Posteriormente Hans Selye (1936) conceptualizó la fisiología del estrés en base a dos componentes; uno que involucra una serie de respuestas que él denominó “síndrome de adaptación general”, y el otro que corresponde al “desarrollo de un estado patológico por un stress no aliviado”. Selye señaló al síndrome de adaptación general como un proceso en el que primero se genera una “señal de alarma”, a partir de la cual el cuerpo se prepara para “la pelea o la huida” mediante la activación del eje HHA (Goldstein y cols. 2007). Hace poco años, Sterling y Eyer (1988) introdujeron el término “alostasis” para referirse a los niveles de actividad requerida por el individuo para “mantenerse estable a través del cambio” en busca de la respuesta unificadora de su organismo (Goldstein y cols. 2002). En

este proceso se generan respuestas a distintos niveles involucrando la participación del sistema nervioso, cardiovascular, inmunológico y metabólico con la finalidad que faciliten la acomodación del individuo. El costo de este “acomodamiento al estrés” es lo que se denomina “carga alostática”; es decir el desgaste acumulativo que ocurre en el tiempo por mantener un estado estable frente a un ambiente adverso (McEwen 1998; McEwen 2007). A pesar de estas nuevas definiciones que muestran nuevas reflexiones en torno a este tema, aún no queda claro a través de qué mecanismos bioquímicos las situaciones adversas y persistentes se traducen en patologías psiquiátricas. En este trabajo se ha intentado abordar a través de un modelo animal de depresión, el efecto que tiene una situación adversa y persistente en el tiempo sobre el remodelamiento dendrítico de neuronas del hipocampo.

6.2. Marcadores de estrés y el efecto de sertralina.

Para que un modelo animal de depresión tenga validez predictiva debe ser razonablemente análogo en su manifestación o sintomatología a lo observado en humano, debe causar cambios conductuales que puedan ser monitoreados objetivamente y que puedan ser revertidos por la misma modalidad de tratamiento que en humanos (McKinney y cols. 1969; Papp y cols. 1996). En la búsqueda de modelos animales de depresión, se ha planteado que situaciones adversas, continuas e insalvables, resultan ser un buen estresor para desencadenar cuadros análogos a la depresión (McEwen 2000). Se ha mencionado que entre los mediadores de la respuesta al estrés, se encuentra la activación del sistema nervioso autonómico, con la subsecuente secreción de catecolaminas, y la activación del eje HHA producto de la desregulación en su tono inhibitorio asociado a la secreción de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) (Tafet y cols. 2003; Chrousos y cols. 2007).

En nuestro modelo de estudio - ratas sometidas por 14 días a restricción crónica de movimiento, se encontró que los animales estresados no presentaron un aumento estadísticamente significativo de corticosterona, el día de la eutanasia realizada 48 h después de la última sesión de estrés. De acuerdo a lo reportado en la literatura, los niveles basales de corticosterona en rata; es decir, aquella que existe sin inducción de algún factor

externo, indican que ésta no supera los 4 $\mu\text{g/dL}$ de suero durante la mañana en animales que se manipulan experimentalmente (Schaaf y cols. 2000), valor cercano a lo encontrado en este trabajo de tesis (2 $\mu\text{g/dL}$). A diferencia de lo observado en la mañana, durante la noche ocurre el máximo de secreción de corticosterona en ratas alcanzando valores cercanos a los 10 $\mu\text{g/dL}$ de suero (Schaaf y cols. 2000). De acuerdo a esto, se esperaba encontrar valores similares o superiores a 10 $\mu\text{g/dL}$ en los animales estresados; sin embargo nuestros resultados muestran que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los animales controles y los estresados, a pesar que en éstos últimos se observa una hipertrofia de la adrenal en respuesta al estrés. Esto podría sugerir que en los primeros días de estrés, los animales secretaron mayores niveles de corticosterona; la cual fue disminuyendo probablemente por la exposición repetida al estresor. Esta suposición se avala además, por la reducción en la ganancia de peso corporal promovida por el estrés y que se ha relacionado al alza en los glucocorticoides (McEwen 2000; Chrousos y cols. 2007). Al respecto, se ha reportado que animales sometidos a restricción de movimiento por un lapso de 7-14 días, presentan una disminución de los niveles de ACTH y de corticosterona, sugiriendo con ello, una atenuación de la actividad del eje HHA cuando el estímulo es crónico lo que genera una conducta de habituación en respuesta al estrés (Gadek-Michalska y cols. 2003).

Por otra parte, los resultados de esta tesis, también muestran que la sertralina no altera los niveles de glucocorticoides, a pesar que se ha descrito que el sistema serotoninérgico está involucrado en la regulación del eje HHA (Andrews y cols. 2004) (Chaouloff y cols. 1999; Porter y cols. 2004), participando tanto en la activación como en la retroalimentación negativa de éste (Lowry 2002). Sin embargo, no existe aún claridad respecto al efecto de los ISRS sobre el mecanismo de actividad del eje HHA. Por ejemplo, se ha descrito que la administración de citalopram provoca un aumento significativo de cortisol salival en pacientes con depresión (Bhagwagar y cols. 2002); en cambio la administración por 6 semanas de fluoxetina a pacientes con depresión, provoca una disminución de ACTH aunque sin variación en los niveles de cortisol (Inder y cols. 2001). Variados protocolos de estrés aplicados a la rata, promueven un remodelamiento dendrítico de las neuronas del hipocampo y de la amígdala, observándose un acortamiento del largo de las dendritas (Vyas

y cols. 2002), y un aumento en la expresión de los transcritos de CRH (Stout y cols. 2002; Zambello y cols. 2008) cuya expresión es atenuada por la administración de venlafaxina, un antidepresivo inhibidor de la recaptura de serotonina y noradrenalina (Stout y cols. 2002).

El estrés, también puede afectar circuitos relacionados con la mayor o menor ingesta de **alimentos**, o con una mayor velocidad en su metabolización, por lo cual el peso corporal ha sido otro indicador asociado al estrés (Gregus y cols. 2005; Johnson y cols. 2006; Marin y cols. 2007). Se ha mencionado que el aumento de los glucocorticoides moviliza aminoácidos desde el músculo y ácidos grasos y glicerol desde las grasas, reduciendo la masa corporal. Al respecto, en nuestro modelo se ha encontrado que el estrés por restricción gatilla una disminución significativa del peso corporal en comparación con los animales controles. Esta disminución en la ganancia de peso, podría tener distintas explicaciones: la velocidad de metabolización del alimento, el incremento en la actividad locomotora, la modulación de los centros del apetito o de la saciedad (Sapolsky 1986; Marin y cols. 2007).

La sertralina provocó una reducción en la ganancia de peso corporal, y al ser administrada a los animales estresados, éstos no logran recuperar la ganancia en peso observada en los animales controles. Está descrito que la administración i.p. de sertralina al igual que la de fluoxetina, incrementa la secreción gástrica en ratas Sprague-Dawley (Abdel Salam 2004). Los receptores de serotonina están ampliamente distribuidos en la mucosa gastrointestinal y alrededor de los vasos sanguíneos de la submucosa gástrica (Fujimiya y cols. 1997), en donde actúa regulando la motilidad gástrica (Yu y cols. 2001); lo que podría estar asociado a la menor ganancia en peso de los animales administrados con sertralina. La presencia de sertralina podría además, desencadenar un aumento en la frecuencia o cantidad de desechos fecales eliminados, lo cual podría dar cuenta de la diferencia en peso corporal.

La disminución en la ganancia de peso también podría estar relacionada con el circuito dopaminérgico. Entre las estructuras que participan en este circuito, se encuentra el hipotálamo, un importante mediador de las conductas alimenticias y lugar de síntesis de péptidos que regulan esta conducta (Shalev y cols. 2001). Entre estos péptidos se encuentra

la colecistoquinina (CCK), que cumple funciones gastrointestinales, como la estimulación de enzimas pancreáticas y la producción de bilis. Sin embargo, la CCK también actúa como neurotransmisor y es abundante en el hipocampo (Holmes y cols. 2009). Interesantemente, la sertralina modula la expresión de CCK; experimentos realizados en ratas sometidas a estrés por inmovilización y a la administración crónica de 10 mg/Kg/peso de sertralina durante 28 días, muestran que la expresión de mRNA de CCK, disminuyen en el área CA1 del hipocampo, mientras que ningún cambio fue observado en el área CA3 (Giardino y cols. 1999). Estas evidencias permiten sustentar la idea que en nuestro modelo de estudio los animales se ven afectados por el estrés, a pesar de la variabilidad en su respuesta, sin poder descartar a lo largo del tiempo una habituación a éste.

6.3. Efecto del estrés y de sertralina en conductas asociadas a la depresión.

Entre las conductas que permiten evidenciar la eficacia clínica del fármaco antidepresivo está la conducta **anhedónica**; es decir la disminución o ausencia de conductas que produzcan placer (Gambarana y cols. 2001). Numerosos estudios en animales estresados han mostrado una disminución en la preferencia por beber soluciones azucaradas como agua de bebida, lo que se ha relacionado con la conducta anhedónica (Zurita y cols. 2000; Konkle y cols. 2003; Strekalova y cols. 2004).

Estudios que comenzaron en la década de 1970 relacionados con la adicción a drogas, condujeron a la hipótesis que el circuito dopaminérgico mesolímbico, era el sustrato anatómico más importante del procesamiento y reforzamiento de estímulos placenteros, adicción a drogas y está involucrado en el y en conductas motivacionales (Slattery y cols. 2004). Se ha reportado que esta vía recibe una fuerte inervación glutamatérgica desde regiones corticales, del hipocampo y la amígdala (Hyman y cols. 2001). El núcleo accumbens inerva y es inervado por áreas cerebrales que se han involucrado en depresión, como hipocampo, corteza frontal, y amígdala (Nestler y cols. 2002). Adicionalmente, las aferencias noradrenérgicas y serotoninérgicas modulan la actividad del núcleo accumbens (Pasquier y cols. 1977) y se ha propuesto que la anhedonia estaría relacionada con una disfunción en esta vía, en donde se ha observado que la actividad dopaminérgica se

incrementa en condiciones de estrés agudo y decrece en estrés crónico (Torres y cols. 2002).

En nuestro modelo de estudio, el estrés por restricción provocó anhedonia en comparación con los animales controles, la cual fue prevenida por la administración de sertralina. Este resultado muestra que al utilizar un fármaco ISRS se revierte el efecto del estrés sobre el consumo de sacarosa; sin embargo aquellos animales controles que sólo reciben sertralina, no muestran una mayor preferencia por sacarosa. Este resultado es concordante con lo que se ha reportado en ratones *knock-out* para el transportador de serotonina, en donde el consumo de sacarosa no se afectó en comparación con los ratones silvestres (Perona y cols. 2008). Aunque el protocolo de medición de anhedonia utilizado por los autores difiere del nuestro, éstos resultados muestran que la ausencia de estrés y la ausencia de un transportador funcional de serotonina – ya sea por bloqueo o por *knock-out* – no altera la conducta hedónica de los animales, lo cual sugiere que el fármaco AD ejerce su efecto sobre un sustrato neuronal previamente alterado producto del estrés crónico. Es decir es factible que el estrés cambie la actividad dopaminérgica a nivel del núcleo accumbens y que el aumento de la disponibilidad de serotonina por la administración de sertralina prevenga este efecto.

Otra posible interpretación de la respuesta anhedónica observada en nuestros animales estresados, podría relacionarse con los niveles de mRNA para el receptor 5HT1B. Si bien, en este trabajo de tesis no se evaluó dicho parámetro, se ha descrito que el estrés crónico aumenta los niveles de mRNA del receptor 5HT1B (Neumaier y cols., 2002) y provoca la desensibilización del autorreceptor 5HT1A a nivel del raphe (Lanfume y cols. 1999; Firk y cols. 2007; Bambico y cols. 2009), lo cual supone una desinhibición de las neuronas serotoninérgicas con el consecuente aumento en la liberación de la serotonina.

Recientemente se ha mostrado que ratones *knock-out* para estos receptores, consumen más sacarosa y más agua que los ratones silvestres (Bechtholt y cols. 2008); lo que permite sugerir una asociación entre la respuesta hedónica y la presencia de receptores 5HT1A/1B. Si bien, los resultados de esta tesis al igual que lo reportado en la literatura, sugieren una relación entre serotonina y anhedonia, aún se desconoce el mecanismo a través del cual

podrían estar relacionados. Al respecto, estudios de microdiálisis realizados en cerebros de rata han reportado que la administración aguda de sertralina inhibe la descarga de las neuronas del raphe dorsal, sugiriendo la activación del auto-receptor 5HT1A (Sprouse y cols. 1996). Sin embargo, no se ha descrito el efecto de la administración crónica de este fármaco. También se ha señalado que la sertralina aumenta la síntesis de serotonina a través de la *síntesis de novo* de la TPH, la enzima limitante en la vía de síntesis de la serotonina (Kim y cols. 2002) e induce una desensibilización del receptor postsináptico 5HT2, después de un tratamiento crónico de 28 días en ratas (Sanders-Bush y cols. 1989). Estos resultados muestran la heterogeneidad de respuestas frente a la administración crónica de la sertralina y hacen suponer que en nuestro caso la conducta anhedónica observada en los animales estresados pudiese estar relacionada en parte con el sistema serotoninérgico.

Otra manera de evaluar la eficacia antidepresiva de un fármaco es a través de la prevención de la conducta de **desesperanza aprendida** en modelos animales. Se entiende por desesperanza, la conducta en la cual el individuo no puede hacer nada para revertir los acontecimientos aversivos e incontrolables a los cuales está expuesto (Vollmayr y cols. 2001). Experimentalmente, esta conducta de desesperanza se logra sometiendo a los animales a la prueba de natación forzada donde las únicas conductas de escape observadas son las de natación o escalamiento, en cambio la conducta de inmovilidad se ha interpretado como desesperanza aprendida (Cryan y cols. 2002).

En nuestro modelo de estudio, el estrés por restricción generó un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad de los animales y disminuyó el tiempo en que los animales manifiestan conductas activas, como natación y escalamiento; siendo el período de inmovilidad prevenido por la administración de sertralina. Este resultado se relaciona estrechamente a lo observado en ratas con administración crónica de corticosterona, en las cuales aumentó significativamente el tiempo de inmovilidad en esta misma prueba conductual (Johnson y cols. 2006; Berríos 2008). La relación entre estrés, glucocorticoides y desesperanza aprendida, hacen posible inferir que podría estar afectada la capacidad motora de los animales estresados, o bien su motivación, como para realizar movimientos que les permitan alejarse o escapar de estímulos aversivos.

En la acción de los antidepresivos en la prueba de natación forzada, se ha propuesto la participación de los receptores 5HT1A, 5HT1B (Redrobe y cols. 1996)) y 5HT2C (Clenet y cols. 2001) cuya activación previene la conducta asociada a la desesperanza aprendida. También se ha reportado un aumento de dopamina en la prueba de natación forzada (Renard y cols. 2004) y al respecto se ha descrito que antidepresivos rápidos como nefazodona permiten un aumento en la liberación de DA mediada por serotonina, en ratas, lo que se ha relacionado con una reducción en el tiempo de inmovilidad en el test de nado forzado (Dremencov y cols. 2004). En este mismo sentido, también se ha reportado que la co-administración de burpropión – agonista dopaminérgico- con sertralina y desipramina en la prueba de natación forzada, podría aumentar la eficacia de los antidepresivos (Prica y cols. 2008). En nuestro grupo se ha encontrado que la administración de sertralina provoca el aumento de dopamina en corteza prefrontal (Ulloa, 2008).

Otra conducta que se ve afectada en la depresión, es la **cognición**. Los pacientes depresivos muestran dificultad para planificar tareas, concentrarse, memorizar, mantener la atención y establecer relaciones conceptuales que faciliten el aprendizaje (Cryan y cols. 2005). En modelos animales, el estrés y la administración de glucocorticoides se ha asociado con atrofia dendrítica, reducción de somas neuronales y picnosis en el hipocampo (Sapolsky y cols. 1990; Watanabe y cols. 1992). Estos resultados muestran que existen cambios morfológicos que podrían asociarse a las alteraciones cognitivas que se observan en los animales de nuestro modelo de estudio. Nuestros resultados muestran una disminución en la densidad de espinas en las dendríticas basales tanto en respuesta al estrés por restricción como a la administración de sertralina, cuestión que es concordante con lo previamente descrito.

El fenómeno cognitivo, involucra entre otras estructuras, al hipocampo. Aquí se establecen redes neuronales que permiten la formación de lo que se ha denominado la “memoria implícita o de procedimiento”(Thompson y cols. 1996). Este tipo de memoria se asocia al aprendizaje de ciertas destrezas motoras; las cuales se construyen lentamente. Uno de los ensayos que normalmente se utiliza para evaluar este tipo de conducta es el **aprendizaje condicionado**. En nuestro modelo de estudio, el estrés provocó una fuerte alteración en la capacidad cognitiva de los animales, dado que éstos fueron incapaces de escapar al

momento de emitir el tono audible. Este tipo de conducta fue claramente prevenida por la administración de sertralina en los animales que fueron estresados.

Los resultados de esta tesis señalan una clara disminución en la densidad de espinas frente al estrés, lo cual no es prevenido por la administración de sertralina. Sin embargo, en la prueba de ARC, los animales tratados con sertralina mejoran la adquisición de respuesta condicionada y fallan significativamente menos que los estresados. Estos resultados señalan por tanto, que frente a los cambios morfológicos gatillados por el estrés, la sertralina si bien no previene la disminución de espinas, al menos contrarresta el deterioro cognitivo promovido por el estrés. Se ha descrito que la reducción de espinas en las dendritas apicales por el estrés se recupera significativamente por el tratamiento con antidepresivos (Hajszan y cols. 2009). Sin embargo en esta tesis solo se pudieron cuantificar las dendritas basales y no las apicales; pudiendo estas últimas responder diferencialmente es respuesta al fármaco. Por otro lado, en esta Tesis no se determinó si la sertralina y el estrés promueven cambios en la morfología de las espinas que se pudiesen traducirse en diferencias funcionales en éstas. Más aún, no podemos precisar si existe una variación en la densidad de las espinas en otras áreas límbicas y no límbicas relacionadas a las conductas ensayadas.

6.4. El efecto del estrés y de sertralina sobre los niveles de proteínas asociadas a conectividad sináptica y citoesqueleto.

Una de las últimas hipótesis sobre la etiología de la depresión, propone una alteración en redes neuronales que procesan información, como un blanco importante que subyace a la enfermedad (Castren 2005). Las evidencias que sustentan esta hipótesis se basan en las observaciones post-mortem realizadas en cerebros de pacientes depresivos y en modelos animales de depresión, en donde se observa reducción de volumen del hipocampo y atrofia dendrítica (Drevets 2000; Vyas y cols. 2002). En este sentido, el estado de ánimo podría dar cuenta del estado funcional de las redes neuronales. De acuerdo a esto, se esperaría que frente al estrés ocurriesen cambios en los niveles de proteínas asociadas a la sinápsis que modificaran algunas respuestas plásticas en los árboles dendríticos, frente a lo cual los fármacos antidepresivos favorecieran un contacto sináptico eficiente y eficaz.

En este escenario, el efecto positivo del fármaco antidepresivo, presupone un mecanismo bioquímico sobre un sustrato común al efecto del estrés. Es decir, si el estrés actúa sobre algunas proteínas, se espera que el fármaco actúe sobre las mismas previniendo alteraciones en éstas, cuando el individuo se encuentra sometido al estímulo estresante. Sin embargo, de acuerdo a la hipótesis de redes, el cerebro elabora y procesa información con múltiples conexiones neuronales que operan a través de cascadas transduccionales, y producto de la depresión algunas de estas conexiones se pierden, fenómeno que sería prevenido por la administración de fármacos antidepresivos (Castren 2005). Frente a esto se podría esperar que el mecanismo de acción del fármaco cursara a través de las mismas proteínas que se ven alteradas en la depresión bien que la acción del fármaco pudiese impactar en varias proteínas a la vez, que no necesariamente formen parte de una sola vía transduccional. Al respecto, la presencia de un fármaco ISRS, como la sertralina, no sólo actúa bloqueando al transportador de serotonina; sino que también bloquea débilmente al transportador de dopamina y noradrenalina (Preskorn 2006). De acuerdo a esto, y a la suma de efectos secundarios que los antidepresivos ejercen (Khawam y cols. 2006), resulta difícil pensar que su efecto terapéutico curse por una sola vía transduccional y, probablemente el efecto farmacológico se logre al reactivar diferentes redes neuronales modificadas producto del estrés. La reversión de estos procesos en sujetos depresivos y en nuestro modelo de estudio, podría involucrar proteínas asociadas a la conectividad sináptica y a cascadas transduccionales que modifiquen la dinámica del citoesqueleto de actina, dando cuenta de las alteraciones morfológicas asociadas al estrés y en la conectividad sináptica entre las neuronas.

6.4.1. N-cadherina y β -catenina: proteínas de conectividad sináptica y comunicación intracelular.

Se ha descrito que la estimulación sináptica provoca un cambio en la forma de las espinas y en la longitud de los árboles dendríticos (Maletic-Savatic y cols. 1999; Kasai y cols. 2003). En estas condiciones, la N-cadherina se redistribuye rápidamente y cambia su conformación evaluada por una mayor resistencia a la tripsina, característica de las cadherinas que están participando en las uniones adherentes (Tanaka y cols. 2000). El aumento de adhesividad de la N-cadherina ocurre con el reclutamiento de la β -catenina en

las sinápsis activas en ausencia de síntesis de novo de proteínas (Murase y cols. 2002). Además de la función de la N-cadherina en adhesión neuronal entre el elemento pre y postsináptico, estudios de coinmunolocalización en neuronas hipocámpales (Benson y cols. 1998) muestran que esta proteína se asocia a las subunidades GluR1 y GluR2 que forma parte de los receptores de glutamato tipo AMPA y a su vez interactúa con PSD-95, una proteína andamio localizada en las densidades postsinápticas. Por otra parte, la actividad eléctrica en una neurona promueve una expansión lateral en la cabeza de la espina dendrítica, facilitando la eficiencia sináptica (Togashi y cols. 2002). En cultivos neuronales, la sobreexpresión de una cadherina mutada en el dominio NH₂-terminal, que carece de actividad adherente, no promueve cambios morfológicos en la cabeza de las espinas (Okamura y cols. 2004). Más aún, la inhibición de la polimerización de la actina con citocalacina D, bloquea la expansión lateral de la espina inducida por actividad eléctrica; sugiriendo que la interacción cadherina-actina se requiere para la remodelación de la espina.

Nuestros resultados muestran que la inmunoreactividad para N-cadherina en el área CA1 del hipocampo no cambia bajo ninguna condición experimental. Por el contrario, en el área CA3 se observa una disminución de la inmunoreactividad frente al **estrés**; zona en la cual se ha descrito que el estrés promueve, atrofia dendrítica y reducción en el número de espinas. Se ha señalado que la N-cadherina es una proteína abundante en la región CA3 del hipocampo, específicamente en el *stratum lucidum*, región que recibe casi exclusivamente aferencias desde el Giro Dentado a través de las fibras musgosas glutamatérgicas (Benson y cols. 1998). Estos resultados son muy coincidentes con la distribución de la proteína encontrada en nuestros ensayos, en donde se observa que N-cadherina se distribuye en el estrato oriens, radiatum y lacunoso, como también en el estrato molecular y lacunoso-molecular del Giro Dentado, en todas las condiciones experimentales ensayadas.

La presencia de N-cadherina como molécula de adhesión celular y como un actor importante en la creación de microdominios de anclaje de receptores, resulta ser relevante en el contexto de nuestros resultados. Los animales sometidos a **estrés** por restricción de movimiento muestran una disminución en los niveles de N-cadherina en el área CA3, lo

cual podría estar asociado probablemente al deterioro cognitivo encontrado en estos animales estresados en nuestro modelo de estudio, lo que podría asociarse al menor número de espinas encontradas en estos mismos animales, lo que permite inferir que probablemente existan un menor número de contactos sinápticos.

La administración crónica de sertralina por sí sola, no cambia la inmunoreactividad de N-cadherina en comparación con los animales controles; sin embargo si ésta se administra a los animales estresados, se observa un aumento en la marca inmunoreactiva en el área CA3 del hipocampo. Esto podría sugerir que la sertralina actúa sobre un sustrato celular modificado por el estrés promoviendo la conectividad sináptica. Por otra parte, imágenes de resonancia magnética funcional en cerebros de pacientes con depresión señalan que el tratamiento crónico con sertralina aumenta la conectividad neuronal (Anand y cols. 2005). Estos resultados permiten hipotetizar que el aumento en la marca inmunoreactiva de N-cadherina frente a la administración con sertralina en ratas estresadas crónicamente, podría asociarse al aumento en la conectividad, como una manera de compensar la disminución en el número de espinas dendríticas.

Se ha señalado ampliamente en la literatura que la estructura de las espinas dendríticas es dinámica y requiere de moléculas que transmitan al interior del soma neuronal la información que reciben (Dailey y cols. 1996; Nakayama y cols. 2000; Kasai y cols. 2003). En cultivos de neuronas de hipocampo, se ha descrito que la β -catenina regula la localización de vesículas sinápticas presinápticas y por ende las zonas activas, (Bamji y cols. 2003). En ausencia de β -catenina se reduce el número de vesículas sinápticas y la distribución del marcador vesicular sinaptofisina muestra un patrón difuso, lo que se ha interpretado como que una pérdida de β -catenina afecta la localización de las vesículas sinápticas (Bamji y cols. 2003). Postsinápticamente, la β -catenina aumenta la complejidad dendrítica (Yu y cols. 2004).

Los resultados de esta tesis, muestran que aunque el estrés no modifica los niveles de β -catenina evaluados por western, éste incrementa cuando a los animales estresados se les administra conjuntamente sertralina. Además esta inmunoreactividad se distribuye tanto en los somas como en las fibras de las neuronas piramidales de manera más o menos

homogénea y el estrés no la modifica. Interesantemente, la administración del fármaco provoca en animales estresados un aumento en la marca inmunoreactiva en el estrato oriens en el área CA1. En el área CA3 en cambio la sola presencia de sertralina provocó un aumento en la marca inmunoreactiva de β -catenina a nivel de las fibras de las neuronas piramidales (estrato oriens) coincide con la fuerte disminución de la marca inmunoreactiva a nivel de los somas de dichas neuronas. Este resultado, permite inferir que la presencia de **sertralina** podría provocar una redistribución de β -catenina, desde los somas hacia las fibras y ésta a su vez favorecer la estabilidad de las conexiones sinápticas.

Existe escasa información en la literatura que relacione a β -catenina con la acción de fármacos antidepresivos o trastornos del ánimo. Al respecto, se ha observado que fármacos antipsicóticos como clozapina, haloperidol y risperidona incrementan significativamente los niveles de β -catenina y GSK3 β total en corteza prefrontal y estriado de ratas (Alimohamad y cols. 2005). Un estudio realizado en fracciones subcelulares de hipocampo provenientes de animales tratados por 14 días con venlafaxina (10 mg/Kg/día y 40mg/Kg/día) señala que la β -catenina se distribuye tanto en la membrana plasmática como en núcleo, observándose en este último compartimento un mayor incremento de la proteína (Mostany y cols. 2008). Por ser éste un fraccionamiento subcelular de todo el hipocampo, resulta difícil cuantificar cual es el real aporte de las neuronas piramidales, en donde nosotros hemos encontrado una redistribución de la marca inmunoreactiva. Por otra parte, se ha descrito que animales que sobreexpresan β -catenina en cerebro, presentan una reducción en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado; similares a aquellas producidas por la administración de Litio, un potente inhibidor de GSK3 β (Gould y cols. 2007) enzima que fosforila a β -catenina promoviendo su degradación. Al estar GSK3 β inhibida por Litio, β -catenina puede asociarse a N-cadherina ó por el contrario migrar al núcleo y actuar como factor transcripcional (Wada 2009).

La redistribución de la marca inmunoreactiva de β -catenina en respuesta a la administración de sertralina y el aumento en los niveles totales observados en animales estresados y administrados de sertralina, muestran que el fármaco antidepresivos tiene un notorio efecto sobre la β -catenina. Al respecto, experimentos realizados en animales

tratados crónicamente con dosis altas de venlafaxina (40 mg/Kg) presentan una alta expresión de β -catenina en la zona subgranular del hipocampo (Mostany y cols. 2008), justamente zona donde hay activa proliferación neuronal. El incremento de β -catenina, en la zona subgranular del giro dentado coincidente con la marca positiva para BrdU, utilizado como marcador de replicación del DNA, ha hecho hipotetizar que la β -catenina pudiese participar en la regulación de la proliferación celular a través de uno de los genes blancos del complejo transcripcional LEF-1/TCF-4/ β -catenina; como el gen de ciclina D, cuyo producto participa en el control y en la progresión del ciclo celular (Coyle-Rink y cols. 2002). La localización de β -catenina en la célula está regulada por fosforilaciones; por ejemplo es fosforilada por CKII en Ser-29, Thr-102 y Thr 112 estabilizando a la proteína en el citoplasma o en el núcleo (Bek y cols. 2002). En cambio, la fosforilación provocada por GSK3 β en un “cluster” de Ser y Thr en la porción NH₂-terminal, sirve de señal de ubiquitinación (Frame y cols. 2001). De tal manera que uno de los caminos para estudiar el grado de movilidad de β -catenina, es determinar en nuestro modelo de estudio los niveles de actividad de GSK3 β .

6.4.2. GSK3 β : modulador de conectividad y remodelamiento de citoesqueleto

Cambios en el número y en las arborizaciones dendríticas, como así mismo la forma y densidad de las espinas y cambios en el número y tipo de receptores en la sinápsis, y en el anclaje y desensamblaje de complejos proteicos que forman parte de la sinápsis tienen como actor común el citoesqueleto de actina y de microtúbulos.

La proteína GSK3 β ha sido relacionada con plasticidad neuronal a través de la regulación por fosforilación de diferentes proteínas asociadas tanto a citoesqueleto de microtúbulos como la MAP-1b como a proteínas de conectividad sináptica como la β -catenina (Nishimura y cols. 2002; Goold y cols. 2004). La fosforilación de β -catenina por GSK3 β ha sido descrita como una respuesta a la señal de Wnt, en donde GSK3 β forma parte de un complejo multiproteico - que incluye a la axina, β -catenina, y la APC (*poliposis adenomatosa* de colon) - en donde dependiendo de su estado de fosforilación, regula la movilidad de β -catenina o su degradación (Willert y cols. 1999; Frame y cols. 2001).

A partir del análisis de la estructura cristalina de GSK3 β , se ha descrito que la mayoría de sus sustratos requieren de una fosforilación previa por proteínas quinasas ya sea en residuos de Ser o Thre localizados en el carboxilo terminal del sitio de fosforilación de GSK3- β ; es decir, GSK3 actúa sobre un sustrato pre-fosforilado (Bax y cols. 2001), revisado (Doble y cols. 2003). Esta característica, hace que su mecanismo de acción sea más complejo y a la vez más regulado, por tanto el estudio de cualquier alteración que involucre la participación de GSK3 β , aumenta el nivel de complejidad de éste. Experimentos realizados en cultivos celulares de neuroblastoma, células embrionicas de riñón humano y líneas celulares PC12 o Neuronas 2A, señalan que las quinasas Fyn, Csk y Pyk2, fosforilan a GSK3 β en tyr-216 activando su actividad quinasa (Lesort y cols. 1999; Fan y cols. 2003; Sayas y cols. 2006). Interesantemente Pyk2 fosforila a GSK3 β en respuesta a la señal del ácido lisofosfatídico (LPA) (Sayas y cols. 2006) y en respuesta la GSK3 β fosforila a proteínas asociadas al citoesqueleto neuronal (Sayas y cols. 2002) de manera dependiente e independiente de RhoA (Sayas y cols. 2002).

Los resultados de esta tesis muestran que el **estrés** provoca un aumento de GSK3 β total pero no modifica los niveles de la isoforma inactiva (pGSK3 β -ser9), en comparación con los animales controles. Esto estaría indicando que el aumento observado en los niveles de GSK3 β total observado en los animales **estresados** correspondería probablemente a la isoforma activa de la quinasa, ya que se ha descrito que ésta se encuentra constitutivamente fosforilada en un residuo de tirosina 216, lo cual facilita o aumenta su actividad quinásica (Dajani y cols. 2001). Dado que reducción en su actividad se logra mediante la fosforilación en ser-9, y los niveles de esta isoforma no cambian frente al estrés, pero sí los niveles totales de GSK3 β , esto estaría indicando probablemente que el estrés gatilla un aumento de la isoforma activa de GSK3 β .

Existe escasa información que relacione el estrés y la función de GSK3 β ; se han realizado experimentos en ratas sometidas a estrés por frío agudo, subcrónico o crónico, encontrándose que no existen cambios en los niveles de GSK3 β en la corteza frontal (Kozlovsky y cols. 2002). Sin embargo, estudios realizados en cultivos neuronales estimulados con el ácido lisofosfatídico (LPA), muestran una retracción neurítica y colapso

de los conos de crecimiento (Sayas *y cols.* 1999), asociado a un aumento en la actividad de GSK3 β -tyr-216, la cual estaría mediada por la actividad de RhoA y la inhibición de PI3K (Sanchez *y cols.* 2001; Sayas *y cols.* 2002).

Experimentos de transfección con vectores de expresión para diferentes proteínas G α realizados en células COS y en cultivos de neuronas granulares del cerebelo expuestos al estímulo de LPA, han revelado que el aumento en la actividad GTPásica de RhoA estaría mediada por la participación de la proteína G α 12/G α 13 (Kranenburg *y cols.* 1999; Sayas *y cols.* 2002). El mecanismo por el cual RhoA activa a GSK3 β es aún desconocido; sin embargo, recientemente en cultivos neuronales, tales como, Neuro 2a, PC12, SH-SY5Y neuroblastoma, se ha demostrado que GSK3 β es fosforilada por Pyk2 (Sayas *y cols.* 2006).

Estos hallazgos permiten asociar la participación de GSK3 β y RhoA en modificaciones del citoesqueleto, como por ejemplo, la retracción neurítica observada por el estímulo de LPA. Sin embargo, no sabemos si la participación de estas dos proteínas cursan en una vía común o son parte de vías de señalización diferentes que se complementan en definir un determinado fenotipo neuronal. En nuestro modelo, hemos observado que el **estrés** no modifica los niveles totales de β catenina, suponemos por tanto que la actividad quinasa de GSK3 β sobre β catenina descrita para la señal de wnt, no se encuentra asociada a la señal de **estrés** por restricción de movimiento, al menos bajo las condiciones experimentales de nuestro modelo de estudio.

Respecto al efecto de **sertralina** sobre los niveles de GSK3 β obtenidos en esta tesis, se encontró que ésta gatilla una disminución significativa de la isoforma inactiva (pGSK3 β ser-9), lo cual estaría indicando que hay un aumento de la isoforma activa. La sertralina al ser un inhibidor específico del transportador de serotonina, permite un mayor tiempo de exposición del neurotransmisor a los receptores serotoninérgicos. De acuerdo a lo reportado en la literatura en relación al papel de GSK3 β en el remodelamiento del citoesqueleto, el resultado que se esperaba encontrar frente a la acción del fármaco, era que éste aumentase la isoforma inactiva, disminuyendo así la actividad de GSK3 β , sobre proteínas asociadas citoesqueleto o a conectividad sináptica como β catenina. Por ejemplo,

se ha señalado que inhibidores de GSK3 β inyectados unilateralmente ICV en el cerebro de ratones, provocan un acortamiento del tiempo de inmovilización en el test de nado forzado y un aumento en los niveles de β catenina detectados por IW (Kaidanovich-Beilin y cols. 2004). Aunque la función de β catenina en conductas depresivas aún se desconoce, este resultado permite proponer que inhibidores de GSK3 β “up-regulan” a β catenina (Kaidanovich-Beilin y cols. 2004).

Sin embargo, nuestros resultados muestran una disminución de la forma inactiva frente a la acción del fármaco. Al administrar sertralina a animales estresados, también se observa una disminución de la forma inactiva de GSK3 β , aunque levemente menor que la observada con setrralina por sí sola. Concordante con este resultado, experimentos realizados en ratones a los cuales se les administró agentes que aumentan la actividad serotoninérgica, mostraron un incremento en la forma inactiva de GSK3 β (pGSK3-Ser 9) mediada por la activación del receptor 5HT-1A (Li y col., 2004). Interesantemente, este trabajo reveló que la estimulación del receptor 5HT-1A causa fosforilación en Ser-9 mientras que la estimulación del receptor 5-HT2 media la desfosforilación en este mismo sitio (Li y cols. 2004). Así el balance entre la actividad de estos dos receptores podría modular la actividad de GSK3 β *in vivo* (Borsini 1994; Li y cols. 2004). Tomografía de emisión de positrones realizada en pacientes con depresión muestran una reducción del receptor 5HT1A (Drevets 1999; Sargent y cols. 2000); mientras que en otros pacientes con Depresión se ha observado un aumento de éste (Stockmeier 2003). Es interesante señalar, que de los tres receptores 5HT2 (A,B,C), el 5HT2C parece estar estrechamente relacionado con la Depresión y con la organización del citoesqueleto de actina mediado por RhoA (McGrew y cols. 2004; Tohda y cols. 2006).

6.4.3. RhoA y cofilina y su participación en el citoesqueleto de actina

Estudios realizados en cultivos primarios de hipocampo en proceso de diferenciación, han permitido observar que la proteína RhoA es segregada mas abundantemente en dendritas que en axones (Santos Da Silva y cols. 2004). En tejido, es particularmente abundante en áreas como CA1, CA3 y GD del hipocampo (Nakayama y cols. 2000). La activación de RhoA por medio de trombina o LPA provoca retracción de neuritas en células como PC12

o neuroblastoma, y por el contrario, su inhibición mediante la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, la cual ADP ribosila a la RhoA suprimiendo su actividad GTPásica, provoca la inhibición de la retracción neurítica (Jalink y cols. 1994; Katoh y cols. 1998). Entre los factores extracelulares que modulan la actividad de RhoA, han sido mencionados factores de crecimiento como p75 o NGF (Yamaguchi y cols. 2001; Nusser y cols. 2002; Gehler y cols. 2004). Se ha descrito que la inducción de crecimiento gatillada por NGF a través de su receptor TrkA regula la actividad de PI3K, la que a través de Rac1 mediaría la inactivación de RhoA, traducándose esto en una señal permisiva para el inicio del crecimiento de neuritas (Nusser y cols. 2002).

Entre los efectores de RhoA, se encuentra la Rho quinasa la cual fosforila a LIMK durante la retracción de las neuritas (Kranenburg y cols. 1999; Dergham y cols. 2002). LIMK a su vez, regula la polimerización de actina a través de la fosforilación e inactivación de Cofilina (Kranenburg y cols. 1999; Maekawa y cols. 1999; Govek y cols. 2005). Por otra parte, estudios proteómicos en cerebros de ratas sometidas a estrés y en cerebros postmortem de pacientes con depresión bipolar, revelaron una disminución de transcritos de PAK1 y LIMK; proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina (Nakatani y cols. 2007). Sin embargo, también han sido propuestas otras vías en la regulación de la morfogénesis dendrítica, tales como Ras-PI3K-Akt- mTOR (Kumar y cols. 2005), o vías que involucran la participación de la proteínas asociadas a citoesqueleto de tubulina, como cypina, un efector de RhoA (Chen y cols. 2007).

En nuestro modelo de estudio observamos un aumento de RhoA en los animales **estresados** por restricción de movimiento; lo cual coincide con la disminución de espinas dendríticas que se observan en respuesta al **estrés**. Estudios realizados en ratas sometidas a estrés crónico por inmovilización o estrés no predecible, muestran que la atrofia dendrítica en las neuronas piramidales de CA3 afectando tanto la longitud de las ramificaciones dendríticas, como también la densidad de espinas (Magarinos y cols. 1995; Vyas y cols. 2002). Este patrón de atrofia dendrítica en CA3 también es observado en monos después de someterlos crónicamente a estrés sicosocial (Magarinos y cols. 1996). Además, el análisis proteómico realizado en ratas sometidas a estrés psicosocial, muestran entre otras,

niveles disminuidos de proteínas asociadas al citoesqueleto de actina, como α -internexina, Ran GTPasa y proteínas que se unen al extremo de F-actina, (Carboni y cols. 2006). Adicionalmente, se ha reportado además, que RhoA se encuentra asociada a las subunidades GluR1 en neuronas embrionarias de hipocampo; y que la estimulación de sinaptosomas con KCl reduce significativamente los niveles de RhoA activa conjuntamente con la pérdida de espinas ricas en actina (Schubert y cols. 2006). A pesar de estar descritos los cambios morfológicos que sufren las dendritas y la densidad de espinas en respuesta al estrés, existe poca literatura que asocie estos cambios directamente con la participación de RhoA, en **modelos animales sometidos a estrés**. Al respecto, se ha descrito, que ratas sometidas a injuria traumática presentan activación de RhoA tanto en la corteza como en el hipocampo; siendo la corteza más sensible que el hipocampo. En este modelo la activación de RhoA ha sido asociada al aumento en la expresión del receptor p75 (Dubreuil y cols. 2006).

En nuestro modelo se observa un aumento en la masa de RhoA en los animales sometidos a **estrés por restricción** de movimiento. Respecto del efecto del fármaco **Sertralina** sobre los niveles de RhoA, los resultados muestran que no existe diferencia en los niveles de la proteína, entre los animales sometidos a la administración de Sertralina en comparación con los controles. Sin embargo, el aumento de RhoA observado en los animales sometidos a restricción de movimiento no es prevenido por sertralina. Aunque se ha descrito que los fármacos SSRI, aumentan la expresión de CREB, BDNF y aumentan la neurogénesis a nivel del hipocampo (Nibuya y cols. 1996; Malberg y cols. 2000; Thome y cols. 2001), no existe información sobre proteínas que participan en el remodelamiento sináptico. Estudios proteómicos realizados en hipocampos de ratas y monos sometidos a tratamiento con venlafaxina, fluoxetina y clomipramina, muestran una regulación positiva (*up regulation*) de GTPasas pequeñas que participan en el tráfico de vesículas, como también una disminuida expresión de la glicoproteína M6a la que participa en la extensión de neuritas y que normalmente se encuentra muy expresada en hipocampo (Khawaja y cols. 2004; Alfonso y cols. 2005). Así, en nuestro modelo la administración de Sertralina hace suponer que probablemente ésta module el citoesqueleto de actina.

Respecto a cual de los receptores serotoninérgicos pudiese estar asociado a la activación de RhoA, se ha sugerido que al receptor 5-HT_{2C}. Experimentos *in vitro*, muestran el efecto del fenómeno de edición en la funcionalidad de este receptor, quien a través de RhoA activa a PLD/PLC (McGrew y cols. 2004). Estudios electrofisiológicos muestran activación de RhoA y RhoB por transmisión sináptica en cortes de hipocampo (O'Kane y cols. 2003) y, en neuronas de *Aplysia* estimuladas con serotonina se observa una corriente de sodio que es facilitada por la presencia de RhoA (Kawasaki y cols. 2004). Otros receptores asociados a la activación de RhoA y de Cdc42 son el 5-HT₇, asociado a la proteína G α 12, y el 5-HT₄ asociado a la proteína G α 13; los cuales participan en el incremento en la longitud y retracción neurítica, respectivamente (Ponimaskin y cols. 2002; Kvachnina y cols. 2005).

Así, los resultados obtenidos en esta tesis muestran un aumento de RhoA frente al estrés efecto no prevenido por sertralina. Dado que no se determinó actividad de RhoA, se determinó un efector río debajo de la vía como cofilina. Esta proteína ha sido descrita como una proteína relacionada con la polimerización y despolimerización de los filamentos de actina y cuya acción estaría mediada – entre otras –por RhoA (Maekawa y cols. 1999). A nivel del hipocampo se descrito que está localizada tanto en el núcleo de las neuronas piramidales del hipocampo y del GD; como así mismo en la cabeza de las espinas dendríticas (Racz y cols. 2006). Además, la cofilina está asociada a las densidades postsinápticas (PSD) que anclan a su vez receptores glutamatérgicos, lo que ha hecho inferir que la presencia de cofilina en estos compartimentos sinápticos podría estar regulando la fuerza de la sinapsis (Racz y cols. 2006). Uno de los mecanismos propuestos respecto a la participación de cofilina en el remodelamiento del citoesqueleto de actina, es a través de la activación de RhoA lo que favorecería la fosforilación de ROCK/LIM-K produciéndose la inhibición de la polimerización de los filamentos de actina (Maciver y cols. 2002; Salvarezza y cols. 2009); aún más, experimentos en animales *knockout* para LIMK señalan que éstos no sólo tienen espinas dendríticas mas pequeñas sino además presentan PSD reducidas sugiriendo que cofilina podría ser responsable de esta desregulación (Meng y cols. 2002).

Los resultados de esta tesis muestran que el **estrés por restricción** provoca un aumento en los niveles de p-cofilina en comparación con los animales controles. Al respecto, la fosforilación de cofilina estaría dando cuenta de una inactivación de ésta y por tanto se podría inferir una estabilización del citoesqueleto de actina en respuesta a la inestabilidad que probablemente provoque el estrés sobre el citoesqueleto de actina (Carlier y cols. 1999; Van Troys y cols. 2008).

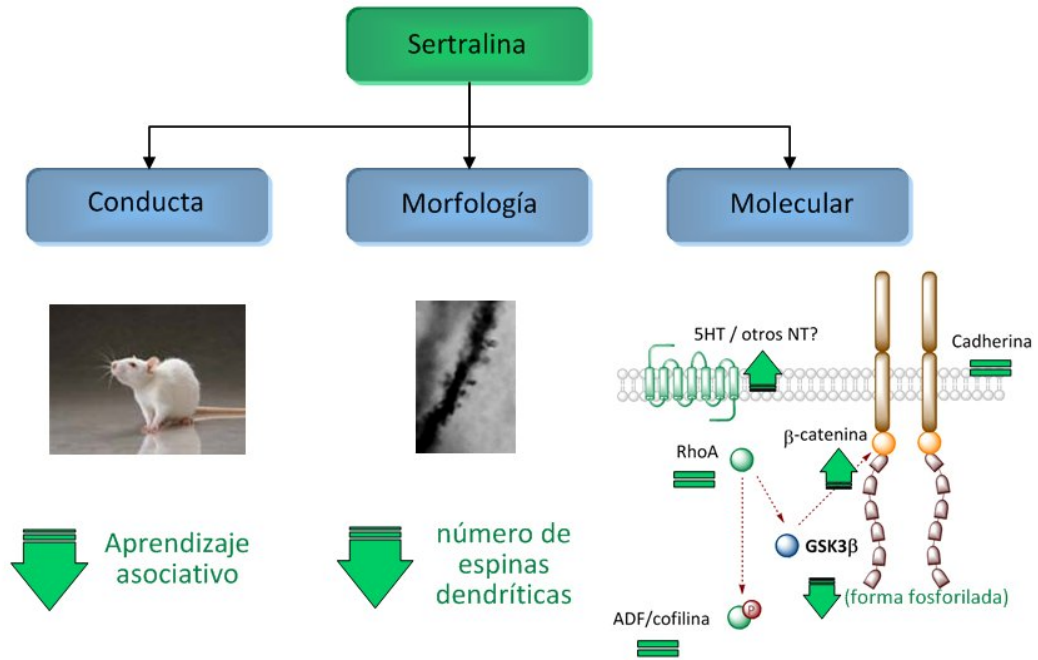
En resumen en esta Tesis se muestra que el estrés promueve cambios en proteínas asociadas a citoesqueleto de actina y en proteínas asociadas a conectividad sináptica. Sin embargo no podemos precisar si dichos cambios dan cuenta de las alteraciones conductuales observadas. Un campo interesante que abre esta Tesis, son los efectos de sertralina sobre la conducta cognitiva y en este sentido sería muy relevante determinar las alteraciones neuroquímicas y moleculares que pudiese provocar la administración crónica de sertralina.

7. CONCLUSIONES

En relación al estrés por restricción de movimiento aplicado por 2,5 horas diarias y a la administración de sertralina (10 mg/Kg/día) por 14 días a ratas macho, los resultados de este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

- La sertralina administrada a animales controles promueve una reducción en el número de espinas en el hipocampo, un aumento en la inmunorreactividad de β -catenina y un aumento en la forma activa de GSK3 β , lo cual se asocia a las alteraciones cognitivas observadas en estos animales, como el incremento en las fallas de escape frente a un estímulo aversivo y una disminución en la adquisición de respuesta condicionada. Estos resultados sugieren un efecto no deseado de los antidepresivos sobre las funciones cognitivas, cuestión que sería muy relevante de investigar (Fig. 26A).
- El estrés provoca una disminución en el número de espinas observadas en la región CA1, una disminución en la inmunorreactividad de N-cadherina y un aumento en los niveles de RhoA. De acuerdo a esto inferimos que la reducción en el número de espinas se asocia con el aumento de RhoA y probablemente es independiente de N-cadherina (Fig. 26B, flechas rojas)
- En animales estresados la administración de sertralina no previene la reducción en la densidad de espinas como tampoco el aumento en los niveles de RhoA; sin embargo sí previene la reducción en la inmunorreactividad de N-cadherina. La sertralina previene la manifestación de conductas asociadas a la depresión inducida por el estrés como la anhedonia, las fallas en el escape frente a un estímulo aversivo, la disminución en la adquisición de respuesta condicionada y la desesperanza aprendida. Estos resultados no se asocian con los cambios moleculares y morfológicos observados en estas condiciones experimentales (Fig. 26 B, flechas verdes).

A



B

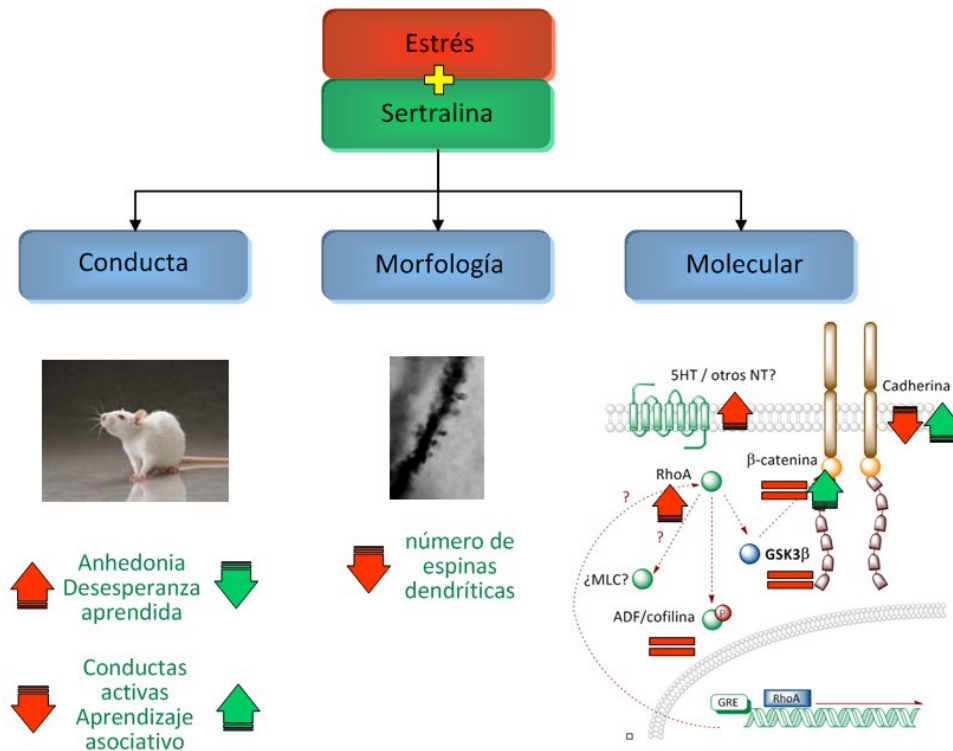


Figura 26. Integración de los resultados conductuales, morfológicos y moleculares.

8. LIMITACIONES Y PROYECCIONES DEL ESTUDIO

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, no podemos precisar si los cambios conductuales promovidos por el estrés y prevenidos por la sertralina, se deban a cambios en la neurotransmisión serotoninérgica, y/o glutamatérgica lo cual debería ser evaluado mediante estudios de microdiálisis. Más aún, las pruebas conductuales evaluadas en esta tesis involucran la participación de estructuras corticales y motoras; por ende será importante establecer en estas áreas el efecto del estrés y del antidepresivo sobre proteínas de adhesión tales como N-cadherina y β -catenina estudiadas en este trabajo.

Otra limitación de este estudio, es el desconocimiento de los cambios morfológicos en otras áreas hipocampales y corticales, que pudiesen ayudar a explicar los efectos antidepresivos de la sertralina.

Los resultados de este trabajo no permiten establecer si el aumento de la RhoA promovido por el estrés, se correlaciona con cambios en su actividad y en efectores río abajo que pudiesen dar cuenta de la reducción en la densidad de espinas, fenómeno asociado a la dinámica del citoesqueleto de actina. Particularmente relevante será el precisar si los cambios en los niveles de esta proteína se deben a cambios en la expresión génica o bien a degradación promovidas por el estrés.

Dado que la inmunorreactividad de β -catenina aumenta con el tratamiento de sertralina, tanto en animales controles como estresados, será relevante determinar la localización subcelular de esta proteína y además determinar en estas condiciones la activación de genes blancos para la β -catenina.

9. REFERENCIAS

- Abdel Salam, O. M. (2004). "Fluoxetine and sertraline stimulate gastric acid secretion via a vagal pathway in anaesthetised rats." Pharmacol Res 50(3): 309-16.
- Aguilera, G. (1994). "Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress." Front Neuroendocrinol 15(4): 321-50.
- Alfonso, J., M. E. Fernandez, y cols (2005). "The stress-regulated protein M6a is a key modulator for neurite outgrowth and filopodium/spine formation." Proc Natl Acad Sci U S A 102(47): 17196-201.
- Ali, A., K. P. Hoeflich, y cols (2001). "Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation." Chem Rev 101(8): 2527-40.
- Alimohamad, H., N. Rajakumar, y cols (2005). "Antipsychotics alter the protein expression levels of beta-catenin and GSK-3 in the rat medial prefrontal cortex and striatum." Biol Psychiatry 57(5): 533-42.
- Allison, D. W., V. I. Gelfand, y cols (1998). "Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors." J Neurosci 18(7): 2423-36.
- Anand, A., Y. Li, y cols (2005). "Antidepressant effect on connectivity of the mood-regulating circuit: an fMRI study." Neuropsychopharmacology 30(7): 1334-44.
- Andrews, M. H. y S. G. Matthews (2004). "Programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: serotonergic involvement." Stress 7(1): 15-27.
- APA (1999). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th Ed.). Washington, DC:.
- Bambico, F. R., N. T. Nguyen, y cols (2009). "Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors after chronic unpredictable stress." Eur Neuropsychopharmacol 19(3): 215-28.
- Bamji, S. X., K. Shimazu, y cols (2003). "Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly." Neuron 40(4): 719-31.
- Barden, N. (2004). "Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathophysiology of depression." J Psychiatry Neurosci 29(3): 185-93.
- Bax, B., P. S. Carter, y cols (2001). "The structure of phosphorylated GSK-3 β complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits beta-catenin phosphorylation." Structure 9(12): 1143-52.
- Becker, B., N. Morel, y cols (2004). "Blockade of calcium entry in smooth muscle cells by the antidepressant imipramine." Biochem Pharmacol 68(5): 833-42.
- Bechtholt, A. J., K. Smith, y cols (2008). "Sucrose intake and fasting glucose levels in 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor mutant mice." Physiol Behav 93(4-5): 659-65.
- Bek, S. y R. Kemler (2002). "Protein kinase CKII regulates the interaction of beta-catenin with alpha-catenin and its protein stability." J Cell Sci 115(Pt 24): 4743-53.
- Benson, D. L. y H. Tanaka (1998). "N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons." J Neurosci 18(17): 6892-904.
- Berrios, C. (2008). "Sertralina modifica los efectos conductuales en la rata inducidos por el tratamiento crónico con glucocorticoides." Tesis para optar al grado de Magister en Neurociencias.

- Bhagwagar, Z., S. Hafizi, y cols (2002). "Acute citalopram administration produces correlated increases in plasma and salivary cortisol." Psychopharmacology (Berl) 163(1): 118-20.
- Bhat, R. V., J. Shanley, y cols (2000). "Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A 97(20): 11074-9.
- Blier, P. y N. M. Ward (2003). "Is there a role for 5-HT1A agonists in the treatment of depression?" Biol Psychiatry 53(3): 193-203.
- Borsini, F. (1994). "Balance between cortical 5-HT1A and 5-HT2 receptor function: hypothesis for a faster antidepressant action." Pharmacol Res 30(1): 1-11.
- Botteron, K. N., M. E. Raichle, y cols (2002). "Volumetric reduction in left subgenual prefrontal cortex in early onset depression." Biol Psychiatry 51(4): 342-4.
- Bowley, M. P., W. C. Drevets, y cols (2002). "Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder." Biol Psychiatry 52(5): 404-12.
- Bravo, J. A., G. Diaz-Veliz, y cols (2009). "Desipramine prevents stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal markers of neuroprotection." Behav Pharmacol 20(3): 273-85.
- Carboni, L., C. Piubelli, y cols (2006). "Proteomic analysis of rat hippocampus after repeated psychosocial stress." Neuroscience 137(4): 1237-46.
- Carlier, M. F., F. Ressad, y cols (1999). "Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin." J Biol Chem 274(48): 33827-30.
- Castren, E. (2004). "Neurotrophic effects of antidepressant drugs." Curr Opin Pharmacol 4(1): 58-64.
- Castren, E. (2005). "Is mood chemistry?" Nat Rev Neurosci 6(3): 241-6.
- Cerqueira, J. J., J. M. Pego, y cols (2005). "Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors." J Neurosci 25(34): 7792-800.
- Cingolani, L. A. y Y. Goda (2008). "Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy." Nat Rev Neurosci 9(5): 344-56.
- Clenet, F., A. De Vos, y cols (2001). "Involvement of 5-HT(2C) receptors in the anti-immobility effects of antidepressants in the forced swimming test in mice." Eur Neuropsychopharmacol 11(2): 145-52.
- Cline, H. T. (2001). "Dendritic arbor development and synaptogenesis." Curr Opin Neurobiol 11(1): 118-26.
- Cohen, P. y S. Frame (2001). "The renaissance of GSK3." Nat Rev Mol Cell Biol 2(10): 769-76.
- Conti, A. C., J. F. Cryan, y cols (2002). "cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs." J Neurosci 22(8): 3262-8.
- Coyle-Rink, J., L. Del Valle, y cols (2002). "Developmental expression of Wnt signaling factors in mouse brain." Cancer Biol Ther 1(6): 640-5.
- Cryan, J. F. y I. Lucki (2000). "5-HT4 receptors do not mediate the antidepressant-like behavioral effects of fluoxetine in a modified forced swim test." Eur J Pharmacol 409(3): 295-9.
- Cryan, J. F., A. Markou, y cols (2002). "Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs." Trends Pharmacol Sci 23(5): 238-45.

- Cryan, J. F. y A. Holmes (2005). "The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety." Nat Rev Drug Discov 4(9): 775-90.
- Czeh, B., T. Michaelis, y cols (2001). "Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine." Proc Natl Acad Sci U S A 98(22): 12796-801.
- Chaouloff, F., O. Berton, y cols (1999). "Serotonin and stress." Neuropsychopharmacology 21(2 Suppl): 28S-32S.
- Chen, H. y B. L. Firestein (2007). "RhoA regulates dendrite branching in hippocampal neurons by decreasing cypin protein levels." J Neurosci 27(31): 8378-86.
- Chrousos, G. P. y T. Kino (2007). "Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders." Stress 10(2): 213-9.
- D'Sa, C. y R. S. Duman (2002). "Antidepressants and neuroplasticity." Bipolar Disord 4(3): 183-94.
- da Silva, J. S. y C. G. Dotti (2002). "Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis." Nat Rev Neurosci 3(9): 694-704.
- Dailey, M. E. y S. J. Smith (1996). "The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices." J Neurosci 16(9): 2983-94.
- Dajani, R., E. Fraser, y cols (2001). "Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition." Cell 105(6): 721-32.
- de Kloet, E. R., M. Joels, y cols (2005). "Stress and the brain: from adaptation to disease." Nat Rev Neurosci 6(6): 463-75.
- Dergham, P., B. Ellezam, y cols (2002). "Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair." J Neurosci 22(15): 6570-7.
- DeVane, C. L. (1999). "Metabolism and pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors." Cell Mol Neurobiol 19(4): 443-66.
- Doble, B. W. y J. R. Woodgett (2003). "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase." J Cell Sci 116(Pt 7): 1175-86.
- Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo, y cols (1997). "Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain." J Neurosci 17(13): 5046-61.
- Dremencov, E., I. Gispan-Herman, y cols (2004). "The serotonin-dopamine interaction is critical for fast-onset action of antidepressant treatment: in vivo studies in an animal model of depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 28(1): 141-7.
- Drevets, W. C. (1999). "Prefrontal cortical-amygdalar metabolism in major depression." Ann N Y Acad Sci 877: 614-37.
- Drevets, W. C. (2000). "Neuroimaging studies of mood disorders." Biol Psychiatry 48(8): 813-29.
- Drevets, W. C., W. Bogers, y cols (2002). "Functional anatomical correlates of antidepressant drug treatment assessed using PET measures of regional glucose metabolism." Eur Neuropsychopharmacol 12(6): 527-44.
- Dubreuil, C. I., N. Marklund, y cols (2006). "Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats." Exp Neurol 198(2): 361-9.
- Duman, R. S., G. R. Heninger, y cols (1997). "A molecular and cellular theory of depression." Arch Gen Psychiatry 54(7): 597-606.
- Duman, R. S., S. Nakagawa, y cols (2001). "Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment." Neuropsychopharmacology 25(6): 836-44.

- Duman, R. S. (2004). "Depression: a case of neuronal life and death?" Biol Psychiatry 56(3): 140-5.
- Eastwood, S. L. y P. J. Harrison (2001). "Synaptic pathology in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and mood disorders. A review and a Western blot study of synaptophysin, GAP-43 and the complexins." Brain Res Bull 55(5): 569-78.
- Engelmann, M., R. Landgraf, y cols (2004). "The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited." Front Neuroendocrinol 25(3-4): 132-49.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, y cols (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med 4(11): 1313-7.
- Ethell, I. M. y E. B. Pasquale (2005). "Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling." Prog Neurobiol 75(3): 161-205.
- Fan, G., L. M. Ballou, y cols (2003). "Phospholipase C-independent activation of glycogen synthase kinase-3beta and C-terminal Src kinase by Galphaq." J Biol Chem 278(52): 52432-6.
- Fava, M. y K. S. Kendler (2000). "Major depressive disorder." Neuron 28(2): 335-41.
- Firk, C. y C. R. Markus (2007). "Review: Serotonin by stress interaction: a susceptibility factor for the development of depression?" J Psychopharmacol 21(5): 538-44.
- Frame, S. y P. Cohen (2001). "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery." Biochem J 359(Pt 1): 1-16.
- Frechilla, D., A. Otano, y cols (1998). "Effect of chronic antidepressant treatment on transcription factor binding activity in rat hippocampus and frontal cortex." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 22(5): 787-802.
- Fuchs, E. y G. Flugge (1998). "Stress, glucocorticoids and structural plasticity of the hippocampus." Neurosci Biobehav Rev 23(2): 295-300.
- Fuchs, E., B. Czeh, y cols (2004). "Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond." Eur Neuropsychopharmacol 14 Suppl 5: S481-90.
- Fujimiya, M., K. Okumiya, y cols (1997). "Distribution of serotonin-immunoreactive nerve cells and fibers in the rat gastrointestinal tract." Histochem Cell Biol 107(2): 105-14.
- Gadek-Michalska, A. y J. Bugajski (2003). "Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress." J Physiol Pharmacol 54(3): 449-59.
- Galkin, V. E., A. Orlova, y cols (2003). "ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments." J Cell Biol 163(5): 1057-66.
- Gambarana, C., P. L. Tolu, y cols (2001). "A study of the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* on animal models." Pharmacopsychiatry 34 Suppl 1: S42-4.
- Garner, C. C., S. Kindler, y cols (2000). "Molecular determinants of presynaptic active zones." Curr Opin Neurobiol 10(3): 321-7.
- Gehler, S., G. Gallo, y cols (2004). "p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity." J Neurosci 24(18): 4363-72.
- Giardino, L., C. Bettelli, y cols (1999). "Regulation of CCK mRNA expression in the rat brain by stress and treatment with sertraline, a selective serotonin re-uptake inhibitor." Brain Res 824(2): 304-7.
- Goldstein, D. S. y B. McEwen (2002). "Allostasis, homeostats, and the nature of stress." Stress 5(1): 55-8.

- Goldstein, D. S. y I. J. Kopin (2007). "Evolution of concepts of stress." Stress 10(2): 109-20.
- Goold, R. G. y P. R. Gordon-Weeks (2004). "Glycogen synthase kinase 3beta and the regulation of axon growth." Biochem Soc Trans 32(Pt 5): 809-11.
- Gould, E., A. Beylin, y cols (1999). "Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation." Nat Neurosci 2(3): 260-5.
- Gould, E., A. J. Reeves, y cols (1999). "Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates." Proc Natl Acad Sci U S A 96(9): 5263-7.
- Gould, E., P. Tanapat, y cols (2000). "Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood." Biol Psychiatry 48(8): 715-20.
- Gould, T. D. y H. K. Manji (2002). "The Wnt signaling pathway in bipolar disorder." Neuroscientist 8(5): 497-511.
- Gould, T. D., H. Einat, y cols (2007). "Beta-catenin overexpression in the mouse brain phenocopies lithium-sensitive behaviors." Neuropsychopharmacology 32(10): 2173-83.
- Govek, E. E., S. E. Newey, y cols (2005). "The role of the Rho GTPases in neuronal development." Genes Dev 19(1): 1-49.
- Gregus, A., A. J. Wintink, y cols (2005). "Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats." Behav Brain Res 156(1): 105-14.
- Guest, P. C., M. R. Knowles, y cols (2004). "Mechanisms of action of the antidepressants fluoxetine and the substance P antagonist L-000760735 are associated with altered neurofilaments and synaptic remodeling." Brain Res 1002(1-2): 1-10.
- Gumbiner, B. M. (1996). "Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis." Cell 84(3): 345-57.
- Gupta, R. N. y S. A. Dziurdzy (1994). "Therapeutic monitoring of sertraline." Clin Chem 40(3): 498-9.
- Hajszan, T., A. Dow, y cols (2009). "Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression." Biol Psychiatry 65(5): 392-400.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science 279(5350): 509-14.
- Hall, A. C., F. R. Lucas, y cols (2000). "Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling." Cell 100(5): 525-35.
- Harwood, A. J. y G. Agam (2003). "Search for a common mechanism of mood stabilizers." Biochem Pharmacol 66(2): 179-89.
- Hetman, M., J. E. Cavanaugh, y cols (2000). "Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal." J Neurosci 20(7): 2567-74.
- Holmes, G. M., M. Tong, y cols (2009). "Effects of brain stem cholecystokinin-8s on gastric tone and esophageal-gastric reflex." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296(3): G621-31.
- Holsboer, F. (2000). "The corticosteroid receptor hypothesis of depression." Neuropsychopharmacology 23(5): 477-501.
- Hyman, S. E. y R. C. Malenka (2001). "Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence." Nat Rev Neurosci 2(10): 695-703.
- Inder, W. J., T. C. Prickett, y cols (2001). "The utility of plasma CRH as a predictor of preterm delivery." J Clin Endocrinol Metab 86(12): 5706-10.
- Jalink, K., P. L. Hordijk, y cols (1994). "Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator." Biochim Biophys Acta 1198(2-3): 185-96.

- Johnson, R. R., T. W. Prentice, *y cols* (2006). "Social stress alters the severity and onset of the chronic phase of Theiler's virus infection." J Neuroimmunol 175(1-2): 39-51.
- Jope, R. S. y G. V. Johnson (2004). "The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3." Trends Biochem Sci 29(2): 95-102.
- Kaidanovich-Beilin, O., A. Milman, *y cols* (2004). "Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus." Biol Psychiatry 55(8): 781-4.
- Kasai, H., M. Matsuzaki, *y cols* (2003). "Structure-stability-function relationships of dendritic spines." Trends Neurosci 26(7): 360-8.
- Katoh, H., J. Aoki, *y cols* (1998). "p160 RhoA-binding kinase ROKalpha induces neurite retraction." J Biol Chem 273(5): 2489-92.
- Kawasaki, S., S. Kimura, *y cols* (2004). "The small GTP-binding protein RhoA regulates serotonin-induced Na⁺-current response in the neurons of Aplysia." Neurosci Res 48(1): 33-43.
- Kendler, K. S., L. M. Thornton, *y cols* (2000). "Stressful life events and previous episodes in the etiology of major depression in women: an evaluation of the "kindling" hypothesis." Am J Psychiatry 157(8): 1243-51.
- Khawaja, M. Y. y A. R. Yousafzai (2004). "Stress and coping with stress: a review." J Ayub Med Coll Abbottabad 16(4): 89-92.
- Khawam, E. A., G. Laurencic, *y cols* (2006). "Side effects of antidepressants: an overview." Cleve Clin J Med 73(4): 351-3, 356-61.
- Kim, S. W., S. Y. Park, *y cols* (2002). "Up-regulation of tryptophan hydroxylase expression and serotonin synthesis by sertraline." Mol Pharmacol 61(4): 778-85.
- Kobielak, A. y E. Fuchs (2004). "Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol 5(8): 614-25.
- Koe, B. K., L. A. Lebel, *y cols* (1990). "[³H] sertraline binding to rat brain membranes." Psychopharmacology (Berl) 100(4): 470-6.
- Konkle, A. T., K. B. Sreter, *y cols* (2003). "Chronic paroxetine infusion influences macronutrient selection in male Sprague-Dawley rats." Pharmacol Biochem Behav 74(4): 883-90.
- Kornack, D. R. y P. Rakic (1999). "Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey." Proc Natl Acad Sci U S A 96(10): 5768-73.
- Kozlovsky, N., R. H. Belmaker, *y cols* (2002). "GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia." Eur Neuropsychopharmacol 12(1): 13-25.
- Kranenburg, O., M. Poland, *y cols* (1999). "Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction." Mol Biol Cell 10(6): 1851-7.
- Kumar, V., M. X. Zhang, *y cols* (2005). "Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways." J Neurosci 25(49): 11288-99.
- Kvachnina, E., G. Liu, *y cols* (2005). "5-HT₇ receptor is coupled to G alpha subunits of heterotrimeric G12-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology." J Neurosci 25(34): 7821-30.
- Lanfume, L., M. C. Pardon, *y cols* (1999). "5-HT_{1A} autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice." Neuroreport 10(16): 3369-74.
- Leemhuis, J., S. Boutillier, *y cols* (2004). "Rho GTPases and phosphoinositide 3-kinase organize formation of branched dendrites." J Biol Chem 279(1): 585-96.

- Leonard, B. (1995). "SSRI differentiation: Pharmacology and pharmacokinetics." Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental 10(S3): S149-S158.
- Lesage, F., H. Hibino, y cols (2004). "Association of beta-catenin with the alpha-subunit of neuronal large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels." Proc Natl Acad Sci U S A 101(2): 671-5.
- Lesort, M., A. Greendorfer, y cols (1999). "Glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and tau in postmortem bipolar brain." J Neural Transm 106(11-12): 1217-22.
- Li, X., W. Zhu, y cols (2004). "In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain." Neuropsychopharmacology 29(8): 1426-31.
- Lippman, J. y A. Dunaevsky (2005). "Dendritic spine morphogenesis and plasticity." J Neurobiol 64(1): 47-57.
- Lowry, C. A. (2002). "Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." J Neuroendocrinol 14(11): 911-23.
- Lu, L., G. Bao, y cols (2003). "Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments." Exp Neurol 183(2): 600-9.
- Lucas, F. R. y P. C. Salinas (1997). "WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons." Dev Biol 192(1): 31-44.
- Lucas, F. R., R. G. Gould, y cols (1998). "Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium." J Cell Sci 111 (Pt 10): 1351-61.
- Lucki, I. (1997). "The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs." Behav Pharmacol 8(6-7): 523-32.
- Luo, L., T. K. Hensch, y cols (1996). "Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines." Nature 379(6568): 837-40.
- Luo, L. (2002). "Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity." Annu Rev Cell Dev Biol 18: 601-35.
- Maciver, S. K. y P. J. Hussey (2002). "The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins." Genome Biol 3(5): reviews3007.
- MacQueen, G. M., S. Campbell, y cols (2003). "Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression." Proc Natl Acad Sci U S A 100(3): 1387-92.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, y cols (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." Science 285(5429): 895-8.
- Magarinos, A. M. y B. S. McEwen (1995). "Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors." Neuroscience 69(1): 89-98.
- Magarinos, A. M., B. S. McEwen, y cols (1996). "Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews." J Neurosci 16(10): 3534-40.
- Magarinos, A. M., J. M. Verdugo, y cols (1997). "Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A 94(25): 14002-8.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, y cols (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." J Neurosci 20(24): 9104-10.
- Maletic-Savatic, M., R. Malinow, y cols (1999). "Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity." Science 283(5409): 1923-7.

- Manev, H., T. Uz, *y cols* (2001). "Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro." Eur J Pharmacol 411(1-2): 67-70.
- Manji, H. K., W. C. Drevets, *y cols* (2001). "The cellular neurobiology of depression." Nat Med 7(5): 541-7.
- Manji, H. K., J. A. Quiroz, *y cols* (2003). "Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression." Biol Psychiatry 53(8): 707-42.
- Marin, M. T., F. C. Cruz, *y cols* (2007). "Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats." Physiol Behav 90(1): 29-35.
- Matsuzaki, M., N. Honkura, *y cols* (2004). "Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines." Nature 429(6993): 761-6.
- Mazure, C. M., D. M. Quinlan, *y cols* (1997). "Recent life stressors and biological markers in newly admitted psychotic patients." Biol Psychiatry 41(8): 865-70.
- McAllister, A. K. (2000). "Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth." Cereb Cortex 10(10): 963-73.
- McEwen, B. S. y R. M. Sapolsky (1995). "Stress and cognitive function." Curr Opin Neurobiol 5(2): 205-16.
- McEwen, B. S. (1998). "Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load." Ann N Y Acad Sci 840: 33-44.
- McEwen, B. S. (1999). "Stress and hippocampal plasticity." Annu Rev Neurosci 22: 105-22.
- McEwen, B. S. (2000). "The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance." Brain Res 886(1-2): 172-189.
- McEwen, B. S. y S. Chattarji (2004). "Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine." Eur Neuropsychopharmacol 14 Suppl 5: S497-502.
- McEwen, B. S. (2007). "Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain." Physiol Rev 87(3): 873-904.
- McGrew, L., R. D. Price, *y cols* (2004). "RNA editing of the human serotonin 5-HT_{2C} receptor disrupts transactivation of the small G-protein RhoA." Mol Pharmacol 65(1): 252-6.
- McKinney, W. T., Jr. y W. E. Bunney, Jr. (1969). "Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research." Arch Gen Psychiatry 21(2): 240-8.
- McKittrick, C. R., A. M. Magarinos, *y cols* (2000). "Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites." Synapse 36(2): 85-94.
- Meng, Y., Y. Zhang, *y cols* (2002). "Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice." Neuron 35(1): 121-33.
- Meng, Y., Y. Zhang, *y cols* (2003). "Regulation of spine morphology and synaptic function by LIMK and the actin cytoskeleton." Rev Neurosci 14(3): 233-40.
- Mesulam, M. M. (1999). "Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles." Neuron 24(3): 521-9.
- Miyoshi, K. y L. Hennighausen (2003). "Beta-catenin: a transforming actor on many stages." Breast Cancer Res 5(2): 63-8.

- Mora, S. y G. Díaz-Véliz (1993). Intracerebral administration of neuropeptides: an assessment of behavioral change. Paradigms for the study of behavior. Methods in neurosciences. M. Conn. San Diego, CA, Academic Press. 14: 180-193.
- Mostany, R., E. M. Valdizan, y cols (2008). "A role for nuclear beta-catenin in SNRI antidepressant-induced hippocampal cell proliferation." Neuropharmacology 55(1): 18-26.
- Murase, S., E. Mosser, y cols (2002). "Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function." Neuron 35(1): 91-105.
- Murray, C. J. y A. D. Lopez (1996). "Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study." Science 274(5288): 740-3.
- Nacher, J., K. Pham, y cols (2004). "Chronic restraint stress and chronic corticosterone treatment modulate differentially the expression of molecules related to structural plasticity in the adult rat piriform cortex." Neuroscience 126(2): 503-9.
- Nakatani, N., T. Ohnishi, y cols (2007). "Expression analysis of actin-related genes as an underlying mechanism for mood disorders." Biochem Biophys Res Commun 352(3): 780-6.
- Nakayama, A. Y., M. B. Harms, y cols (2000). "Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons." J Neurosci 20(14): 5329-38.
- Nakayama, K., H. Katsu, y cols (2003). "Possible alteration of tryptophan metabolism following repeated administration of sertraline in the rat brain." Brain Res Bull 59(4): 293-7.
- Negishi, M. y H. Katoh (2005). "Rho family GTPases and dendrite plasticity." Neuroscientist 11(3): 187-91.
- Nelson, W. J. y R. Nusse (2004). "Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways." Science 303(5663): 1483-7.
- Nemeroff, C. B. y M. J. Owens (2002). "Treatment of mood disorders." Nat Neurosci 5 Suppl: 1068-70.
- Nestler, E. J., M. Barrot, y cols (2002). "Neurobiology of depression." Neuron 34(1): 13-25.
- Nguyen, P. V. y N. H. Woo (2003). "Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases." Prog Neurobiol 71(6): 401-37.
- Nibuya, M., E. J. Nestler, y cols (1996). "Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus." J Neurosci 16(7): 2365-72.
- Nishimura, W., I. Yao, y cols (2002). "Interaction of synaptic scaffolding molecule and Beta-catenin." J Neurosci 22(3): 757-65.
- Norrholm, S. D. y C. C. Ouimet (2000). "Chronic fluoxetine administration to juvenile rats prevents age-associated dendritic spine proliferation in hippocampus." Brain Res 883(2): 205-15.
- Novak, A. y S. Dedhar (1999). "Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf." Cell Mol Life Sci 56(5-6): 523-37.
- Nusser, N., E. Gosmanova, y cols (2002). "Nerve growth factor signals through TrkA, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac1 to inactivate RhoA during the initiation of neuronal differentiation of PC12 cells." J Biol Chem 277(39): 35840-6.
- O'Kane, E. M., T. W. Stone, y cols (2003). "Activation of Rho GTPases by synaptic transmission in the hippocampus." J Neurochem 87(5): 1309-12.

- Okamura, K., H. Tanaka, *y cols* (2004). "Cadherin activity is required for activity-induced spine remodeling." J Cell Biol 167(5): 961-72.
- Ongur, D. y J. L. Price (2000). "The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans." Cereb Cortex 10(3): 206-19.
- Orme, M. H., A. L. Giannini, *y cols* (2003). "Glycogen synthase kinase-3 and Axin function in a beta-catenin-independent pathway that regulates neurite outgrowth in neuroblastoma cells." Mol Cell Neurosci 24(3): 673-86.
- Paez-Pereda, M. (2005). "New drug targets in the signaling pathways activated by antidepressants." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 29(6): 1010-6.
- Papp, M., E. Moryl, *y cols* (1996). "Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression." Eur J Pharmacol 296(2): 129-36.
- Pasquier, D. A. y F. Reinoso-Suarez (1977). "Differential efferent connections of the brain stem to the hippocampus in the cat." Brain Res 120(3): 540-8.
- Pavlov, D., A. Muhrad, *y cols* (2007). "Actin filament severing by cofilin." J Mol Biol 365(5): 1350-8.
- Paxinos, G. y W. C. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press.
- Peng Qi, Masuda N, Jiang M., Li Q, Zhao M., Ross C., Duan W. (2008). "The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increase BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model". Exp Neurol 210(1):154-163.
- Perona, M. T., S. Waters, *y cols* (2008). "Animal models of depression in dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter knockout mice: prominent effects of dopamine transporter deletions." Behav Pharmacol 19(5-6): 566-74.
- Ponimaskin, E. G., J. Profirovic, *y cols* (2002). "5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the Galpha subunit of heterotrimeric G13 protein." J Biol Chem 277(23): 20812-9.
- Porter, R. J., P. Gallagher, *y cols* (2004). "Corticosteroid-serotonin interactions in depression: a review of the human evidence." Psychopharmacology (Berl) 173(1-2): 1-17.
- Preskorn, S. H. (2006). "Pharmacogenomics, informatics, and individual drug therapy in psychiatry: past, present and future." J Psychopharmacol 20(4 Suppl): 85-94.
- Prica, C., M. Hascoet, *y cols* (2008). "Is co-administration of bupropion with SSRIs and SNRIs in forced swimming test in mice, predictive of efficacy in resistant depression?" Behav Brain Res 194(1): 92-9.
- Racz, B. y R. J. Weinberg (2006). "Spatial organization of cofilin in dendritic spines." Neuroscience 138(2): 447-56.
- Radley, J. J. y J. H. Morrison (2005). "Repeated stress and structural plasticity in the brain." Ageing Res Rev 4(2): 271-87.
- Rajkowska, G. (2000). "Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells." Biol Psychiatry 48(8): 766-77.
- Rao, A. y A. M. Craig (2000). "Signaling between the actin cytoskeleton and the postsynaptic density of dendritic spines." Hippocampus 10(5): 527-41.
- Redrobe, J. P., C. P. MacSweeney, *y cols* (1996). "The role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in antidepressant drug actions in the mouse forced swimming test." Eur J Pharmacol 318(2-3): 213-20.

- Renard, C. E., E. Dailly, *y cols* (2004). "Is dopamine a limiting factor of the antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test?" Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 28(8): 1255-9.
- Robbins, T. W. (2005). "Controlling stress: how the brain protects itself from depression." Nat Neurosci 8(3): 261-2.
- Rojas, G., González I., *y cols* (1997). "Eventos vitales y patología psiquiátrica en el nivel primario de atención." Acta Psiqui. Psi. America Latina 43: 134-140.
- Rossby, S. P., I. Nalepa, *y cols* (1995). "Norepinephrine-independent regulation of GR1 mRNA in vivo by a tricyclic antidepressant." Brain Res 687(1-2): 79-82.
- Rossby, S. P., D. H. Manier, *y cols* (1999). "Pharmacological actions of the antidepressant venlafaxine beyond aminergic receptors." Int J Neuropsychopharmacol 2(1): 1-8.
- Salvarezza, S. B., S. Deborde, *y cols* (2009). "LIM kinase 1 and cofilin regulate actin filament population required for dynamin-dependent apical carrier fission from the trans-Golgi network." Mol Biol Cell 20(1): 438-51.
- Sanchez Martin, C., J. Diaz-Nido, *y cols* (1998). "Regulation of a site-specific phosphorylation of the microtubule-associated protein 2 during the development of cultured neurons." Neuroscience 87(4): 861-70.
- Sanchez, S., C. L. Sayas, *y cols* (2001). "The inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase induces neurite retraction and activates GSK3." J Neurochem 78(3): 468-81.
- Sanders-Bush, E., M. Breeding, *y cols* (1989). "Sertraline-induced desensitization of the serotonin 5HT-2 receptor transmembrane signaling system." Psychopharmacology (Berl) 99(1): 64-9.
- Santos Da Silva, J., V. Schubert, *y cols* (2004). "RhoA, Rac1, and cdc42 intracellular distribution shift during hippocampal neuron development." Mol Cell Neurosci 27(1): 1-7.
- Sapan, C. V., R. L. Lundblad, *y cols* (1999). "Colorimetric protein assay techniques." Biotechnol Appl Biochem 29 (Pt 2): 99-108.
- Sapolsky, R. M. (1986). "Glucocorticoid toxicity in the hippocampus. Temporal aspects of synergy with kainic acid." Neuroendocrinology 43(3): 440-4.
- Sapolsky, R. M., M. P. Armanini, *y cols* (1990). "Glucocorticoid feedback inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretagogue release. Relationship to corticosteroid receptor occupancy in various limbic sites." Neuroendocrinology 51(3): 328-36.
- Sapolsky, R. M. (2000). "The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death." Biol Psychiatry 48(8): 755-65.
- Sapolsky, R. M. (2003). "Stress and plasticity in the limbic system." Neurochem Res 28(11): 1735-42.
- Sargent, P. A., K. H. Kjaer, *y cols* (2000). "Brain serotonin1A receptor binding measured by positron emission tomography with [11C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment." Arch Gen Psychiatry 57(2): 174-80.
- Sayas, C. L., M. T. Moreno-Flores, *y cols* (1999). "The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation." J Biol Chem 274(52): 37046-52.
- Sayas, C. L., J. Avila, *y cols* (2002). "Glycogen synthase kinase-3 is activated in neuronal cells by Galpha12 and Galpha13 by Rho-independent and Rho-dependent mechanisms." J Neurosci 22(16): 6863-75.
- Sayas, C. L., J. Avila, *y cols* (2002). "Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3." Biochim Biophys Acta 1582(1-3): 144-53.

- Sayas, C. L., A. Ariaens, *y cols* (2006). "GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction." Mol Biol Cell 17(4): 1834-44.
- Schaaf, M. J., R. Duurland, *y cols* (2000). "Circadian variation in BDNF mRNA expression in the rat hippocampus." Brain Res Mol Brain Res 75(2): 342-4.
- Schubert, V., J. S. Da Silva, *y cols* (2006). "Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner." J Cell Biol 172(3): 453-67.
- Shaley, U., J. Yap, *y cols* (2001). "Leptin attenuates acute food deprivation-induced relapse to heroin seeking." J Neurosci 21(4): RC129.
- Sheline, Y. I., P. W. Wang, *y cols* (1996). "Hippocampal atrophy in recurrent major depression." Proc Natl Acad Sci U S A 93(9): 3908-13.
- Sheline, Y. I., M. Sanghavi, *y cols* (1999). "Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression." J Neurosci 19(12): 5034-43.
- Shelton, R. C. (2003). "Classification on antidepressants and their Clinical Implications." Primary care Companion J Clin Psychiatry 5(7): 23-32.
- Shirayama, Y., A. C. Chen, *y cols* (2002). "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression." J Neurosci 22(8): 3251-61.
- Sin, W. C., K. Haas, *y cols* (2002). "Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases." Nature 419(6906): 475-80.
- Slattery, D. A., A. L. Hudson, *y cols* (2004). "Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms." Fundam Clin Pharmacol 18(1): 1-21.
- Spedding, M., I. Neau, *y cols* (2003). "Brain plasticity and pathology in psychiatric disease: sites of action for potential therapy." Curr Opin Pharmacol 3(1): 33-40.
- Spina, E., M. G. Scordo, *y cols* (2003). "Metabolic drug interactions with new psychotropic agents." Fundam Clin Pharmacol 17(5): 517-38.
- Sprouse, J., T. Clarke, *y cols* (1996). "Comparison of the effects of sertraline and its metabolite desmethylsertraline on blockade of central 5-HT reuptake in vivo." Neuropsychopharmacology 14(4): 225-31.
- Stockmeier, C. A. (2003). "Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter." J Psychiatr Res 37(5): 357-73.
- Stout, S. C., M. J. Owens, *y cols* (2002). "Regulation of corticotropin-releasing factor neuronal systems and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity by stress and chronic antidepressant treatment." J Pharmacol Exp Ther 300(3): 1085-92.
- Strekalova, T., R. Spanagel, *y cols* (2004). "Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration." Neuropsychopharmacology 29(11): 2007-17.
- Sudhof, T. C. (1995). "The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions." Nature 375(6533): 645-53.
- Tafet, G. E. y R. Bernardini (2003). "Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 27(6): 893-903.
- Takeichi, M. y K. Abe (2005). "Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins." Trends Cell Biol 15(4): 216-21.
- Tanaka, H., W. Shan, *y cols* (2000). "Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity." Neuron 25(1): 93-107.

- Tanji, C., H. Yamamoto, *y cols* (2002). "A-kinase anchoring protein AKAP220 binds to glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) and mediates protein kinase A-dependent inhibition of GSK-3beta." J Biol Chem 277(40): 36955-61.
- Thome, J., B. Pesold, *y cols* (2001). "Stress differentially regulates synaptophysin and synaptotagmin expression in hippocampus." Biol Psychiatry 50(10): 809-12.
- Thompson, K. G., D. P. Hanes, *y cols* (1996). "Perceptual and motor processing stages identified in the activity of macaque frontal eye field neurons during visual search." J Neurophysiol 76(6): 4040-55.
- Togashi, H., K. Abe, *y cols* (2002). "Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis." Neuron 35(1): 77-89.
- Tohda, M., M. Nomura, *y cols* (2006). "Molecular pathopharmacology of 5-HT2C receptors and the RNA editing in the brain." J Pharmacol Sci 100(5): 427-32.
- Torres, I. L., A. Buffon, *y cols* (2002). "Effect of chronic and acute stress on ectonucleotidase activities in spinal cord." Physiol Behav 75(1-2): 1-5.
- Tsacopoulos, M. y P. J. Magistretti (1996). "Metabolic coupling between glia and neurons." J Neurosci 16(3): 877-85.
- Uchida, N., Y. Honjo, *y cols* (1996). "The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones." J Cell Biol 135(3): 767-79.
- Vakili, K., S. S. Pillay, *y cols* (2000). "Hippocampal volume in primary unipolar major depression: a magnetic resonance imaging study." Biol Psychiatry 47(12): 1087-90.
- van Praag, H. M. (2004). "The debit balance of present day stress research." World J Biol Psychiatry 5(3): 155-60.
- Van Troys, M., L. Huyck, *y cols* (2008). "Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation." Eur J Cell Biol 87(8-9): 649-67.
- Vicente, B. (2002). "Prevalence of psychiatric disorders in Chile." Rev. méd. Chile 130(5): 527-536.
- Vleminckx, K. y R. Kemler (1999). "Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling." Bioessays 21(3): 211-20.
- Vollmayr, B. y F. A. Henn (2001). "Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability." Brain Res Brain Res Protoc 8(1): 1-7.
- Vyas, A., R. Mitra, *y cols* (2002). "Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons." J Neurosci 22(15): 6810-8.
- Wada, A. (2009). "GSK-3 inhibitors and insulin receptor signaling in health, disease, and therapeutics." Front Biosci 14: 1558-70.
- Waldinger, M. D. y B. Olivier (1998). "Selective serotonin reuptake inhibitor-induced sexual dysfunction: clinical and research considerations." Int Clin Psychopharmacol 13 Suppl 6: S27-33.
- Watanabe, Y., E. Gould, *y cols* (1992). "Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons." Brain Res 588(2): 341-5.
- Willert, K., S. Shibamoto, *y cols* (1999). "Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex." Genes Dev 13(14): 1768-73.
- Wodarz, A. y R. Nusse (1998). "Mechanisms of Wnt signaling in development." Annu Rev Cell Dev Biol 14: 59-88.
- Wood, G. E., L. T. Young, *y cols* (2004). "Stress-induced structural remodeling in hippocampus: prevention by lithium treatment." Proc Natl Acad Sci U S A 101(11): 3973-8.

- Yamaguchi, Y., H. Katoh, *et al.* (2001). "RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway." J Biol Chem 276(22): 18977-83.
- Yu, G. D., Y. L. Liu, *et al.* (2001). "The inhibitory effect of serotonin on the spontaneous discharge of suprachiasmatic neurons in hypothalamic slice is mediated by 5-HT(7) receptor." Brain Res Bull 54(4): 395-8.
- Yu, X. *et al.* R. C. Malenka (2003). "Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis." Nat Neurosci 6(11): 1169-77.
- Yu, X. *et al.* R. C. Malenka (2004). "Multiple functions for the cadherin/catenin complex during neuronal development." Neuropharmacology 47(5): 779-86.
- Zambello, E., P. A. Jimenez-Vasquez, *et al.* (2008). "Acute stress differentially affects corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the central amygdala of the "depressed" flinders sensitive line and the control flinders resistant line rats." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 32(3): 651-61.
- Zurita, A., I. Martijena, *et al.* (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(1-2): 163-71.