

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EL INHIBIDOR DE ROCK, FASUDIL Y EL ANTIDEPRESIVO
SERTRALINA COMPARTEN EFECTOS A NIVEL MORFOLÓGICO Y
MOLECULAR EN EL HIPOCAMPO DE RATA***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Farmacología por:**

GONZALO JAVIER GARCÍA ROJO

Directora de Tesis: Dra. Jenny Fiedler Temer

Santiago-CHILE

Septiembre 2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN

Tesis de Doctorado

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

GONZALO JAVIER GARCÍA ROJO

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de la Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día:

Director de Tesis:

Dra. Jenny Fiedler T.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Soledad Bollo (Presidenta)

Dr. Esteban Aliaga

Dr. Jorge Fuentealba

Dra. Jimena Sierralta

Dr. Pedro Zamorano

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis representa no solo la culminación del proceso de obtención de un grado académico, sino que el punto de partida de nuevos desafíos en lo profesional y especialmente en mi crecimiento como persona. Ha sido un camino difícil, desde mi llegada a la ciudad de Santiago para cumplir con uno de mis sueños más profundos, pero también ha sido un período lleno de satisfacción, alegría y desarrollo integral. Mi vida cambió durante la estadía en el programa de doctorado, no solo por haber incorporado nuevas herramientas técnicas y conocimiento, sino que por haber conocido personas extraordinarias de las cuales aprendí muchísimo.

Es por esto que quiero expresar mis agradecimientos a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo y las que hicieron de mi estadía en Santiago una gran experiencia.

- A CONICYT y a la Universidad de Chile por haber confiado en mí desde un principio y entregarme todas las herramientas que necesité en este camino.
- A mis profesores y compañeros de curso, que hicieron el día a día entretenido y enriquecedor. Me siento afortunado y orgulloso de haber sido parte de ese gran grupo de personas quienes nos apoyamos para ir avanzando clase a clase.
- A mi directora de tesis Jenny Fiedler. Muchas gracias por recibirme en su laboratorio, por guiarme en el trabajo, sus consejos, correcciones, paciencia y profesionalismo. Aprendí mucho de su experiencia y pasión por lo que hace. Ha sido una excelente guía, a la cual respeto y admiro.
- A mi comisión evaluadora. Siempre estaré agradecido de sus correcciones y consejos. Ustedes hicieron de mí un mejor profesional. Gracias por compartir su conocimiento y experiencia en pos de mi investigación y formación científica.
- Al laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética, que fue mi segundo hogar y una verdadera familia para mí. Gracias a Mauricio por acogerme en el laboratorio y confiarme sus muestras en mis inicios. Gracias a Paulina por sus consejos y cariño. Gracias a Valentina, Ruth, Alexandra, Macarena, Aníbal, Felipe, Jota y Dani por tantas risas y buenos momentos que vivimos. Hicieron del laboratorio el mejor lugar de la universidad, ¡muchas gracias neuro DX!
- A las personas que facilitaron mi trabajo experimental fuera del laboratorio. A Carolina por su manejo con el microscopio confocal y por hacer tan entretenidas las sesiones de fotos de neuronas y espinas dendríticas. A Freddy y todo el equipo del bioterio de la facultad. Muchas gracias por su fundamental ayuda con mi trabajo.
- A mis amigos, especialmente Jorge, por su ayuda, compañía y demostrar ser un gran amigo en todo momento.

- A los profesores, estudiantes y funcionarios futboleros de la facultad, especialmente al Dr. Alfonso Paredes y el equipo de fútbol Neuro 2016. Participar y salir campeones del campeonato interno de la facultad fue uno de los momentos más felices de mi estadía en la universidad. Lograr el título después de haber sido el peor equipo de la temporada anterior, me enseñó que el trabajo en equipo y el compañerismo son los valores que nos permiten lograr nuestras metas en el fútbol y en la vida. ¡Gracias Campeones!
- A mis hermanas por demostrarme siempre su cariño y apoyo. Ustedes fueron mi conexión con la familia en Santiago. Gracias por todos los momentos vividos, este trabajo también es gracias a ustedes.
- A mi familia, a la cual le debo todo lo que soy. A mis tíos, primos y abuelos mi más profundo agradecimiento por el apoyo incondicional y sus permanentes muestras de cariño y amor. A mis padres, que son lo más valioso que me ha dado la vida. Gracias por los valores, el amor y todo lo que me entregaron para lograr mis metas. Esto es para ustedes.
- A Tania, mi compañera de vida. Gracias por el apoyo y comprensión en momentos difíciles, gracias por el amor y los buenos momentos que hemos vivido juntos.
- Finalmente, gracias a dios por todo lo bueno, lo malo y lo difícil. Por haberme dado la oportunidad de vivir esta experiencia.

Esta Tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT #1120528, Beca de apoyo de tesis, gastos operacionales (21120711), Beca doctorado nacional CONICYT 21120711, Beca eventos y cursos cortos 2013 (81130352), Beca eventos y cursos cortos 2015 (81150499) y ha dado origen a las siguientes comunicaciones y publicaciones durante el período de ejecución de este trabajo.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS CIENTÍFICOS NACIONALES

García-Rojo G., Muñoz M. and Fiedler J. Differential effect of restraint stress on dorsal and ventral rat hippocampus: changes in mRNA levels of plasticity markers and glutamate receptors subunits. XII PABMB; XXXVI Reunión Anual SBBM de Chile. Puerto Varas, Chile. November 9 - 14, 2013.

Aguayo F., Rojas P., Pacheco A., **García G.**, Muñoz M., Márquez R., Fiedler J. Effect of acute stress on FMRP phosphorylation by AKT-mTOR and MAPK pathways in rat hippocampus. XII PABMB Congress. Hotel Patagónico – Puerto Varas, Chile, November 9 - 14, 2013.

Aguayo, F., Rojas, P., Márquez, R., Pacheco, A., García Pérez, A., **García-Rojo, G.**, Muñoz Llanos, M., Fiedler, J. Acute stress controls FMRP levels and its activity through AKT-mTOR and MAPK ERK1/2 pathways in rat hippocampus. XXXVII Annual Meeting Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. September 30 – October 04, 2014.

Pacheco, A., Muñoz-Llanos, M., **García-Rojo, G.**, Aguayo, F., García-Pérez, M., Márquez, R., Werner, M., Cidlowski, J., Fiedler, J. Acute administration of corticosterone to adrenalectomized rats changes miRNAs levels in the hippocampus: relationship with AMPA and NMDA receptors expression. XXXVII Annual Meeting Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. September 30 – October 4, 2014.

García-Rojo Gonzalo, Vilches Natalia, Fiedler Jenny. Fasudil prevents depressive-like behavior and hippocampal dendritic spine loss promoted by stress in rats Congreso conjunto (Sociedad Chilena de Neurociencia, Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, Sociedad Chilena de Farmacología), Coquimbo, Chile, 22-25 Sept, 2015.

Felipe Aguayo, Sergio Andrés, Aníbal Pacheco, **Gonzalo García-Rojo**, M. Alexandra García- Pérez, Macarena Tejos, Paulina Rojas, Jenny Fiedler. Acute stress promotes MMP-9 expression and activation associated with a redistribution to synaptic sites in hippocampus. Symposium “Genes, brain and behavior”. Universidad de Chile, Santiago- Chile. April 1st, 2016.

Macarena Tejos, Felipe Aguayo, Aníbal Pacheco, **Gonzalo García-Rojo**, María-Alexandra García-Perez, Jenny Fiedler. Acute restraint stress induces changes in dendritic spines density of rat hippocampus. Symposium “Genes, brain and behavior”. Universidad de Chile, Santiago-Chile. April 1st, 2016.

Aníbal Pacheco, **Gonzalo García-Rojo**, Mauricio Muñoz, Felipe Aguayo, Macarena Tejos, Alexandra García, Jenny Fiedler. Chronic restraint stress differentially regulates subunit levels of NMDA receptors in dorsal and ventral hippocampus. Symposium “Genes, brain and behavior”. Universidad de Chile, Santiago-Chile. April 1st, 2016.

Gonzalo García-Rojo, Natalia Vilches, José Ulloa, Aníbal Pacheco, Macarena Tejos, Felipe Aguayo, Jenny Fiedler. Sertraline and the rock inhibitor fasudil share antidepressant-like effects on depression-like behaviors and dendritic spine loss in rat hippocampus elicited by restraint stress. ¿a novel class of antidepressant?. Symposium “Genes, brain and behavior”. Universidad de Chile, Santiago-Chile. April 1st, 2016.

PRESENTACIONES A CONGRESOS CIENTÍFICOS INTERNACIONALES

Fiedler J.L., Mauricio Muñoz, Sergio Andrés, Aníbal Pacheco, Valentina Doberti, **Gonzalo García**, Paulina S. Rojas, Aguayo, F. Synaptic remodeling in the hippocampus: relationship with stress and glucocorticoids. 2013 International Workshop in Neuroendocrinology. Santa Clara Eco Resort – Dourado, Brazil, August 4th – 7th, 2013.

Fiedler J.L., Muñoz M., **García-Rojo G.**, Pacheco A., Aguayo F., Rojas P. Differential response of dorsal and ventral rat hippocampus to restraint stress: effect on mRNA levels of proteins related to neuroplasticity. 9th FENS Forum of Neuroscience. Federation of European Neuroscience Societies. Milan, Italy, 2014

G. García-Rojo, N. Vilches, J. L. Fiedler. The RhoKinase Inhibitor, Fasudil, prevents depressive-like behavior and hippocampal dendritic spine loss promoted by chronic restraint stress in rats. 45th annual meeting of The Society of Neuroscience (SfN). Chicago, USA. October 17 - 21, 2015.

F. Aguayo; P. Rojas; A. Pacheco; **G. García-Rojo**; M. A. García-Pérez; M. Muñoz-Llanos; R. Márquez; J. Fiedler. Relationship between FMRP and MMP9 in an acute restraint stress model in rats: a possible cross-regulation mechanism. Society for Neuroscience. Chicago, USA, 2015.

J. L. Fiedler; P. Castañeda; M. Muñoz-Llanos; **G. García-Rojo**; R. Márquez; M. A. García-Pérez; P. Rojas; E. Aliaga. Association of N-cadherin levels and downstream effectors of Rho-GTPases with dendritic spine loss induced by chronic stress in rat hippocampal neurons. Society for Neuroscience. Chicago, USA, 2015.

García-Pérez MA., Muñoz-Llanos MA., Xu X., Cidlowski J., Aguayo F., **García-Rojo G.**, Pacheco A., Fiedler JL. Effect of stress on specific microRNAs levels that target genes coding for key proteins involved in spine morphology. 45th annual meeting of The Society of Neuroscience (SfN). Chicago, USA. October 17 - 21, 2015.

Aguayo, F., Rojas, P., Pacheco, A., **García-Rojo, G.**, Muñoz-Llanos, M., García-Pérez, A., Márquez, R., Fiedler, J. Acute stress increases FMRP levels in hippocampus and promotes Akt-mTOR and MAPK pathways activation in rats. 9th Annual Canadian Neuroscience (CAN) Meeting. Vancouver, Canada. May 24 – 27, 2015.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Aníbal Pacheco, Felipe I. Aguayo, Esteban Aliaga, Mauricio Muñoz, **Gonzalo García-Rojo**, Felipe A. Olave, Nicolás A. Parra-Fiedler, Alexandra García-Pérez, Macarena Tejos-Bravo, Paulina S. Rojas, Claudio S. Parra and Jenny L. Fiedler. Chronic Stress Triggers Expression of Immediate Early Genes and Differentially Affects the Expression of AMPA and NMDA Subunits in Dorsal and Ventral Hippocampus of Rats. *Front. Mol. Neurosci.*, 10 August 2017 | <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00244>.

García-Rojo G*, Fresno C*, Vilches N, Díaz-Véliz G*, Mora S, Aguayo F, Pacheco A, Parra-Fiedler N, Parra CS, Rojas PS, Tejos M, Aliaga E, Fiedler JL. The ROCK inhibitor Fasudil prevents chronic restraint stress-induced depressive-like behaviors and dendritic spine loss in rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2017 Jan 5. pii: pyw108. doi: 10.1093/ijnp/pyw108.

Castañeda P*, Muñoz M*, **García-Rojo G***, Ulloa JL, Bravo JA, Márquez R, García-Pérez MA, Arancibia D, Araneda K, Rojas PS, Mondaca-Ruff D, Díaz-Véliz G, Mora S, Aliaga E, Fiedler JL. Association of N-cadherin levels and downstream effectors of Rho GTPases with dendritic spine loss induced by chronic stress in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 2015, 93: 1476-91. doi: 10.1002/jnr.23635. (Figura principal como portada de la revista).

*Se comparte autoría

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sintomatología y criterios diagnósticos de la depresión mayor	1
1.2 Epidemiología de la depresión mayor.....	2
1.3 Relación entre estrés y predisposición a la depresión mayor.....	3
1.4 Tratamiento Farmacológico de la depresión	5
1.5 Bases moleculares de la Depresión y de la acción de los Antidepresivos	8
1.5.1 Relación con Factores Neurotróficos	8
1.5.2 Rol del factor transcripcional CREB	9
1.5.3 Neuroplasticidad, Neurogénesis y vías de supervivencia.....	11
1.6 Cambios morfológicos asociados al estrés, la depresión y el tratamiento con antidepresivos ...	14
1.6.1 Alteraciones morfológicas asociadas al hipocampo	17
1.7 Mecanismos moleculares de remodelamiento de espinas dendríticas	19
1.7.1 Rol de las GTPasas de la familia Rho en el citoesqueleto de actina y su relación con la formación y estabilidad de espinas dendríticas.....	20
1.8 Regulación de la traducción local en el remodelamiento de espinas dendríticas.....	24
1.8.1 Rol de los miRNAs en la traducción local.....	24
1.8.2 Relación entre estrés, acción de los antidepresivos y niveles de miRNAs	28
2) HIPÓTESIS	32
3) OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo general.....	32
3.2 Objetivos específicos	32
4) MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1 Animales	33
4.2 Modelo de estrés	33
4.3 Tratamientos farmacológicos y diseño experimental.....	33
4.4 Obtención de tejido.....	35
4.5 Determinación de niveles de corticosterona sérica	35
4.6 Tinción Golgi.....	36
4.7 Captura de imágenes y análisis morfológico	37
4.8 Homogeneización de muestras para determinación de proteínas, mRNAs y miRNAs	39
4.9 Western blot.....	39
4.10 Obtención de RNA.....	42
4.11 RT-qPCR de mRNAs.....	42
4.12 RT-qPCR de miRNAs.....	43
4.13 Análisis estadístico.....	44

5) RESULTADOS	45
5.1 Marcadores de estrés: modulación por Sertralina y Fasudil	45
5.1.1 Ganancia de peso corporal	45
5.1.2 Masa de glándulas adrenales y niveles de corticosterona sérica	48
5.1.3 Número de heces producidas durante el protocolo de estrés	49
5.1.4 Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre los niveles de transcritos de genes de activación temprana	50
5.2 Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la activación de la vía de sobrevida ERK-CREB-BCL-2 y los miRNAs que potencialmente regulan estas proteínas.....	52
5.2.1 Evaluación de los niveles de ERK2 y P-ERK2.....	52
5.2.2 Evaluación de los niveles de CREB y P-CREB.....	55
5.2.2.1 Evaluación de los niveles del transcrito de CREB.....	57
5.2.2.2 Evaluación de los niveles de miRNAs que regulan potencialmente a CREB: miR-134 y miR-485	58
5.2.3 Evaluación de los niveles del transcrito de BCL-2	59
5.2.4 Evaluación de los niveles de BCL-2.....	60
5.2.4.1. Evaluación de los niveles del miR-16.....	61
5.3 Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la densidad y morfología de espinas dendríticas hipocampales	62
5.4 Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre los niveles de proteínas relacionadas a remodelamiento de espinas dendríticas y los miRNAs que potencialmente las regulan	65
5.4.1 Evaluación de los niveles de LIMK Y P-LIMK	66
5.4.2 Evaluación de los niveles de RHOA.....	68
5.4.3 Evaluación de los niveles de APT-1	69
5.4.3.1 Evaluación de los niveles del miR-138.....	70
5.5 Determinación los blancos y las vías transduccionales potencialmente asociadas al miR-138..	72
5.6 Resumen de los resultados obtenidos.....	76
6) DISCUSIÓN.....	79
6.1 Modelo de estrés como herramienta para evaluar acción de fármacos antidepresivos	80
6.2 Marcadores de estrés.....	83
6.3 Fasudil muestra acciones sobre proteínas asociadas a la vía de sobrevida celular ERK-CREB-BCL-2 en un perfil similar a Sertralina.....	90
6.3.1 Sertralina y Fasudil ejerce acciones similares en la vía ERK-CREB	90
6.3.2 Niveles de los miRNAs reguladores potenciales de CREB.....	93
6.3.3 Sertralina y Fasudil incrementan de forma similar los niveles de la proteína o el transcrito de BCL-2, efecto que depende del estado fisiológico del animal.	94
6.4 Sertralina, a diferencia de Fasudil, disminuye los niveles de miR-16 en el hipocampo, los que se relacionan con los niveles de su blanco BCL-2	95
6.5 Sertralina y Fasudil previenen la disminución en la densidad de espinas dendríticas promovida por el estrés	97
6.5.1 Sertralina y Fasudil parecen afectar diferencialmente la morfología de espinas dendríticas	100
6.6 Los efectos del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la densidad dendrítica no se explican por cambios en los niveles de las proteínas de adhesión celular	101
6.7 Sertralina muestra un efecto similar al estrés sobre la masa de la proteína RHOA.....	103

6.8 Los efectos del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la densidad dendrítica no se explican por cambios en los niveles de las proteínas de remodelamiento de espinas dendríticas APT-1 y LIMK1	104
6.9 El estrés incrementa los niveles del miR-138, efecto que es prevenido de forma total y parcial por Sertralina y Fasudil, respectivamente	105
6.10 El miR-138 se relaciona con vías y blancos relacionados a remodelamiento de espinas dendríticas	108
6.11 Consideraciones finales	110
7) CONCLUSIONES	114
8) LIMITACIONES Y PROYECCIONES	116
9) ANEXOS	117
9.1 ANEXO 1: Pruebas conductuales	117
9.1.1 Prueba de Natación Forzada	117
9.1.2 Prueba de condicionamiento por evitación activa.....	120
9.2 ANEXO 2: Determinación de la secuencia del adaptador universal empleado en la evaluación de los niveles de miRNAs	123
9.3 ANEXO 3: Evaluación de las proteínas de adhesión celular NCAM, N-CADHERINA y β -CATENINA	125
10) BIBLIOGRAFÍA	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de señalización relacionadas a la acción de los antidepresivos.....	13
Figura 2. Distribución de receptores serotoninérgicos sobre el circuito trisináptico hipocampal. ...	15
Figura 3. Estructura química de la Sertralina.....	16
Figura 4. Espinas dendríticas.....	18
Figura 5. Componentes moleculares del remodelamiento de espinas dendríticas.....	21
Figura 6. Estructura química de Fasudil.....	23
Figura 7. Síntesis de miRNAs.....	25
Figura 8. Esquema propuesto: Relación entre miRNAs y proteínas asociadas a remodelamiento de espinas dendríticas.....	31
Figura 9. Diseño experimental.....	34
Figura 10. Metodología del análisis morfológico.....	38
Figura 11. Homogeneización de hipocampos para la obtención de RNA y proteínas.....	40
Figura 12. Ganancia de peso corporal.....	47
Figura 13. Masa glándulas adrenales.....	48
Figura 14. Determinación del número de heces durante el estrés.....	50
Figura 15. Evaluación de la activación de genes de activación temprana.....	51
Figura 16. Determinación de los niveles de ERK2 y P-ERK2.....	54
Figura 17. Determinación de los niveles de CREB Y P-CREB.....	56
Figura 18. Evaluación de los niveles del transcrito de CREB.....	57
Figura 19. Determinación de los niveles de miR-134 y miR-485.....	58
Figura 20. Evaluación de los niveles del transcrito de BCL-2.....	59
Figura 21. Determinación de los niveles de BCL-2.....	60
Figura 22. Determinación de los niveles del miR-16.....	61
Figura 23. Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la densidad de espinas dendríticas.....	63
Figura 24. Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la morfología de espinas dendríticas.....	64
Figura 25. Determinación de los niveles de LIMK Y P-LIMK.....	67
Figura 26. Determinación de los niveles de RHOA.....	68
Figura 27. Determinación de los niveles de APT-1.....	69
Figura 28. Determinación de los niveles de miR-138.....	70
Figura 29. Determinación de los niveles del transcrito de APT-1.....	71
Figura 30. Vías de transducción de señales relacionadas a los blancos potenciales del miR-138 según el <i>software</i> INGENUITY®.....	74
Figura 31. Blancos de miR-138 en las vías de señalización asociadas a proteínas de la familia Rho.....	75
Figura 32. Modelo de la participación de miR-16 inducida por Fluoxetina en el cerebro.....	96
Figura 33. Esquema gráfico de las conclusiones.....	115
Figura suplementaria 1. Efecto Sertralina y Fasudil en la prueba del nado forzado.....	118
Figura suplementaria 2. Efecto de Sertralina y Fasudil en la prueba de condicionamiento por evitación activa.....	122
Figura suplementaria 3. Metodología utilizada en la evaluación de niveles de miRNAs y secuencia del adaptador universal.....	124
Figura suplementaria 4. Determinación de los niveles de NCAM.....	126
Figura suplementaria 5. Determinación de los niveles de N-CADHERINA.....	127
Figura suplementaria 6. Determinación de los niveles de β -CATENINA.....	127

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Sintomatología diagnóstica de Depresión de acuerdo al DSM-5	2
Tabla 2: Perfil comparativo del estrés por restricción de movimiento como modelo de depresión ...	4
Tabla 3: Antidepresivos disponibles y sus mecanismos de acción inmediatos	7
Tabla 4: Parámetros farmacocinéticos de la Sertralina	16
Tabla 5: Parámetros farmacocinéticos de Fasudil.....	23
Tabla 6. Anticuerpos y condiciones utilizadas en la evaluación de niveles de proteínas	41
Tabla 7. Partidores utilizados en la evaluación de mRNAs y miRNAs.....	44
Tabla 8. Niveles de corticosterona sérica.....	49
Tabla 9. Blancos del miR-138 experimentalmente descritos según el <i>software</i> INGENUITY®	73
Tabla 10. Funciones de los blancos potenciales de miR-138 en las diferentes redes de señalización asociadas	74
Tabla 11. Resumen de resultados obtenidos	78

ABREVIATURAS

3'UTR	: Región no traducida en la región 3'
5-HT	: Serotonina
BDNF	: Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	: Albúmina de suero bovino
CA1	: Cuerno de ammon 1 (área del hipocampo)
CA3	: Cuerno de ammon 3 (área del hipocampo)
cDNA	: DNA (ácido desoxirribonucleico) complementario
DA	: Dopamina
DEPC	: Dietilpirocarbonato
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	: Error estándar medio
EGTA	: Etilenglicol del ácido tetraacético
ERK	: Quinasa activada de forma extracelular
GTP	: Guanosín trifosfato
HHA	: Hipotálamo-hipófisis-adrenal
IMAO	: Inhibidor de la monoamino oxidasa
IRDN	: Inhibidor de la recaptura de dopamina y noradrenalina
ISRN	: Inhibidor selectivo de la recaptura de noradrenalina
ISRS	: Inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina
miRNA	: micro RNA (ácido ribonucleico)
MLC	: Cadena liviana de miosina
MLCP	: Fosfatasa de la cadena liviana de miosina
mRNA	: RNA (ácido ribonucleico) mensajero
NA	: Noradrenalina
NMDA	: N-metil-D-aspartato
PBS	: Tampón fosfato salino
PBST	: Tampón fosfato salino + tween
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PSD	: Densidad postsináptica
PSD95	: Proteína de la densidad postsináptica 95
PVDF	: Difluoruro de polivinilideno
qPCR	: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
ROCK	: Quinasa activada por Rho
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
SLC6A4	: Transportador de serotonina
TBS	: Salino tamponado con tris
TBST	: Salino tamponado con tris + tween

RESUMEN

La depresión es un trastorno psiquiátrico muy prevalente en Chile y el mundo. Sus bases moleculares son prácticamente desconocidas, por lo que los tratamientos farmacológicos no han logrado ser del todo efectivos. En la actualidad los antidepresivos disponibles ejercen sus efectos luego de una administración prolongada, muchas veces de semanas a meses. Esto sugiere que los aumentos en la neurotransmisión noradrenérgica y serotoninérgica mediada por los fármacos antidepresivos no estarían explicando por sí mismo la mejoría clínica. Se describe a la depresión usualmente como una patología asociada al estrés y existe bastante evidencia que posiciona al estrés como el factor no genético más importante en el inicio y desarrollo de esta patología. El estrés modifica la densidad y morfología dendrítica de las neuronas piramidales del hipocampo, disminuye la neurogénesis y la sobrevivencia neuronal, por lo que corresponde a un aspecto importante que logra emular parte de los cambios observados en cerebros de sujetos depresivos. En la teoría actual de la etiología de la depresión se propone que las vías transduccionales asociadas a sobrevivencia, como la vía ERK-CREB-BCL-2 cumplen un rol activo. Por otro lado, se encuentra extensamente reportado que el estrés crónico produce una reducción en la arborización neuronal y en la densidad de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo, la cual es prevenida por gran parte de los antidepresivos actuales. Desde el punto de vista molecular, las GTPasas de la familia Rho son capaces de comandar la dinámica del citoesqueleto de actina, el que determina la forma y la estabilidad de las espinas dendríticas. La señalización de RHOA antagoniza la formación y mantención de espinas dendríticas a través de su efector ROCK (del inglés, *Rho associated coiled coil kinase*). Actualmente se encuentra aceptado que este tipo de plasticidad estructural involucra procesos de traducción localizada de mRNAs en las espinas dendríticas. Proceso que puede ser regulado mediante la participación de microRNAs (miRNAs), los que corresponden a pequeñas moléculas que son capaces de reprimir traduccionalmente a sus transcritos blancos regulando activamente importantes procesos como los de remodelamiento de espinas dendríticas y sobrevivencia celular, entre otros. Más aún, la depresión, el estrés y los antidepresivos han mostrado promover cambios en el patrón de expresión de los miRNAs.

Fasudil corresponde a un potente inhibidor de ROCK que ha mostrado acciones tipo antidepresivas en pruebas conductuales que determinan la eficacia antidepresiva. Tomando en cuenta el rol que cumple Fasudil en la señalización de vías críticas del remodelamiento de espinas dendríticas y a sus acciones tipo antidepresivas determinadas en pruebas conductuales realizadas en nuestro laboratorio, se propuso que este fármaco, al igual que el antidepresivo Sertralina, es capaz de activar la vía de sobrevivencia ERK-CREB-BCL-2 y prevenir los efectos deletéreos del estrés sobre la densidad y morfología de espinas dendríticas hipocámpales a través de cambios en los niveles de proteínas relacionadas a remodelamiento de espinas dendríticas. Los efectos mencionados estarían relacionados a cambios en los niveles de miRNAs que tienen como blancos a algunas de estas proteínas, por lo que se planteó la siguiente hipótesis:

“El inhibidor de ROCK Fasudil, al igual que el antidepresivo Sertralina, activa la vía de sobrevivencia ERK-CREB-BCL-2 y previene los efectos del estrés sobre la densidad de espinas dendríticas hipocámpales, lo que se relaciona con el cambio en los niveles de proteínas y miRNAs asociados a remodelamiento de espinas dendríticas”

Con el objetivo de confirmar esta hipótesis, ratas Sprague Dawley macho fueron sometidas a un protocolo de estrés crónico (14 días consecutivos) por restricción de movimiento y se les administró Fasudil o Sertralina de forma intraperitoneal previo al protocolo de estrés. Adicionalmente se les administraron los fármacos a animales sin estresar para determinar el efecto de estas moléculas en diferentes contextos fisiológicos. Un día posterior a la última sesión de estrés o de administración de fármacos, los animales fueron eutanasiados, se les disecó el hipocampo y se determinó la densidad de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo, al igual que los niveles de proteínas, mRNAs y miRNAs de las vías transduccionales de sobrevida y remodelamiento de espinas dendríticas.

Los resultados de esta tesis permitieron determinar que Fasudil activa la vía de sobrevida CREB-BCL-2 de forma independiente a ERK. Esta activación se observó solamente en un contexto de estrés, por lo que queda de manifiesto la importancia del estado fisiológico del animal en la regulación de cascadas transduccionales, y más aún la similitud de Fasudil con Sertralina desde este punto de vista molecular. Fasudil además fue capaz de prevenir la disminución en la densidad de espinas dendríticas promovida por el estrés en el área CA1 del hipocampo. Este efecto preventivo en la disminución de espinas dendríticas ejercido por Fasudil, refuerza la relación de los efectos de este fármaco con la prevención de conductas tipo depresivas y además sugiere la participación de ROCK, en la modificación de espinas dendríticas. Aún, cuando existió una similitud de ambos fármacos, en la prevención de la disminución de espinas dendríticas, se observó una diferencia en cuanto a su morfología. Los resultados mostraron que en el caso de Sertralina, las espinas inmaduras no explican la prevención del efecto del estrés por si solas, existiendo una tendencia que, si bien no es estadísticamente significativa, sugiere que este fármaco estaría aumentando además la cantidad de las espinas tipo callampa o maduras. Por otra parte, Fasudil ejerce su acción fundamentalmente en las espinas inmaduras, de forma similar a la acción que ejerce otro inhibidor de ROCK, como Y-27632 en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los niveles de las proteínas asociadas a remodelamiento de espinas dendríticas evaluadas en homogeneizados de hipocampo. Sin embargo, los niveles de estas proteínas, que se relacionan con procesos de adhesión celular (NCAM, N-CADHERINA Y β -CATENINA) y a la señalización de GTPasas de la familia Rho (RHOA, APT-1 y LIMK) podrían estar variando específicamente en subpoblaciones localizadas en la espina dendrítica. Se evaluaron además los niveles de ciertos miRNAs cuyos blancos corresponden a proteínas asociadas a remodelamiento de espinas dendríticas. Se determinó que el estrés promovió un aumento en los niveles del miR-138, y que este aumento fue prevenido de forma parcial por Fasudil y total en caso de Sertralina. Si bien en este trabajo los niveles de miR-138 no se relacionaron a los de su blanco descrito APT-1, el análisis *in silico* de sus blancos potenciales y vías de señalización en las cuales podría estar implicado este miRNA, indicó una relación altamente probable con el remodelamiento de espinas dendríticas.

A la luz de los resultados obtenidos en esta tesis, Fasudil, un fármaco cuyo mecanismo de acción dista bastante de los ejercidos por los antidepresivos conocidos, es capaz de producir acciones similares a Sertralina, tanto en un contexto morfológico, como molecular en el hipocampo. Estos efectos podrían ser atribuidos al cambio en los niveles de miRNAs implicados en el remodelamiento de espinas dendríticas, abriendo la posibilidad de explorar nuevos puntos de convergencia que sean capaces de explicar las acciones antidepresivas per se.

SUMMARY

Depression is a very prevalent psychiatric disorder in Chile and the world. Their molecular bases are practically unknown, so the pharmacological treatments have not been able to be completely effective. Currently available antidepressants exert their effects after prolonged administration, often from weeks to months. This suggests that increases in noradrenergic and serotonergic neurotransmission mediated by antidepressant drugs would not be self-explanatory of clinical improvement. Depression is usually described as a pathology associated to stress and there is enough evidence that positions stress as the most important non-genetic factor in the onset and development of this pathology. Stress modifies the dendritic density and morphology of pyramidal neurons of the hippocampus, decreases neurogenesis and neuronal survival, so it corresponds to an important aspect that manages to emulate part of the observed changes in brains of depressive subjects. In the current theory of the etiology of depression it is proposed that transductional pathways associated with survival, such as the ERK-CREB-BCL-2 pathway, play an active role. On the other hand, it is widely reported that chronic stress produces a reduction in neuronal arborization and density of dendritic spines in the hippocampus CA1 area, which is prevented by the current antidepressants. From the molecular point of view, GTPases of the Rho family are able to control the dynamics of the actin cytoskeleton, which determines the shape and stability of dendritic spines. RHOA signaling antagonizes the formation and maintenance of dendritic spines through its effector ROCK. It is currently accepted that this type of structural plasticity involves localized translation processes of mRNAs in the dendritic spines. This process can be regulated by the participation of microRNAs (miRNAs), which correspond to small molecules that are able to repress their white transcripts by actively regulating important processes such as dendritic spine remodeling and cell survival, among others. Moreover, depression, stress and antidepressants have been shown to promote changes in the expression pattern of miRNAs.

Fasudil is a potent ROCK inhibitor that has shown antidepressant-like actions in behavioral tests that determine antidepressant efficacy. Considering the role played by Fasudil in the signaling of critical pathways of dendritic spine remodeling and its antidepressant-like actions determined in behavioral tests performed in our laboratory, it was proposed that this drug, like the antidepressant Sertraline, is able to activate The ERK-CREB-BCL-2 survival pathway and to prevent the deleterious effects of stress on the density and morphology of hippocampal dendritic spines through changes in the levels of proteins related to dendritic spine remodeling. The effects mentioned would be related to changes in the levels of miRNAs that target some of these proteins, so the following hypothesis was proposed:

"The Fasudil ROCK inhibitor, like the antidepressant Sertraline, activates the ERK-CREB-BCL-2 survival pathway and prevents the effects of stress on the density of hippocampal dendritic spines, which is related to the change in levels of miRNAs and proteins associated with remodeling of dendritic spines "

In order to confirm this hypothesis, male Sprague Dawley rats were subjected to a chronic stress protocol (14 consecutive days) by movement restriction and were administered Fasudil or Sertraline intraperitoneally prior to the stress protocol. In addition, the drugs were administered to animals without stress to determine the effect of these molecules in different physiological contexts. One day after the last stress or drug administration session, the animals were euthanized, the hippocampus was dissected and the density of dendritic spines was determined in the CA1 area of the hippocampus, as were the levels of proteins, mRNAs, and miRNAs of the transductional pathways for survival and remodeling of dendritic spines.

The results of this thesis allowed to determine that Fasudil activates the survival pathway CREB-BCL-2 independently to ERK. This activation was only observed in a stress context, thus revealing the importance of the physiological state of the animal in the regulation of transductional pathways, and even more the similarity of Fasudil with Sertraline from this molecular point of view. Fasudil was also able to prevent the decrease in density of dendritic spines promoted by stress in the CA1 area of the hippocampus. This preventive effect in the reduction of dendritic spines exerted by Fasudil reinforces the relationship of the effects of this drug with the prevention of depressive type behaviors and also suggests the participation of ROCK in the modification of dendritic spines. Even when there was a similarity of both drugs, in the prevention of the decrease of dendritic spines, a difference in their morphology was observed. The results showed that in the case of Sertraline, immature spines do not explain the prevention of the effect of stress alone, although there is a tendency that, although not statistically significant, suggests that this drug would also increase the amount of the mushroom spines (mature spines). On the other hand, Fasudil exerts its action primarily on immature spines, similar to the action of another ROCK inhibitor, such as Y-27632 in primary cultures of hippocampal neurons. The results showed no significant differences in the levels of the proteins associated with remodeling of dendritic spines evaluated in hippocampal homogenates. However, the levels of these proteins, which are related to cell adhesion processes (NCAM, N-CADHERIN and β -CATENIN) and Rho GTPase signaling (RHOA, APT-1 and LIMK) may be specifically varying in subpopulations located in the dendritic spine. The levels of certain miRNAs whose targets correspond to proteins associated with remodeling of dendritic spines were also evaluated. It was determined that stress promoted an increase in miR-138 levels, and that this increase was partially prevented by Fasudil and totally in case of Sertraline. Although in this work the miR-138 levels were not related to those of its target APT-1 described, the *in silico* analysis of its potential targets and signaling pathways in which this miRNA might be involved indicated a highly probable relation with the remodeling of dendritic spines.

In light of the results obtained in this thesis, Fasudil, a drug whose mechanism of action is quite different from that of known antidepressants, is capable of producing actions similar to Sertraline, both in a morphological and molecular context in the hippocampus. These effects could be attributed to the change in the levels of miRNAs involved in the remodeling of dendritic spines, opening the possibility of exploring new points of convergence that are able to explain the antidepressive actions *per se*.

1. INTRODUCCIÓN

La depresión mayor corresponde a un trastorno del ánimo que el paciente no puede superar de forma voluntaria y que afecta su calidad de vida y la de quienes lo rodean (American Psychiatric Association, 2013). Es definida operacionalmente por el Ministerio de Salud de Chile como una alteración patológica del estado de ánimo, caracterizada por un descenso de éste, que termina en tristeza. Puede manifestarse en cualquier etapa de la vida, con uno o varios episodios, que pueden ser recurrentes.

1.1 Sintomatología y criterios diagnósticos de la depresión mayor

La depresión se diagnostica de acuerdo a los criterios del Manual Estadístico y Diagnóstico de Enfermedades Mentales (DSM-5, del inglés *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, quinta edición), que elabora la Asociación Americana de Psiquiatría (APA, del inglés *American Psychiatric Association*) (American Psychiatric Association, 2013). El criterio diagnóstico se basa en la presencia de síntomas específicos durante al menos dos semanas (Tabla 1). Adicionalmente existe otro instrumento diagnóstico, aunque menos utilizado, elaborado por la organización mundial de la salud incluido en el manual de Clasificación Internacional para Enfermedades y Desórdenes Relacionados (ICD-10, del inglés *International Classification for Diseases and Related Disorders*). En este instrumento se diagnostica la patología depresiva con menor número de síntomas, a diferencia del DSM, disminuyendo el umbral de diagnóstico (Richards, 2011).

Tabla 1: Sintomatología diagnóstica de Depresión de acuerdo al DSM-5

1	Estado de ánimo depresivo la mayor parte del día, casi todos los días
2	Marcada disminución del interés por todas o casi todas las actividades placenteras
3	Pérdida significativa de peso sin estar a dieta o aumento significativo de peso
4	Insomnio o hipersomnias casi todos los días
5	Agitación o retrasos psicomotores casi todos los días
6	Fatiga o pérdida de energía casi todos los días
7	Sentimientos de desvalorización o de culpa excesiva inapropiados (que pueden ser delirantes)
8	Menor capacidad de pensar o concentrarse, o indecisión casi todos los días
9	Pensamientos recurrentes de muerte (no sólo temor de morir), ideación suicida recurrente

El diagnóstico de la depresión mayor considera la presencia de cinco o más de los síntomas durante un período de dos semanas y que representen un cambio respecto del funcionamiento previo. Al menos uno de los siguientes síntomas debe estar presente: (1) Estado de ánimo depresivo o (2) Disminución del interés por todas o casi todas las actividades placenteras. Fuente, DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013).

1.2 Epidemiología de la depresión mayor

La depresión contribuye fuertemente a la carga de enfermedad, ocupando el tercer lugar a nivel mundial, el octavo lugar en los países de ingresos altos y el primer lugar en los países de ingresos bajos y medios (Richards, 2011). Se estima en el mundo que existen 350 millones de personas afectadas por esta patología, y en Chile la prevalencia se encuentra entre las más altas. La Encuesta Nacional de Salud (ENS 2011) (Ministerio de Salud, 2011) estableció que, para personas de 15 años y más, la prevalencia de sintomatología depresiva en el último año fue de 17,2%, llegando a un 25,7% entre las mujeres. De hecho, el mayor gasto en licencias médicas se produce por causas referidas a “trastornos mentales y del comportamiento”. Este tipo de licencias corresponde a un 20,7% del total y de éstas, un 59,3% se deben a episodios depresivos (Ministerio de Salud, 2013).

1.3 Relación entre estrés y predisposición a la depresión mayor

La etiología de la depresión es muy poco conocida, aunque existen antecedentes que indican que existen factores de riesgo genéticos y ambientales que son capaces de gatillar esta patología. Se ha estimado que existe un 40% de riesgo genético de desarrollar una depresión, aunque se reconoce como una patología compleja en la que incurren un sinnúmero de genes que determinan un fenotipo depresivo (Fava and Kendler, 2000). Mientras que los factores no genéticos o ambientales se componen de los eventos traumáticos emocionales y fundamentalmente el estrés (Krishnan and Nestler, 2008).

La depresión se describe usualmente como una patología asociada al estrés y existe bastante evidencia que posiciona al estrés como el factor no genético más importante en su inicio y desarrollo (Nestler et al., 2002). Esta relación ha llevado a la utilización del estrés como la base de la gran mayoría de los modelos animales de depresión (Overstreet, 2012). El estrés crónico inducido por la inmovilización del animal o por restricción de movimiento modifica la morfología dendrítica de las neuronas piramidales del hipocampo, disminuye la neurogénesis y la supervivencia neuronal, replicando de esta forma parte de las alteraciones observadas en cerebros de sujetos depresivos (D'Sa and Duman, 2002). Si bien, el estrés por sí solo no es capaz de reproducir la totalidad de las alteraciones asociadas a la depresión, estos modelos han permitido el estudio de la neurobiología y las bases moleculares de esta patología. En este sentido, el modelo de estrés por restricción de movimiento es capaz de producir alteraciones conductuales, morfológicas y moleculares similares a lo observado en los sujetos depresivos (Bravo et al., 2009, Ulloa et al., 2010, Castaneda et al., 2015) (ver tabla 2).

Tabla 2: Perfil comparativo del estrés por restricción de movimiento como modelo de depresión

	DEPRESIÓN	ESTRÉS (Restricción de movimiento)
SINTOMATOLOGÍA PRINCIPAL	Disminución en actividades placenteras (anhedonia)	✓
	Ánimo deprimido	N/A
SINTOMATOLOGÍA SECUNDARIA	Alteraciones en el peso	✓
	Alteraciones cognitivas	✓
	Pensamiento suicida	N/A
	Sentimiento de culpa	N/A
	Alteración del sueño	✓
HALLAZGOS NEUROANATÓMICOS Y FUNCIONALES EN EL HIPOCAMPO	Disminución en el volumen	✓
	Disminución en la arborización dendrítica	✓
	Disminución en la densidad de espinas dendríticas	✓
	Disminución en neurogénesis	✓
	Aumento de apoptosis y necrosis	✓
RESPUESTA AL TRATAMIENTO	Responden a tratamiento crónico y no agudo con antidepresivos	✓

La tabla muestra aspectos presentes en sujetos con depresión mayor y establece si éstos se replican en el modelo de estrés crónico por restricción de movimiento. Este modelo de estrés es capaz de reproducir una gran cantidad de aspectos de la depresión incluyendo uno de los síntomas principales como es la disminución en actividades placenteras, representado como anhedonia en animales. Las alteraciones asociadas fundamentalmente al comportamiento humano como el ánimo deprimido, no pueden ser evaluadas en animales. N/A (No aplica). Fuente: (Willner, 1997, Duman, 2010, Overstreet, 2012)

1.4 Tratamiento Farmacológico de la depresión

El tratamiento farmacológico de la depresión surgió hace más de 60 años, cuando se descubrió que dos clases de fármacos mostraron eficacia en el tratamiento de esta patología. Estos compuestos eran los antidepresivos tricíclicos y los inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO), los que contribuyeron no solo en disponer herramientas farmacológicas para el tratamiento, sino que a su vez en el conocimiento de las alteraciones neuroquímicas subyacentes a sintomatología depresiva. Con este tipo de fármacos se dio inicio a la investigación farmacológica de la depresión, en función de entender como éstos ejercen sus efectos terapéuticos (Nestler et al., 2002). De esta manera, se identificaron los mecanismos de acción aguda de este tipo de fármacos antidepresivos, uno correspondiente a la inhibición de la recaptura de serotonina o noradrenalina mediada por los antidepresivos tricíclicos y el otro correspondiente a la inhibición de la enzima monoamino oxidasa (la cual cataboliza a los neurotransmisores monoaminérgicos) en el caso de los antidepresivos tipo IMAO, respectivamente (Frazer, 1997, Nestler et al., 2002). Estas acciones farmacológicas convergen en el aumento del tono serotoninérgico y/o noradrenérgico.

Posteriormente surgieron los inhibidores selectivos de la recaptura de noradrenalina (ISRN) y serotonina (ISRS). Estos fármacos son capaces de unirse de forma selectiva y específica al transportador de Noradrenalina o Serotonina, en el caso de los ISRN e ISRS, respectivamente. Esta especificidad en la unión a su receptor permitió disminuir efectos adversos atribuidos a la afinidad de los antidepresivos tricíclicos sobre ciertos receptores histamínicos o colinérgicos (Ferguson, 2001) y contribuyó para que hoy en día los ISRS sean los antidepresivos más utilizados en Chile y el mundo. Aunque es importante considerar que, si bien este tipo de fármacos presenta un perfil de seguridad y efectos adversos mucho mejor que sus predecesores, mantienen un mismo mecanismo de acción común, por lo que su eficacia no ha mejorado sustancialmente. A la fecha existen numerosos fármacos para el tratamiento de la depresión con diferentes mecanismos de acción inmediatos o conocidos. La Tabla 3 resume los antidepresivos actualmente disponibles, dentro de los cuales los ISRS se recomiendan como primera línea de tratamiento farmacológico para la depresión (Ministerio de Salud, 2013).

Por otra parte, el o los mecanismos de acción de este tipo de fármacos, que expliquen la acción antidepresiva *per se*, no se encuentran totalmente dilucidados y parecen ser mucho más complejos de lo que se creía. Es así que tras la administración de inhibidores de la recaptura de serotonina y/o noradrenalina se observa un incremento agudo y rápido en los niveles de las monoaminas; no obstante los efectos terapéuticos se observan luego de varias semanas o meses de tratamiento farmacológico (Frazer, 1997). Esto ha llevado a plantear que adicionalmente participan otros mecanismos que en su conjunto puedan ser los responsables de la acción antidepresiva. El inicio tardío de la acción antidepresiva de los fármacos disponibles hoy en día, incrementa no solo el abandono del tratamiento por parte de los pacientes, al no percibir las mejoras terapéuticas al inicio, sino que además la patología se va haciendo más refractaria al tratamiento. Esto, sumado a la eficacia limitada de los antidepresivos existentes hace necesaria la optimización o redirección de las estrategias farmacológicas para el tratamiento de la depresión.

Tabla 3: Antidepresivos disponibles y sus mecanismos de acción inmediatos

CLASIFICACIÓN	ANTIDEPRESIVO	MECANISMO INMEDIATO
TRICÍCLICOS	AMITRIPTILINA	Inhibidor de la recaptura de NA y 5-HT
	CLOMIPRAMINA	Inhibidor de la recaptura de NA y 5-HT
	DESIPRAMINA	Inhibidor de la recaptura de NA y 5-HT
	DOXEPINA	Inhibidor de la recaptura de NA y 5-HT
	IMIPRAMINA	Inhibidor de la recaptura de NA y 5-HT
	NORTRIPTILINA	Inhibidor de la recaptura de NA y 5-HT
	PROTRIPTILINA	Inhibidor de la recaptura de NA y 5-HT
	TRIMIPRAMINA	Inhibidor de la recaptura de NA y 5-HT
TETRACÍCLICOS	AMOXAPINA	Inhibidor de la recaptura de NA y 5-HT
	MAPROTILINA	Inhibidor de la recaptura de NA y antagonista del receptor H1
	NEFAZODONA	Inhibidor de la recaptura de 5-HT y antagonista de 5-HT _{2A}
	MIRTAZAPINA	Antagonista del receptor NA α_2 y 5-HT _{2A}
	TRAZODONA	Inhibidor de la recaptura de 5-HT y antagonista de 5-HT _{2A}
IMAO	FENELZINA	Inhibidor de la Monoamino oxidasa
	ISOCARBOXAZIDA	Inhibidor de la Monoamino oxidasa
	MOCLOBEMIDA	Inhibidor de la Monoamino oxidasa
	SELEGILINA	Inhibidor de la Monoamino oxidasa
ISRN	MAPROTILINA	Inhibidor selectivo de la recaptura de NA
ISRS	CITALOPRAM	Inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT
	ESCITALOPRAM	Inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT
	FLUOXETINA	Inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT
	FLUVOXAMINA	Inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT
	PAROXETINA	Inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT
	SERTRALINA	Inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT
	VILAZODONA	Inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT
	VORTIOXETINA	Inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT Agonista 5-HT _{1A/1B} ; Antagonista receptores 5-HT _{1D/3/7}
IRSN	DULOXETINA	Inhibidor de la recaptura de NA y 5-HT
	VENLAFAXINA	Inhibidor de la recaptura de NA y 5-HT
IRDN	BUPROPIÓN	Inhibidor de la recaptura de DA y NA
	REBOXETINA	Inhibidor de la recaptura de DA y NA

La tabla muestra las principales clases de antidepresivos existentes y el mecanismo de acción inmediato de los representantes de cada una de las clasificaciones. IMAO: Inhibidor de la monoamino oxidasa, ISRN: Inhibidor selectivo de la recaptura de noradrenalina, ISRS: Inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina, IRSN: Inhibidor de la recaptura de serotonina y noradrenalina, IRDN: Inhibidor de la recaptura de dopamina y noradrenalina, NA: noradrenalina, 5-HT: serotonina, H1: receptor de histamina H1, DA: dopamina.

1.5 Bases moleculares de la Depresión y de la acción de los Antidepresivos

Los primeros fármacos con acción antidepresiva incrementaban el tono serotoninérgico y noradrenérgico, por lo que se propuso que la depresión podría ser producida por una deficiencia de estos neurotransmisores en el espacio sináptico, lo que se denominó hipótesis monoaminérgica de la depresión (Nestler et al., 2002, Castren and Rantamaki, 2010). Aunque las terapias actuales, que siguen estando basadas en un aumento del tono monoaminérgico, poseen una efectividad demostrada, al parecer corresponden al inicio de una consecución de eventos para producir el efecto terapéutico. De esta forma se ha planteado que el alza aguda en las monoaminas en el espacio sináptico producen cambios neuroplásticos secundarios producidos por una “adaptación” ante la cronicidad del aumento del tono monoaminérgico, los que incluirían cambios en la expresión génica y modificaciones a nivel de la síntesis de proteínas las que estarían mediando la plasticidad neuronal (Nestler et al., 2002, Pittenger and Duman, 2008).

1.5.1 Relación con Factores Neurotróficos

Se ha descrito que el estrés por inmovilización en rata reduce los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*) en el hipocampo (Tapia-Arancibia et al., 2004). Por otro lado, la infusión de BDNF en el hipocampo produce acciones antidepresivas en modelos de depresión en ratas (Shirayama et al., 2002). Adicionalmente estudios *post mortem* en cerebros de pacientes tratados con antidepresivos, se observó un aumento de BDNF en el hipocampo (Chen et al., 2001b). La hipótesis neurotrófica de la depresión establece que la sintomatología de esta patología ocurriría por una deficiencia en el soporte neurotrófico, y que una reversión de esta deficiencia, a través de la administración de antidepresivos, sería la responsable de la resolución de los síntomas depresivos (Groves, 2007). De hecho, existen antecedentes en pacientes depresivos, en donde la respuesta clínica al tratamiento con Venlafaxina (antidepresivo dual), se correlaciona con un incremento en los niveles circulantes de BDNF (Rojas et al., 2011). Es así que la hipótesis neurotrófica postula que la restauración de los niveles de BDNF inducida por los antidepresivos juega un rol fundamental y determina la

eficacia de estas terapias (Groves, 2007). Existe evidencia en animales que muestra incrementos en los niveles del transcrito y proteína de BDNF por administración de antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la monoamino oxidasa, ISRS, ISRN, terapia electroconvulsiva y agentes antidepresivos nuevos como la Ketamina (Groves, 2007). No obstante, la teoría neurotrófica no es universalmente aceptada, de acuerdo a un considerable número de estudios en los que los resultados parecen inconsistentes (Groves, 2007). Es así por ejemplo, que ratones *knock out* para BDNF no presentan un fenotipo depresivo, lo que ha llevado a cuestionar esta teoría y sugiere una mayor complejidad de las vías de transducción que determinan la depresión y el efecto antidepresivo (MacQueen et al., 2001, Chourbaji et al., 2004), aunque es igualmente importante destacar que en estos estudios se utilizan animales *knock out* para BDNF en todo el cerebro, no solo en el hipocampo. Una desventaja en el diseño experimental para determinar el rol del BDNF específicamente en el hipocampo y su relación con la depresión.

1.5.2 Rol del factor transcripcional CREB

La proteína de unión al elemento de respuesta al adenosín mono fosfato cíclico (CREB, del inglés *cyclic adenosine monophosphate response element binding protein*) media las acciones del adenosín mono fosfato cíclico (cAMP, del inglés *cyclic adenosine monophosphate*) a través de su unión a elementos de respuesta a cAMP (CRE, del inglés *cAMP response element*) en la región reguladora de varios genes blancos. La función de CREB está regulada predominantemente por su estado de fosforilación en Ser133, la que resulta en la activación transcripcional de los genes con sitios CRE (Takahashi et al., 1999). La cascada transduccional cAMP-CREB está afectada en la depresión, lo que apoya la hipótesis de que los antidepresivos pueden estar mediando sus acciones a través de la activación de las vías en las que participa CREB (Krishnan and Nestler, 2008). De acuerdo a esto, la regulación de la transcripción de ciertos genes podría mediar los efectos antidepresivos. La terapia electroconvulsiva y la administración de antidepresivos como la Sertralina ha mostrado incrementar los niveles del transcrito y la proteína de CREB en el hipocampo (Duman et al., 2000).

CREB puede ser activado a través de fosforilación en ser 133 por diversas cascadas de señalización (Lonze and Ginty, 2002). Es así que es activado por la activación de receptores noradrenérgicos, serotoninérgicos, glutamatérgicos y por aquellos receptores con actividad tirosina quinasa (Trk) (ver Figura 1). Esto podría explicar de qué manera los antidepresivos ejercen sus efectos sobre CREB siendo quizás un punto convergente en la integración de respuestas desde diversas cascadas transduccionales gatilladas por diferentes clases de antidepresivos (D'Sa and Duman, 2002). La proteína quinasa A (PKA), la quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK) y la quinasa regulada extracelularmente (ERK) son algunas de las quinasas que se encuentran río arriba de CREB y pueden mediar su activación a través de la fosforilación en Ser 133 (Montminy, 1997). La activación de CREB es capaz de regular transcripcionalmente una gran cantidad de genes blanco, dentro de los cuales se encuentra c-Fos e incluso BDNF, considerando que el promotor de esta neurotrofina contiene un sitio CRE (Groves, 2007). Apoyando lo anterior, se encuentra la evidencia de que la administración crónica de antidepresivos activa la cascada transduccional que lleva a la activación de CREB (fosforilación en Ser133), incrementando a su vez la transcripción del BDNF (Nibuya et al., 1996, Groves, 2007). Este incremento en la fosforilación de CREB también es ejercida por otros fármacos con acción antidepresiva cuyo mecanismo de acción no se basa en el aumento del tono monoaminérgico, como Rolipram (Monti et al., 2006). Lo que estaría indicando un rol convergente de esta proteína en la acción antidepresiva.

La sobreexpresión de CREB produce efectos antidepresivos en pruebas conductuales que son utilizadas para predecir la eficacia antidepresiva (Chen et al., 2001a), sin embargo, su implicancia no se encuentra totalmente probada, e incluso existen reportes que resultan inconsistentes con un eventual rol crítico de CREB en la depresión y el efecto antidepresivo. En relación a esto, algunos estudios sugieren que ciertos antidepresivos no requerirían la participación de CREB, dejando en entredicho la importancia de este factor transcripcional en el mecanismo utilizado por estos fármacos (Conti et al., 2002, Slattery et al., 2004).

1.5.3 Neuroplasticidad, Neurogénesis y vías de sobrevida

Existe evidencia en la literatura que relaciona al estrés, la depresión y la acción antidepressiva con las vías relacionadas a la sobrevida celular, neurogénesis y la neuroplasticidad (Czeh et al., 2001, D'Sa and Duman, 2002, Castren, 2004). Una gran cantidad de antidepressivos, aunque no todos, inducen la neurogénesis en el hipocampo (Pittenger and Duman, 2008). Este proceso consiste en la división mitótica de los progenitores neurales presentes en la zona subgranular del hipocampo, las que luego de migrar al estrato maduro en el giro dentado se diferencian a neuronas (Sahay and Hen, 2007, Pittenger and Duman, 2008). El bloqueo de la neurogénesis hipocampal inhibe el efecto terapéutico de la mayoría de los antidepressivos en modelos animales (Sahay and Hen, 2007), mientras que la administración crónica de antidepressivos, como la Fluoxetina, incrementa el número de células nuevas en la capa granular del giro dentado (Malberg et al., 2000). Algunos autores sugieren incluso que la atrofia del hipocampo y la disminución en los niveles de neurotrofinas observada por el estrés crónico y la depresión (antecedentes para formular la hipótesis neurotrófica), podrían estar ligados por la neurogénesis (Pittenger and Duman, 2008). Esto surge de acuerdo a que los factores neurotróficos como BDNF, regulan el crecimiento de las neuronas y su diferenciación, pero además son potentes reguladores de la neurogénesis y sobrevida en neuronas adultas (Altar, 1999). La activación de CREB también ha mostrado promover la neurogénesis, mientras que el bloqueo de la función de esta proteína disminuye este proceso (Nakagawa et al., 2002).

Existen antecedentes que indican que la apoptosis o muerte celular programada podría estar presente en la depresión. Estudios *post mortem* de sujetos depresivos revelaron la ocurrencia de apoptosis en el giro dentado y CA1 del hipocampo (Lucassen et al., 2001). Además de la activación de cascadas necróticas y apoptóticas, los estresores disminuyen la expresión de factores neurotróficos en el cerebro (Smith et al., 1995), los cuales son esenciales para la sobrevida de neuronas adultas (Pittenger and Duman, 2008). Por otro lado, ha cobrado importancia en este sentido, la participación de la familia de proteínas BCL-2, la que se compone por una docena de proteínas que tienen funciones pro (BAX, BAD) y antiapoptóticas (BCL-2 y BCL-xL), regulando de forma importante este proceso de muerte

celular programada (Youle and Strasser, 2008). El gen del BCL-2 es activado por CREB (Finkbeiner, 2000). La expresión de la proteína antiapoptótica BCL-2 puede ser modulada por antidepresivos y por cambios en los niveles de glucocorticoides (Xu et al., 2003). Esto posiciona a esta proteína como un actor importante en la relación de la sobrevida celular, la depresión y el efecto de los antidepresivos. Los antidepresivos activan la cascada de las MAPK (del inglés, *Mitogen-activated protein kinases*) resultando en la fosforilación de la proteína pro-apoptótica BAD, inhibiendo la apoptosis mediada por esta proteína, y por otro lado fosforilando al factor transcripcional CREB, lo que promueve su activación y posterior aumento en la transcripción de BCL-2 (D'Sa and Duman, 2002). De esta forma, la activación de MAPK induce una potente señalización de sobrevida celular. Algunas investigaciones indican que la administración crónica de antidepresivos incrementa los niveles de BDNF y que al unirse a sus receptores Trk, activan a las MAPKs (Castren, 2004). Este evento promovería la sobrevida por el aumento en los niveles de BCL-2. La Figura 1 resume las vías de transducción descritas anteriormente.

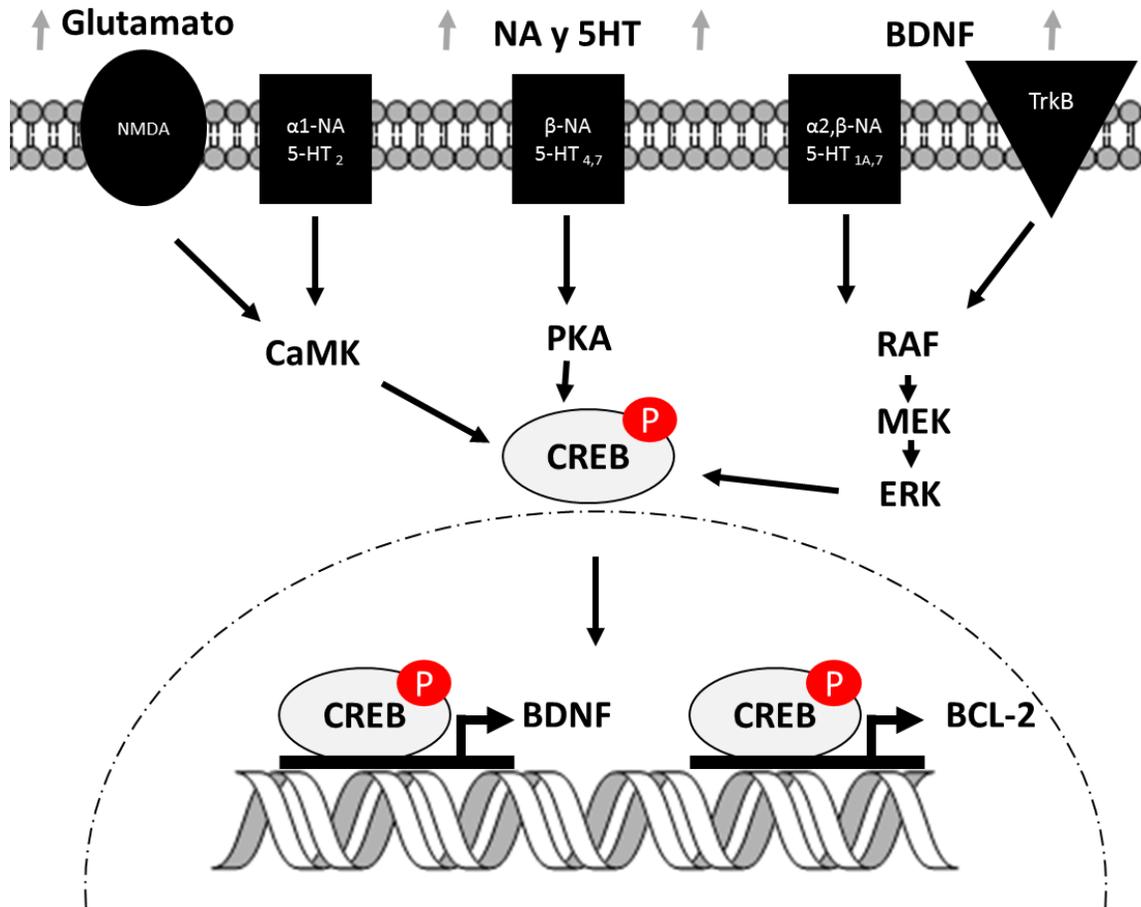


Figura 1. Vías de señalización relacionadas a la acción de los antidepresivos. El esquema muestra parte de las acciones descritas en la acción de los antidepresivos. Estos fármacos son capaces de incrementar los niveles de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y Glutamato en el espacio sináptico, los que a su vez inician cascadas transduccionales a través de sus receptores específicos localizados en la membrana. Estas cascadas de señalización convergen en la activación por fosforilación de la proteína CREB mediante la acción de CaMK, PKA y ERK. CREB activado actúa incrementando la transcripción de BCL-2 y BDNF. Este último es traducido, liberado y a través de la unión a su receptor TrkB, estimula la activación de la cascada de las MAPK potenciando esta señal de plasticidad neuronal y sobrevida.

1.6 Cambios morfológicos asociados al estrés, la depresión y el tratamiento con antidepresivos

Estudios en humanos y animales han demostrado que la depresión y el estrés están asociados a atrofia cerebral y reorganización dendrítica en el hipocampo (Sheline et al., 2003, Cook and Wellman, 2004). Parte importante de las alteraciones en pruebas conductuales de animales sometidos a estrés o a la administración de glucocorticoides pueden ser explicadas mediante cambios morfológicos de las áreas cerebrales que participan en las funciones evaluadas (Qiao et al., 2016). El hipocampo forma parte del sistema límbico y juega un rol importante en diversas funciones principalmente relacionadas con aprendizaje y memoria (Moser and Moser, 1998). Esta área es particularmente sensible al estrés y a la acción de los antidepresivos, por lo que ha sido extensamente estudiado (Dale et al., 2016).

El hipocampo es una estructura bilateral, se localiza bajo la neocorteza y se caracteriza por presentar un circuito trisináptico glutamatérgico. La porción más dorsal está relacionada con la capacidad de aprendizaje, la que ha sido ampliamente caracterizada desde el punto de vista electrofisiológico y morfológico; en cambio, la porción más ventral se relaciona con las respuestas emocionales (Moser and Moser, 1998). El hipocampo está constituido de neuronas piramidales, glías, interneuronas y células granulares que se disponen de forma muy ordenada, permitiendo la identificación de sus áreas más importantes (Moser and Moser, 1998) (Figura 2).

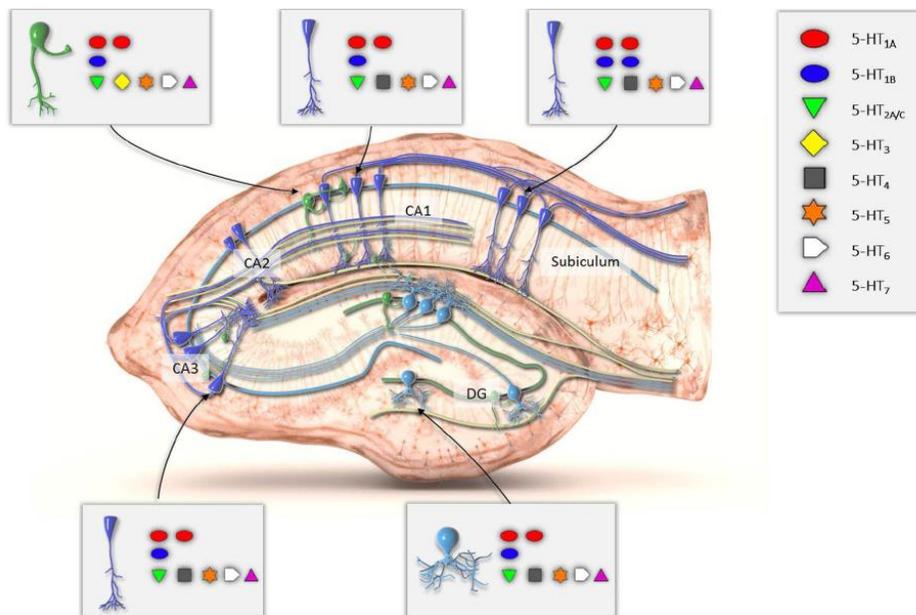


Figura 2. Distribución de receptores serotoninérgicos sobre el circuito trisináptico hipocampal. El hipocampo se subdivide en diferentes zonas: el giro dentado (GD), CA3, CA2, CA1 y el subículo. Las células granulares (celestes) del GD reciben proyecciones desde la corteza entorrinal y envían sus axones al área CA3. Las células piramidales (azules) en el área CA3 proyectan sus axones, conocidos como colaterales de Schaffer, a las áreas CA2 y CA1. Finalmente, las neuronas piramidales del CA1 proyectan sus axones a la corteza entorrinal y al subículo. Las interneuronas (verdes) proveen una regulación de la transmisión glutamatérgica excitatoria del hipocampo mediante la liberación de ácido gamma butírico (GABA). La figura además muestra la abundancia de los diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos expresados en cada una de las células que componen el circuito trisináptico hipocampal. Fuente: (Dale et al., 2016)

La acción de los antidepresivos ISRS en el hipocampo se ha explicado por la presencia de receptores de serotonina en neuronas e interneuronas (ver Figura 2) (Dale et al., 2016). En relación a esto, las fibras serotoninérgicas provenientes del *raphe* hacen sinapsis con neuronas del hipocampo. Más aún, existe evidencia de que algunos receptores de serotonina están presentes en neuronas piramidales que no reciben inervación serotoninérgica directa, lo que sugiere que este neurotransmisor una vez liberado podría difundir y de esa forma ejercer su acción en ciertas zonas del hipocampo (Dale et al., 2016). Estudios realizados en nuestro laboratorio han indicado que la administración crónica de Sertralina, fármaco perteneciente a la familia de los ISRS, previene la anhedonia, ansiedad y la disminución en

el aprendizaje asociativo inducido por el estrés crónico (Ulloa et al., 2010). La Sertralina corresponde a uno de los antidepresivos más prescritos en el mundo y ha demostrado efectividad clínica y un buen perfil de seguridad en el tratamiento de la depresión (DeVane, 1999).

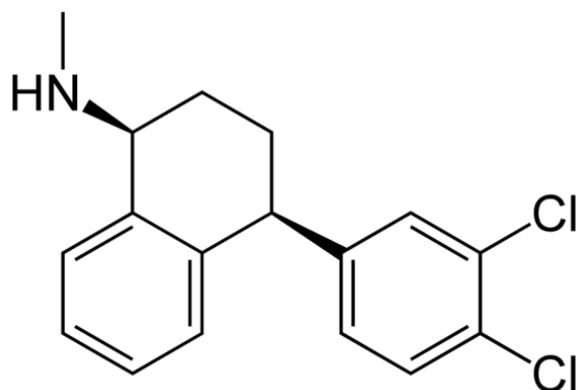


Figura 3. Estructura química de la Sertralina. La figura muestra la representación gráfica del antidepresivo Sertralina, cuyo nombre IUPAC corresponde a (1S-CIS)-4-(3,4-DICLOROFENIL)-1,2,3,4-TETRAHIDRO-N-METIL-1- NAFTALENAMINA.

Tabla 4: Parámetros farmacocinéticos de la Sertralina

Biodisponibilidad	44%
Vida media	26 h
Metabolismo	Hepático (CYP2B6)
Metabolito	Desmetilsertralina, Norsertralina
t máx	6-8 h
Ki	0,15 nM

La tabla muestra parámetros farmacocinéticos del antidepresivo Sertralina obtenidos desde fuentes humanas. La Ki está determinada en relación al transportador de Serotonina.

De acuerdo a su información farmacocinética (Tabla 4), la Sertralina alcanza su concentración máxima en el plasma después de 6-8 horas después de ser administrada por vía oral. Su biodisponibilidad se estima sobre un 44% (Leonard, 1995). La principal vía de metabolización de este fármaco es hepática, a través del sistema del citocromo P-450, obteniéndose el metabolito Desmetilsertralina, la que tiene muy baja actividad farmacológica. En menor proporción ocurre la eliminación por vía renal, mediante un paso intermedio de conjugación con ácido glucurónico (DeVane, 1999). Si bien corresponde a un fármaco bien tolerado, los efectos adversos descritos se relacionan con cefalea, náuseas y disfunciones sexuales masculinas (Waldinger and Olivier, 1998). Finalmente, la principal desventaja de este y otros antidepresivos corresponde al tiempo en que se comienzan a ver los efectos terapéuticos (meses) y su eficacia limitada.

1.6.1 Alteraciones morfológicas asociadas al hipocampo

Desde las dendritas de las neuronas del hipocampo emergen espinas dendríticas, que corresponden a pequeñas protrusiones que hacen sinapsis con axones glutamatérgicos (Figura 4 A). Se encuentra extensamente aceptado que la regulación del número, tamaño y forma de las espinas dendríticas influye directamente en la plasticidad de las sinapsis y en las funciones del hipocampo (Qiao et al., 2016). La mayoría de las espinas dendríticas en un cerebro adulto son estables, aunque existe una población éstas más plásticas, que proveen un compartimiento estructural y bioquímico capaz de sufrir modificaciones morfológicas y funcionales en forma rápida (Licznerski and Duman, 2013). La morfología de las espinas es diversa, siendo las formas: delgada, corta, callampa y filopodios las más representativas (Figura 4 B). Se acepta que las espinas dendríticas de mayor tamaño, como las espinas tipo callampa corresponden a espinas de “memoria”, ya que son capaces de contener una mayor cantidad de señales bioquímicas, mientras que los filopodios son considerados precursores básicos de las espinas (Kasai et al., 2003). La importancia de las espinas dendríticas radica en que numerosas patologías, entre ellas la depresión, se relacionan con alteraciones en la densidad o morfología de éstas (Qiao et al., 2016).

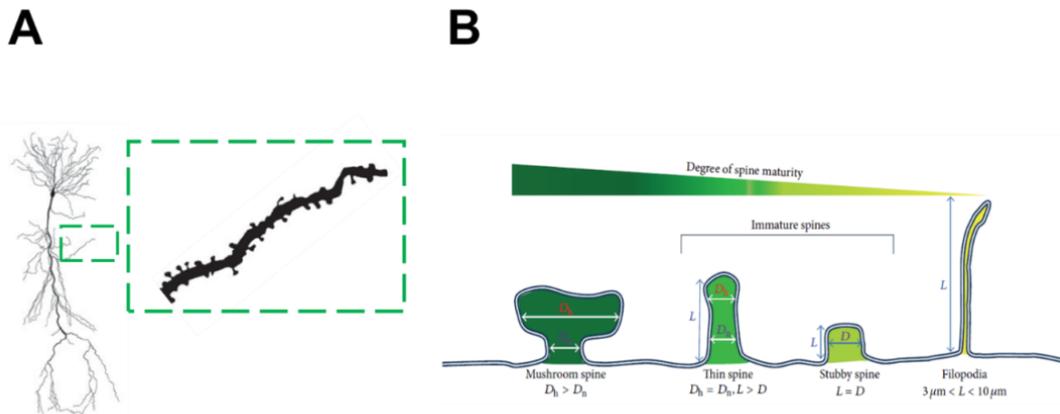


Figura 4. Espinas dendríticas. A) La figura representa una neurona piramidal del área CA1 del hipocampo. El cuadro corresponde a una magnificación de una dendrita en la que se pueden notar las protrusiones, que corresponden a espinas dendríticas. B) Las espinas se categorizan de acuerdo a su forma y tamaño, lo cual está en relación proporcional con la madurez de la espina. Largo de la espina (L), diámetro cabeza de la espina (Dh), diámetro cuello de la espina (Dn). Fuente: (Qiao et al., 2016).

Estudios en humanos y en modelos animales han demostrado una alteración tanto en el árbol dendrítico como en la morfología de las espinas dendríticas en varias enfermedades psiquiátricas incluyendo la depresión mayor (Stockmeier et al., 2004), y otras patologías asociadas al estrés (Licznernski and Duman, 2013). Existen numerosos estudios que apoyan la idea que la atrofia cerebral inducida en estrés crónico puede ser el responsable en parte de las características fenotípicas de la depresión (Pittenger and Duman, 2008). El estrés crónico, como aquel inducido por restricción de movimiento, reduce el aprendizaje asociativo (Bravo et al., 2009, Ulloa et al., 2010) y la densidad de espinas dendríticas de CA1 en las células piramidales del hipocampo de rata (Castaneda et al., 2015). El estrés también produce el remodelamiento de dendritas hipocámpales que resulta en una disminución la longitud y en el número de las dendritas apicales (Kaufman et al., 2000); siendo este último efecto bloqueado por antagonistas del receptor de glutamato tipo NMDA (Magarinos and McEwen, 1995). A pesar de los numerosos antecedentes que existen al respecto, a la fecha no se ha podido precisar si los cambios morfológicos observados en sujetos depresivos y en modelos animales de depresión son causa o consecuencia del estado patológico.

Los procesos de aprendizaje y memoria requieren un remodelamiento de las conexiones neuronales, proceso que incluye cambios en la conectividad. Los antidepresivos también son capaces de generar cambios morfológicos (Hajszan et al., 2005), al revertir la disminución del volumen hipocampal en pacientes depresivos. A su vez, los antidepresivos son capaces de revertir la de atrofia cerebral (Sheline et al., 2003), así como la reducción en la arborización dendrítica y en la densidad de espinas; impactando también en su morfología (Ziv, 2010). De hecho, diversos agentes antidepresivos, como los tricíclicos (Norrholm and Ouimet, 2001, Hajszan et al., 2005, Chen et al., 2010) y los ISRS (Wang et al., 2013) incrementan el número de espinas dendríticas hipocampales en el área CA1, reestableciendo su densidad en parámetros considerados normales o previos al estrés (Moser and Moser, 1998). Los antecedentes existentes demuestran que los cambios en las espinas dendríticas hipocampales son comunes a diferentes estrategias del tratamiento de la depresión. Por un lado, la terapia electroconvulsiva es capaz de producir un aumento en la densidad de espinas dendríticas en CA1 (Chen et al., 2009). Mientras que, por otro lado, la Ketamina revierte la disminución en la densidad de espinas dendríticas ejercida por el estrés crónico, efecto que se correlaciona con efectos tipo antidepresivos en pruebas conductuales (Li et al., 2011).

1.7 Mecanismos moleculares de remodelamiento de espinas dendríticas

La formación y estabilización de las sinapsis requiere de la interacción entre el elemento pre y post-sináptico. Por otro lado, los eventos que determinan la forma, el tamaño y la funcionalidad de las espinas dendríticas están comandados por proteínas que son capaces de remodelar las sinapsis a través de activación de cascadas transduccionales complejas en las que se incluyen las vías de señalización que involucran cambios en el citoesqueleto (Ethell and Pasquale, 2005). El conocimiento de estos procesos y más aún de qué manera se afectan en la depresión y por el tratamiento con antidepresivos, resulta fundamental para comprender los cambios en la arquitectura neuronal y las funciones controladas por el hipocampo.

1.7.1 Rol de las GTPasas de la familia Rho en el citoesqueleto de actina y su relación con la formación y estabilidad de espinas dendríticas.

El citoesqueleto de actina participa activamente y es un componente crucial en el remodelamiento de las conexiones neuronales. Las proteínas que afectan su organización y dinámica pueden alterar la morfología dendrítica, la densidad de espinas y la formación de sinapsis (Luo, 2002). Por lo tanto, es plausible que la alteración morfológica observada luego de la aplicación de estrés crónico y/o antidepresivos pueda ser producida por cambios en las vías transduccionales que afectan la reorganización del esqueleto de actina.

Una clase importante de moléculas de señalización que transducen estímulos extracelulares para regular la dinámica del citoesqueleto de actina corresponde a las GTPasas pequeñas o proteínas G monoméricas. Estas proteínas regulan su actividad GTPasa de acuerdo su activación o inactivación por grupos de proteínas denominadas GEF (inactivadoras, del inglés *Guanine nucleotide exchange factor*) y GAP (activadoras, del inglés *GTPase-activating protein*) (Takai et al., 2001). Estas proteínas y las vías de señalización asociadas juegan un rol importantísimo en la regulación de la morfogénesis y la plasticidad de las espinas dendríticas (Lai and Ip, 2013). La familia de las Rho GTPasas (RAC, RHOA y CDC42), son piezas claves en la regulación de la dinámica de la actina. En cultivos neuronales la presencia de RAC1 constitutivamente activa, promueve la formación de una gran cantidad de espinas delgadas (Nakayama and Luo, 2000). En situaciones de alta actividad sináptica el receptor glutamatérgico del tipo NMDA inicia cascadas transduccionales que son capaces de activar a diferentes CaMK, las cuales a su vez activan a RAC mediante fosforilación de ciertas proteínas GEFs específicas para RAC, como Kalirina-7, TIAM1 y β -PIX (Lai and Ip, 2013). Interesantemente la regulación por CaMK no siempre resulta activante, ya que existe evidencia de la proteína P250GAP, cuya actividad GAP se inhibe al ser fosforilada (Okabe et al., 2003). Una vez activada, RAC promueve el crecimiento de espinas dendríticas a través de la activación de la proteína PAK y LIMK1. Esta última fosforila e inhibe el factor depolimerizante Cofilina, concluyendo esta sucesión de eventos en la polimerización de actina (Bamburg, 1999) (Figura 5). En contraste, RHOA constitutivamente activa induce una reducción en el largo y el número de espinas, efecto que es mediado por la quinasa de Rho, denominada ROCK (del inglés, *Rho associated coiled coil*

kinase) (Nakayama and Luo, 2000). Se ha descrito que ROCK fosforila tanto la MLC (cadena ligera de miosina) como la MLCP (fosfatasa de la cadena ligera de miosina), lo que provoca una estimulación eficiente de la contracción del complejo actina-miosina, produciendo acortamiento de las espinas (Govek et al., 2005) (Figura 5). Evidencia sugiere que la señalización RHOA/ROCK antagoniza la formación y mantenimiento de espinas (Ethell and Pasquale, 2005, Govek et al., 2005).

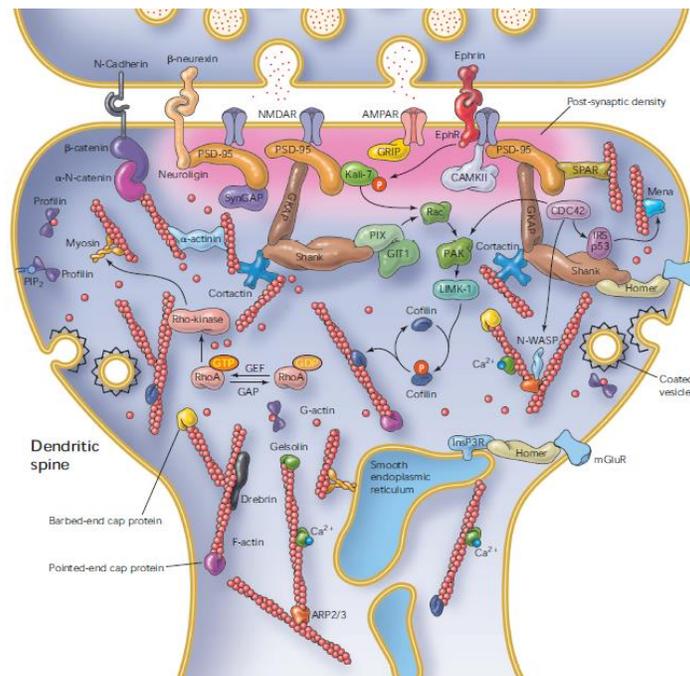


Figura 5. Componentes moleculares del remodelamiento de espinas dendríticas. La figura representa una sinapsis glutamatergica en la que se esquematiza el componente pre (arriba) y post sináptico (abajo). En la membrana del terminal postsináptico (espinas dendríticas) se localizan los receptores de glutamato del tipo NMDA y AMPA que son capaces de iniciar complejas cascadas transduccionales en las que participan activamente las proteínas de adhesión celular N-CADHERINA, β-CATENINA y las GTPasas de la familia Rho (RHOA, RAC y CDC42), entre muchas otras. Estas proteínas en su conjunto son capaces de remodelar la espinas a través de la modificación del citoesqueleto de actina, el cual es el principal soporte estructural de la espinas dendríticas. Fuente: (Calabrese et al., 2006).

En nuestro laboratorio se ha determinado que las alteraciones cognitivas inducidas por el estrés crónico están asociadas a una reducción en la densidad de espinas de dendritas primarias de la región de CA1 del hipocampo (Castaneda et al., 2015). Estos cambios son acompañados por un incremento en los niveles de RHOA en los extractos de tejido hipocampal, sugiriendo que la reducción en la densidad de espinas podría ser explicada por un incremento en la actividad de RHOA y su efector ROCK (datos no publicados). Más aún, nuestro grupo ha descrito que el estrés crónico induce un aumento significativo en la fosforilación de MYPT1, proteína que es sustrato específico de ROCK (Garcia-Rojo et al., 2017). Es así que nuestro grupo ha planteado como hipótesis de trabajo que los efectos deletéreos del estrés se relacionan a un aumento en la actividad de la vía Rho-ROCK. En apoyo a esta idea, hemos demostrado que animales estresados tratados crónicamente con Fasudil, un inhibidor de ROCK, ejerce acciones tipo antidepresivas en pruebas conductuales (Anexo 1).

El Fasudil es un inhibidor potente de ROCK y se le atribuyen acciones como vasodilatador y antiespástico, por lo que ha resultado útil en el tratamiento del vasoespasma cerebral en China y Japón (Hasegawa et al., 2016). Solo en éstos países se encuentra aprobada su utilización, bajo los nombres comerciales de Eiril[®] y Chuanwei[®]. El mecanismo de acción descrito en su indicación como antiespástico consiste en la inhibición de la contracción del complejo actina-miosina de la musculatura lisa, a través de la inhibición de ROCK, promoviendo la vasodilatación (Nagumo et al., 2000). Este fármaco pertenece a la familia de las isoquinolinsulfamidas e inhibe competitivamente a ROCK al unirse al sitio de unión al ATP (Nagumo et al., 2000).

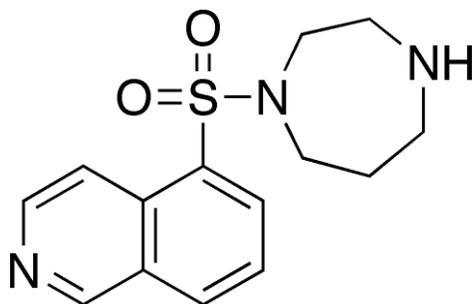


Figura 6. Estructura química de la Fasudil. La figura muestra la representación gráfica del inhibidor de ROCK, Fasudil, cuyo nombre IUPAC corresponde a 5-(1,4-diazepam-1-ilsulfonil) isoquinolina.

Tabla 5: Parámetros farmacocinéticos de Fasudil

Biodisponibilidad	95%
Vida media	0,78 h (Fasudil), 4,66 h (Hidroxfasudil)
Metabolito	Hidroxfasudil
t máx	0,5 h
Ki	0,4 μ M

La tabla muestra parámetros farmacocinéticos del inhibidor de ROCK, Fasudil, obtenidos desde fuentes humanas. La K_i está determinada en relación a ROCK.

De acuerdo a su información farmacocinética (Tabla 5), es posible afirmar que Fasudil traspasa la barrera hematoencefálica. Por otro lado, tiene una vida media de 0,78 horas y da origen a un metabolito hidroxilado (hidroxfasudil) cuya actividad es mayor que la del fármaco original, con una vida media de 4,66 horas (Shibuya et al., 2005). Actualmente, se han propuesto acciones farmacológicas adicionales para Fasudil, como antiangiogénico y antimetastásico, junto con propiedades neuroprotectoras y antioxidantes (Sato et al., 2001, Ying et al., 2006, Yin et al., 2007). En relación a la depresión, nuestro laboratorio ha demostrado por primera vez efectos tipo antidepressivos de Fasudil en la prueba de natación forzada y ensayo de evitación activa (Anexo 1). Este efecto ocurre en una dosis en la que Fasudil es capaz de inhibir a ROCK, aspecto demostrado en un artículo reciente de nuestro laboratorio (García-Rojo et al., 2017). En este trabajo la proteína MYPT1, que corresponde

a un blanco exclusivo de ROCK disminuye sus niveles de fosforilación en los animales que recibieron Fasudil. De todas formas, no existen antecedentes que determinen si la inhibición de ROCK por si sola puede explicar las acciones tipo antidepresivas, quedando por demostrar el o los mecanismos moleculares implicados.

1.8 Regulación de la traducción local en el remodelamiento de espinas dendríticas

Se ha reportado que el incremento en la transmisión glutamatérgica induce el crecimiento de espinas dendríticas, efecto bloqueado por un inhibidor de la síntesis de proteínas como anisomicina (Lai and Ip, 2013), indicando que la plasticidad estructural involucra traducción de mRNAs. Actualmente se encuentra aceptado que el remodelamiento de espinas dendríticas (cambio en número y morfología de espinas, tráfico de receptores, etc.) involucra no solo la síntesis general de proteínas, sino que además la síntesis de manera localizada en las mismas espinas dendríticas (Martin and Zukin, 2006). Existe un transporte dinámico de mRNA desde el soma a la arborización dendrítica, que permite una traducción local en respuesta a actividad neuronal. Estos mRNAs transportados, codifican para proteínas relevantes en los procesos de remodelamiento de espinas, como la subunidad alfa de la proteína CaMK II, BDNF, la proteína asociada a citoesqueleto regulada por actividad (Arc), el receptor TrkB, la subunidad NR1 del receptor NMDA y RHOA entre otras (Martin and Zukin, 2006, Troca-Marín et al., 2010). Los mRNA son transportados al compartimiento dendrítico en la forma de complejos ribonucleoprotéicos en un estado traduccionalmente reprimido y esta represión puede ser superada por una actividad neuronal intensa (Sossin and Lacaille, 2010).

1.8.1 Rol de los miRNAs en la traducción local

Otra forma de regulación de la actividad traduccional local, en respuesta a actividad neuronal es a través de la participación de microRNAs (miRNAs). Estas moléculas corresponden a RNAs no codificantes de 20 a 25 nucleótidos y participan en una amplia

gama de procesos incluyendo diferenciación, desarrollo y función inmune, entre otros (Shruti et al., 2011). Su biosíntesis se inicia con la transcripción, mediada por RNA Polimerasa II y III, de los genes que codifican para miRNAs, los que pueden ser intergénicos o localizados en regiones intrónicas de genes que codifican para proteínas. Los miRNAs primarios (pri-miRNAs) generados son procesados en el núcleo para formar una, o una serie de pequeñas horquillas precursoras de miRNAs (pre-miRNAs), con un tamaño que fluctúa entre los 70 y 110 nucleótidos de longitud. La conversión de pri-miRNAs a pre-miRNAs es catalizada por el complejo Drosha-DGCR8. Luego los pre-miRNAs son exportados al citoplasma mediante el complejo Exportina 5 Ran-GTP. En el citoplasma los pre-miRNAs son procesados, por medio de la enzima RNasa III Dicer, a una doble hebra de RNA pequeño maduro (dúplex miRNA/miRNA*) de aproximadamente 22 nucleótidos de largo. Una hebra del dúplex miRNA/miRNA* es incorporada al complejo inductor de silenciamiento de RNA (RISC), mientras que la otra hebra (miRNA*) es degradada (Shruti et al., 2011) (Figura 7).

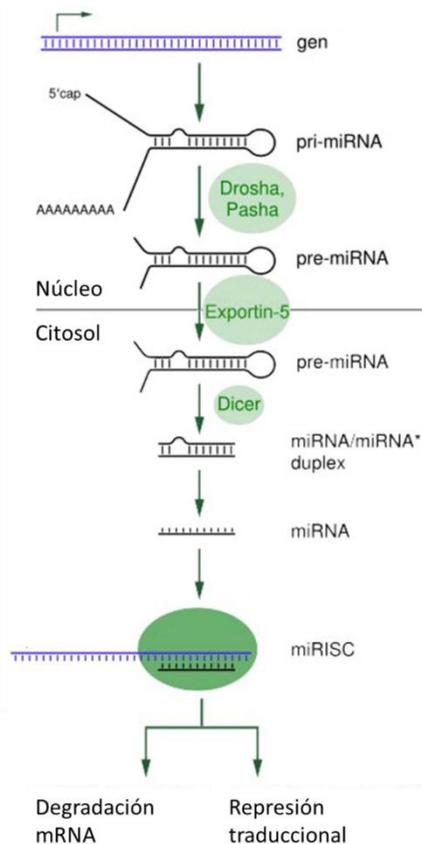


Figura 7. Síntesis de miRNAs.

El esquema ilustra el proceso de síntesis y maduración de los miRNAs, desde su transcripción en el gen de origen, hasta su acción como represor traduccional o degradando el transcrito de su blanco determinado.

El complejo RISC-miRNA se une por complementariedad de bases a secuencias denominadas “semillas”, las que están localizadas en la región 3'UTR de los mRNA y de esta manera interfieren en el proceso de traducción y/o promueven la degradación de los mRNA blanco (Shruti et al., 2011). De acuerdo a la homología de las secuencias, cada miRNA tiene la probabilidad de regular la traducción de cientos de mRNAs diferentes. Muchos genes neurales que codifican miRNAs son expresados con patrones espaciales y/o temporales característicos, los cuales permiten un control más fino de los niveles de proteínas durante el desarrollo neuronal (Siegel et al., 2011). El hecho de que muchos miRNAs, y sus precursores estén localizados con los polirribosomas en dendritas de neuronas de mamíferos, sugiere que ellos juegan un rol en el control de la traducción local de mRNAs específicos de las dendritas (Kim et al., 2008). Más aún, algunos estudios sugieren que la actividad sináptica podría activar el procesamiento local de los precursores de miRNA en el hipocampo, mediante un cambio en la actividad de Dicer (Lugli et al., 2005). La disrupción del gen de *Dicer1* en el cerebro adulto mostró por primera vez una relación entre la reducción en los niveles de miRNAs y el aprendizaje asociativo (Konopka et al., 2010). Estos animales presentaron una mayor arborización en dendritas distales y un número mayor de espinas dendríticas con forma de filopodio en comparación con los controles. Además, este estudio mostró que estos cambios morfológicos se acompañaron por una reducción en los niveles de un gran número de miRNAs, como miR-124, miR-132, miR-137, miR-138, miR-29a and miR-29c; dentro de los cuales tienen como blancos potenciales los mRNAs del factor neurotrófico BDNF, re subunidades de los receptores de glutamato GluR1-R2, y proteínas presente en el elemento post-sináptico PSD95 y proteínas que participan en el remodelado de la matriz extracelular como la metaloproteínasa-9 (MMP9) (Konopka et al., 2010). Estos cambios morfológicos estuvieron acompañados por un aumento en los niveles de proteínas sintetizadas en las dendritas y que se relacionan con la neuroplasticidad y el remodelamiento de espinas (Konopka et al., 2010). Estos animales mostraron mejoras en el aprendizaje asociativo y en memoria (dependiente de hipocampo), lo que sugiere que una variación en la expresión de los niveles de miRNAs influye significativamente en los cambios de los niveles de proteínas implicadas en remodelamiento de espinas y neuroplasticidad, dando cuenta de los cambios en aprendizaje y memoria.

Se ha descrito que más de un 26% de miRNAs están codificados por genes con promotor propio (Corcoran et al., 2009). Mediante estudios *in vitro* e *in silico* se ha demostrado la existencia de sitios CRE en las regiones regulatorias de algunos genes de miRNAs, lo que posiciona al factor transcripcional CREB como un regulador positivo en el control de su expresión génica (Vo et al., 2005, Wu and Xie, 2006). Esta evidencia resulta interesante en cuanto a que la mayoría de las moléculas con acción antidepresiva aumentan los niveles de CREB (Nestler et al., 2002). De acuerdo a lo anterior es conocido que el clúster miR212/132 produce miR-132, miR-132*, miR-212 and miR-212* y su transcripción es activada por la vía BDNF/ERK/CREB en cultivos de corteza e hipocampo (Remenyi et al., 2010). La sobreexpresión de miR-132 promueve el crecimiento de neuritas y la formación de espinas, mediante la represión de la traducción de la proteína p250GAP, una proteína activadora de la actividad GTPasa de la proteína Rac1 (Impey et al., 2010). Estos efectos se correlacionan con la activación de la vía RAC/PAK, la cual está involucrada en la polimerización de actina (Nakayama and Luo, 2000), y como fue descrito anteriormente, con la formación de espinas (Luo, 2002). Otro miRNA relacionado con la morfología de espinas dendríticas corresponde al miR-134, el cual reduce el tamaño de espinas mediante la disminución en la expresión de la proteína LIMK1 (Schratt et al., 2006). Esta quinasa es un efector de la vía RAC/PAK, por lo que su regulación negativa resulta en disminución del crecimiento de espinas. A su vez, el efecto inhibitorio de miR-134 sobre la expresión de LIMK1 es revertida por la aplicación de BDNF el cual aumenta la actividad neuronal y reduce los niveles de este miRNA (Schratt et al., 2006). Más aún se ha demostrado que miR-134 disminuye los niveles de CREB y BDNF, sugiriendo una interrelación entre CREB y el miR-134 (Gao et al., 2010). Adicionalmente, estudios no publicados de nuestro Laboratorio, establecieron un aumento en los niveles de otro potencial regulador de CREB, el miR-485, en respuesta al estrés crónico por restricción de movimiento. Estas evidencias refuerzan la idea de una regulación de los niveles de CREB a través de los miRNAs.

Otro actor en la regulación de la morfología neuronal es el miR-138 el cual reduce el tamaño de espinas dendríticas de neuronas hipocampales (Siegel et al., 2009). Este miRNA se une a la región 3'UTR del mRNA de la proteína APT1, enzima que actúa regulando el

nivel de palmitoilación de ciertas proteínas sinápticas incluyendo la subunidad $\alpha 13$ de la proteína G (Siegel et al., 2009). Así, el miR-138 aumenta los niveles de $G\alpha 13$ palmitoilada en la membrana plasmática, favoreciendo la activación de la vía RHOA/ROCK y como consecuencia favorece la reducción en el tamaño de espinas (Siegel et al., 2009). Otro miRNA que se ha relacionado con la regulación del citoesqueleto es miR-124, el cual produce un crecimiento de neuritas por la activación de CDC42 y RAC1 (Yu et al., 2008). Sin embargo, no está claro el mecanismo por el cual miR-124 es capaz de activar a estas proteínas.

1.8.2 Relación entre estrés, acción de los antidepresivos y niveles de miRNAs

Se ha descrito que el estrés por restricción de movimiento induce cambios en los niveles de gran cantidad de miRNAs en el hipocampo y la amígdala, dos regiones del cerebro que son sensibles al estrés (Meerson et al., 2010). Este estudio, publicado el año 2010, muestra el perfil de expresión de miRNAs en ratas sometidas a estrés agudo (4 h/1 día) y crónico (4h/14 días), evaluado 24 horas después de la última sesión de estrés. Interesantemente las variaciones producidas en los perfiles de expresión de miRNAs fueron diferentes según la región del cerebro estudiada y variaron en función la duración o repetitividad del estresor (Meerson et al., 2010). Esto sugiere que los cambios en los niveles de los miRNAs dependen de la repetitividad del estresor y del área analizada. Existen estudios que muestran variaciones de los niveles de miRNA en respuesta a tratamientos con fármacos tradicionales (Tardito et al., 2013), lo que posiciona a los miRNAs como actores de la respuesta a fármacos, o quizás como biomarcadores de las respuestas producidas. Estos antecedentes invitan a enfocar los esfuerzos en el estudio de la implicancia de los miRNAs en el campo de la farmacología, para así entregar otra mirada de los mecanismos de acción de los fármacos.

Por otro lado, existe evidencia de cambios en el patrón de expresión de miRNA por tratamientos con fármacos antidepresivos en animales controles (Pelizzari M, 2012). Se ha logrado demostrar que el miR-16 tiene como blanco la región 3'UTR del transportador de serotonina (SLC6A4), y que la administración crónica del antidepresivo Fluoxetina es capaz

de reducir sus niveles diferencialmente en diversas zonas del cerebro, lo que resulta en cambios en la expresión de esta proteína. Adicionalmente este miRNA regula la expresión de la proteína BCL-2, lo que sugiere un rol activo en procesos de supervivencia (Baudry et al., 2010). Este estudio logró demostrar por primera vez la participación de los miRNA en los mecanismos que controlan los cambios adaptativos propios de los tratamientos crónicos de los antidepresivos, como la disminución en los niveles de proteínas de SLC6A4 y BCL-2. Sin embargo, no existen antecedentes de cómo estos fármacos pueden modificar los niveles de miRNAs en animales estresados y más aún si estos cambios se relacionan con las acciones farmacológicas de los antidepresivos. Existe un antecedente en el que ratas fueron sometidas a un modelo de estrés por separación materna. Estos animales en la adultez recibieron diferentes tratamientos antidepresivos (Fluoxetina, Ketamina o terapia electroconvulsiva), lo cual dio como resultado un cambio en el patrón de expresión de ciertos miRNAs y demostró por primera vez la restauración de los niveles de un miRNA a un rango normal mediante antidepresivos (O'Connor et al., 2013). Sin embargo, en este estudio no se demostró que el estrés posnatal indujese conductas tipo depresivas y más aún si éstas se revertían por el tratamiento farmacológico antidepresivo. Tampoco se demuestra si existe una relación de causalidad entre miRNAs, antidepresivos y cambios en el fenotipo depresivo; es decir, en la conducta.

En la actualidad son muy poco conocidas las bases moleculares de los trastornos asociados al estrés, como la depresión, así como los mecanismos que explican la capacidad de los antidepresivos de ejercer su efecto terapéutico. Los fármacos con acción antidepresiva son capaces de prevenir los efectos deletéreos del estrés en animales sometidos a estrés crónico (en la prueba de natación forzada), lo cual se correlaciona con alteraciones morfológicas en las espinas dendríticas del hipocampo (Magariños et al., 1999, Ulloa et al., 2010, Qiao et al., 2016). A su vez, el estrés y la administración de fármacos antidepresivos se ha relacionado a cambios en proteínas asociadas a remodelamiento de espinas dendríticas y relacionadas al control de la apoptosis (Sairanen et al., 2007). La depresión, el estrés y los antidepresivos han mostrado promover cambios en el patrón de expresión de los miRNAs (Meerson et al., 2010, Pelizzari M, 2012, O'Connor et al., 2013). De acuerdo al importante

rol de los miRNAs regulando los niveles de proteínas claves en cascadas de señalización relacionadas a la morfología de las espinas, el fenotipo celular y de supervivencia, resulta factible plantear que los fármacos antidepresivos modifiquen los niveles de ciertos miRNAs y de esta forma actúen previniendo de los efectos deletéreos del estrés. Por lo tanto, los miRNAs podrían constituir un punto de convergencia entre los agentes farmacológicos que promueven acciones antidepresivas.

De acuerdo a la acción del Fasudil sobre la señalización de vías críticas del remodelamiento de espinas dendríticas y a sus acciones tipo antidepresivas (determinadas en pruebas conductuales realizadas en nuestro laboratorio), se propone que este fármaco, al igual que el antidepresivo ISRS Sertralina, es capaz de activar la vía de supervivencia ERK-CREB-BCL-2 y prevenir los efectos deletéreos del estrés sobre la densidad y morfología de espinas dendríticas hipocampales a través de cambios en los niveles de proteínas relacionadas a remodelamiento de espinas. Dentro de las proteínas importantes en estos procesos están: APT-1, RHOA Y LIMK. De acuerdo a los antecedentes expuestos, Fasudil sería capaz de modificar los niveles de una o varias de estas proteínas, sustentando molecularmente parte sus eventuales efectos morfológicos. Las acciones mencionadas estarían relacionadas, además, a cambios en los niveles de miRNAs que tienen como blancos a algunas de estas proteínas. La figura 8 muestra la relación propuesta entre los miRNAs y proteínas evaluadas en esta Tesis doctoral.

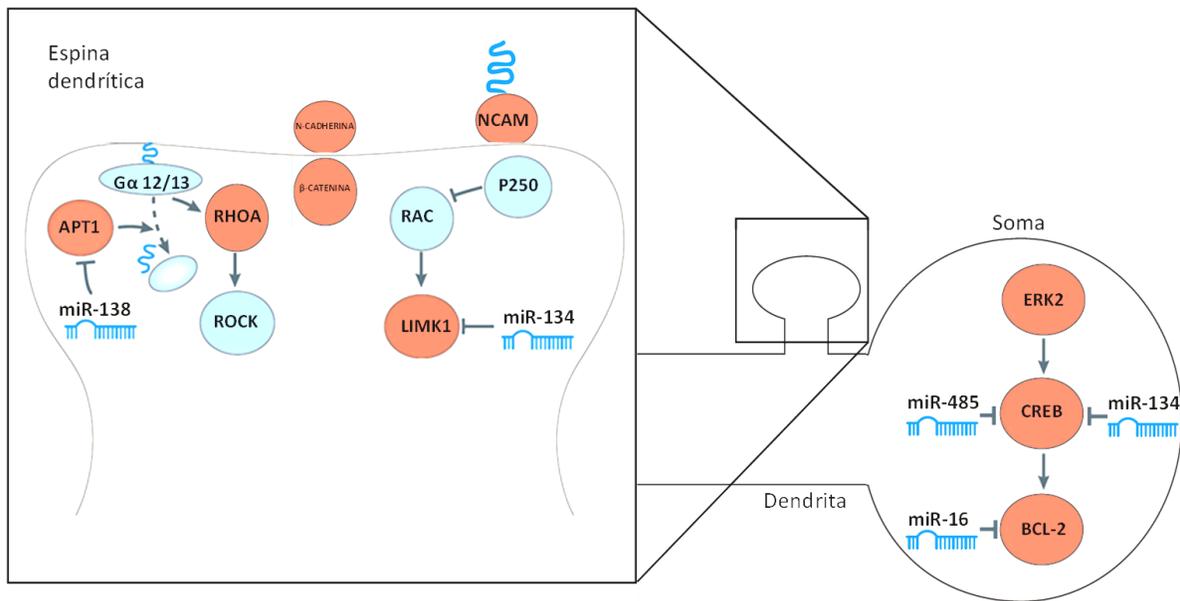


Figura 8. Esquema propuesto: Relación entre miRNAs y proteínas asociadas a remodelamiento de espinas dendríticas. La figura muestra una representación de una neurona piramidal del hipocampo separada por soma, dendrita y la magnificación de una espina dendrítica. En el esquema se muestran las proteínas evaluadas en la presente tesis (círculos rojos) y los miRNAs que potencialmente regulan su expresión.

2) HIPÓTESIS

“El inhibidor de ROCK Fasudil, al igual que el antidepresivo Sertralina, activa la vía de sobrevida ERK-CREB-BCL-2 y previene los efectos del estrés sobre la densidad de espinas dendríticas hipocampales, lo que se relaciona con el cambio en los niveles de proteínas y miRNAs asociados a remodelamiento de espinas dendríticas”

3) OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar si el inhibidor de ROCK Fasudil, al igual que el antidepresivo Sertralina, activa la vía de sobrevida ERK-CREB-BCL-2, previene los efectos del estrés sobre la densidad de espinas dendríticas hipocampales y finalmente si esto se relaciona con cambios en los niveles de proteínas y miRNAs asociados a remodelamiento de espinas.

3.2 Objetivos específicos

1) Determinar si Fasudil y Sertralina modifican los efectos del estrés sobre la ganancia de peso del animal y otros marcadores de la respuesta de estrés

Determinar en tejido hipocampal si Fasudil, al igual que el antidepresivo Sertralina:

2) Modifica la activación y los niveles de proteínas asociadas a la vía transduccional de sobrevida ERK-CREB-BCL-2 y los miRNAs asociados que potencialmente las regulan.

3) Previenen los efectos del estrés sobre la densidad y morfología de espinas dendríticas de neuronas hipocampales.

4) Ejerce acciones sobre proteínas asociadas a remodelamiento de espinas dendríticas y si éstas se relacionan con variaciones en los niveles de miRNAs que potencialmente las regulan.

5) Realizar estudio *in silico* de las vías de señalización y los blancos potencialmente regulados por aquellos miRNAs cuyos niveles sean modificados por el estrés y los dos fármacos utilizados (Fasudil y Sertralina).

4) MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales

Se utilizaron ratas machos Sprague-Dawley de 2 meses de edad, las que fueron mantenidas en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas con ciclo de luz y oscuridad de 12 horas. Además, se contó con temperatura y humedad controlada, y con libre acceso de comida y agua. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a los protocolos establecidos y aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (Código de aprobación CBE 2014-2).

4.2 Modelo de estrés

Los animales fueron pesados durante diez días y posteriormente fueron sometidos a estrés repetido por restricción de movimiento, el cual ha sido utilizado previamente en el Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética como un modelo animal que replica conductas tipo depresivas (Ulloa et al., 2010). Este protocolo consiste en introducir a la rata en un tubo de Plexiglás (25x 8 cm) 2,5 horas al día, por 14 días consecutivos. Cada sesión de estrés se realizó entre las 9-12 horas, para evitar efectos relacionados al ritmo circadiano, y los animales fueron eutanasiados 24 horas después de acabada la última sesión de estrés. Se evaluó diariamente la ganancia de peso y el número de heces producido en la sesión de estrés. En la eutanasia se colectó sangre y se extrajeron las glándulas adrenales para determinar su masa.

4.3 Tratamientos farmacológicos y diseño experimental

Se utilizó Sertralina clorhidrato (donación del laboratorio Saval, Chile) y Fasudil clorhidrato (LC laboratories, MA, EE.UU.). Los fármacos fueron inyectados (diluidos en suero fisiológico) en una dosis de 10 mg/kg y los controles recibieron solución salina (NaCl

0,9%). La inyección se realizó diariamente por 14 días vía intraperitoneal posterior al pesaje y previo al protocolo de estrés. El diseño experimental utilizado (Fig. 9) consideró la utilización de la variable estrés (control/estresado) y tratamiento farmacológico (Sertralina/Fasudil), lo que resultó en 6 grupos que representan las combinaciones posibles entre las dos variables mencionadas. Los grupos experimentales se detallan a continuación.

- | | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| 1) Control (C-SAL) | 4) Estrés (E-SAL) |
| 2) Control Sertralina (C-SERT) | 5) Estrés Sertralina (E-SERT) |
| 3) Control Fasudil (C-FAS) | 6) Estrés Fasudil (E-FAS) |

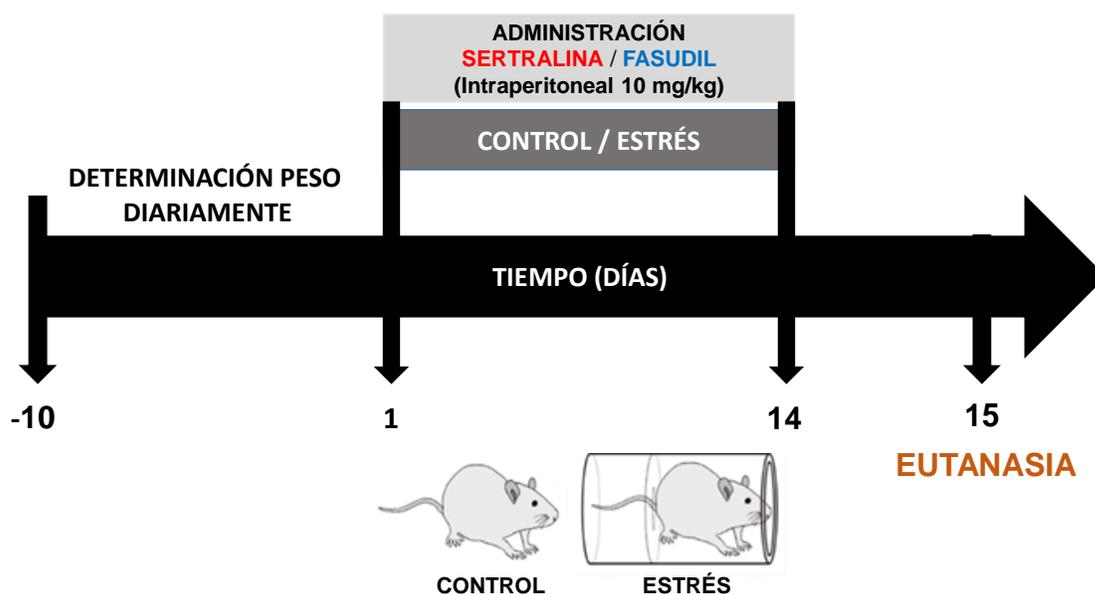


Figura 9. Diseño experimental. Los animales fueron pesados y manipulados diariamente desde los días previos al inicio de los tratamientos hasta finalizar los protocolos de estrés y/o administración de fármacos. Se administró suero fisiológico (control), Fasudil o Sertralina de forma intraperitoneal en una dosis de 10 mg/kg diariamente por 14 días consecutivos. La inyección se realizó minutos previos a la sesión de estrés y a la misma hora en el caso de los controles. Finalmente, un día posterior a la última sesión de estrés o tratamientos (día 15) los animales fueron eutanasiados.

Se utilizaron cinco camadas de 6 animales cada una. En cada camada se asignaron los seis grupos experimentales a cada uno de los animales hermanos, de esta manera se obtiene una menor variabilidad interindividual y el número de camadas resulta equivalente al número de réplicas biológicas de cada grupo.

4.4 Obtención de tejido

Las ratas fueron eutanasiadas por decapitación, el cerebro fue removido rápidamente y se disecó el hipocampo del hemisferio izquierdo a 4°C. Posteriormente el hipocampo fue congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80°C para análisis posteriores, mientras que el hemisferio derecho se utilizó para análisis morfológico mediante la tinción de Golgi.

4.5 Determinación de niveles de corticosterona sérica

Se empleó la muestra de sangre obtenida de los animales para este procedimiento. La muestra fue recolectada en tubos de plástico y se dejó a 4°C por varias horas para ser posteriormente centrifugada a 4.000 g durante 10 minutos, obteniéndose suero. Los niveles séricos de corticosterona fueron determinados cuantitativamente mediante un ensayo inmunoenzimático para corticosterona (Correlate-EIA™, Enzyme Immunoassay Kit, Assay Designs, Inc., EE.UU.). La evaluación de las muestras se realizó con una dilución 1:30 y se interpolaron los datos en una curva estándar con una corticosterona de concentración conocida proporcionada por el kit, en un rango de concentración entre 32 y 20000 pg/mL. Se agregaron 100 µL de estándar o muestra en una placa de 96 pocillos, recubierta con un anticuerpo anti IgG de oveja anti-corticosterona. Luego, se agregaron 50 µL de corticosterona conjugada a fosfatasa alcalina, la cual compite con la hormona presente en el estándar o muestra; y finalmente se agregaron 50 µL del IgG de oveja anti-corticosterona para el reconocimiento de corticosterona conjugada y no conjugada. El anticuerpo IgG de oveja se agregó a todos los pocillos, excepto los pocillos del blanco y unión no específica. Luego se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave y posterior a 3 lavados

con 400 μ L del tampón provisto en el kit, se agregó el sustrato de la fosfatasa alcalina (p-nitrofenilfosfato) el que genera un producto de color amarillo (p-nitrofenol). Posterior a 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 AsysHitech modelo Expert 96. Por el diseño de este ensayo, la intensidad del producto de color amarillo, es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración de corticosterona presente tanto en los estándares como en las muestras. Con las diluciones seriada del estándar se construyó una curva de calibración y se interpolaron los niveles de corticosterona presente en las muestras de suero.

4.6 Tinción Golgi

El hemisferio derecho del cerebro fue destinado al análisis morfológico utilizando el kit FD Rapid GolgiStain (FD Neuro Technologies, Baltimore, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El hemisferio completo se sometió a impregnación por 16 días con una mezcla de soluciones que contienen dicromato de potasio/cloruro de mercurio (solución A) y dicromato de potasio (solución B), en partes iguales. Los cerebros se mantuvieron en frascos de plástico, protegidos de la luz, a temperatura ambiente. Luego fueron transferidos a una solución de sacarosa 30% (solución C) a 4°C por 48 h para detener la reacción de impregnación. El tejido fue congelado y cortado en secciones coronales de 110 μ m 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, 1982). Las secciones fueron montadas en portaobjetos silanizados y lavados 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. Finalmente, los cortes se deshidrataron con una batería de etanol ascendente (50%, 70% y 95%), 4 minutos en cada una de ellas, para finalmente montarlas en portaobjetos y cubrirlas con resina (Entellan, Merck, Alemania).

4.7 Captura de imágenes y análisis morfológico

Se seleccionaron dendritas secundarias apicales provenientes de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo dorsal (Figura 10 A). Esta elección se basa en que en esta zona los axones provenientes de CA3 hacen sinapsis con las neuronas de CA1, por lo que las espinas dendríticas presentes dan cuenta de esta parte fundamental del circuito hipocampal (Tonegawa and McHugh, 2008). El criterio para la selección de neuronas para el análisis fue el siguiente: i) neuronas completas bien teñidas e impregnadas (buen contraste) y sin cortes, ii) relativamente aisladas del resto de las neuronas, iii) dendritas localizadas en el *stratum radiatum* (150 μm desde el soma de la neurona piramidal) y iv) con una longitud de por lo menos 80 μm (Figura 10 A y B). Las dendritas que se originan directamente desde el soma neuronal fueron clasificadas como dendritas primarias, y las que se originan como una ramificación de ésta, se consideran dendritas secundarias (Figura 10 A) (Mitra et al., 2005), las cuales fueron utilizadas para el análisis. Se obtuvo una serie de imágenes en distintos planos del eje Z (*Z-stack*) para cada segmento dendrítico mediante un microscopio confocal Zeiss LSM 700, objetivo Plan-Apochromat 40X/1.4 NA Zeiss, con zoom digital hasta obtener capturas de imágenes con un aumento aproximado de 100X. Todas las series de imágenes se realizaron con 1 μm de separación entre fotografías e incluyeron los intervalos sobre y bajo el segmento dendrítico, de tal forma que todo el segmento estuviera en foco a lo largo del *Z-stack*. Las protrusiones que emergen directamente desde la dendrita fueron consideradas como espinas. Éstas fueron contadas en segmentos de 8 μm , comenzando desde el origen de la ramificación dendrítica, hasta llegar a lo menos a 80 μm . La densidad fue calculada dividiendo el total de espinas por la longitud del segmento analizado. Las espinas fueron clasificadas como del tipo callampa cuando su diámetro excedió 0,6 μm (Ethell and Pasquale, 2005), mientras que el resto fue clasificado como “Resto de espinas”, las cuales correspondieron a la diferencia entre las espinas totales y las espinas tipo callampa. Este grupo contiene espinas de las restantes características morfológicas como filopodios, copas, delgadas, etc. (Figura 10 C y D). Se utilizaron a lo menos 5 segmentos dendríticos provenientes de neuronas distintas por cada animal analizado.

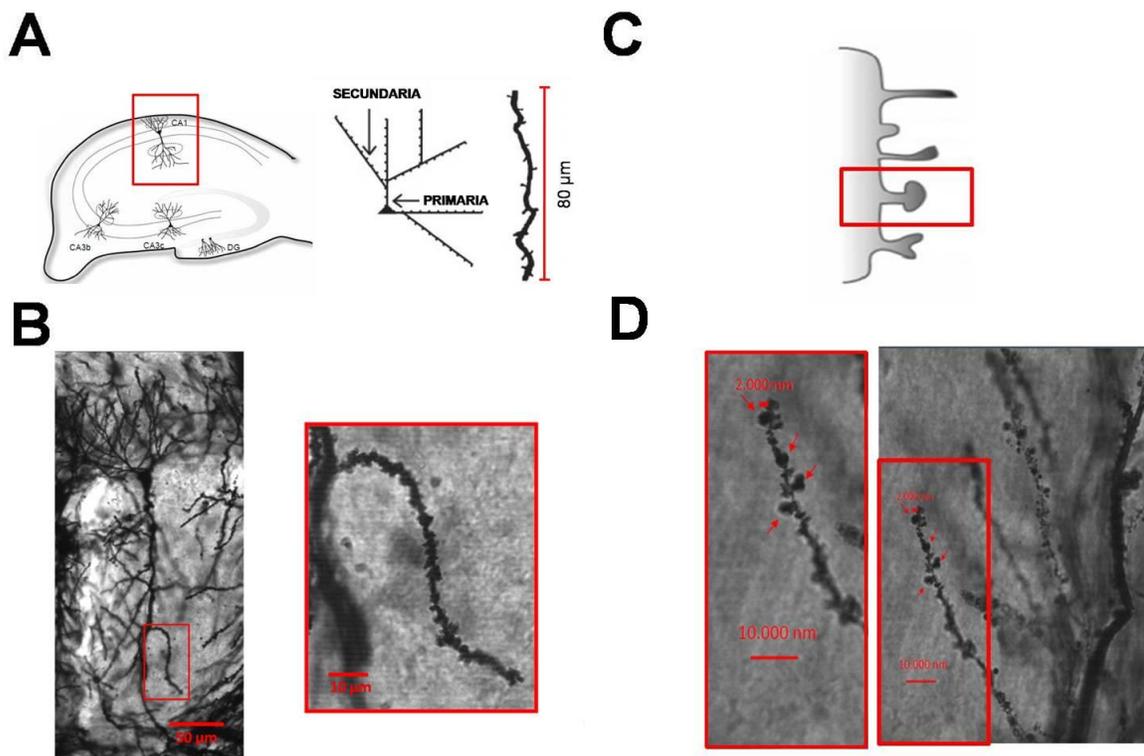


Figura 10. Metodología del análisis morfológico. A) Representación de un corte de hipocampo dorsal, en donde se destaca la localización y forma de las neuronas piramidales presentes en CA1, el esquema muestra la clasificación dendrítica para ramas primarias y secundarias, además de una representación de un segmento dendrítico secundario con una longitud de 80 μm . B) Imagen de una neurona piramidal desde la zona CA1 del hipocampo y a la derecha una magnificación de una dendrita secundaria. C) El esquema ilustra la diversidad de formas de espinas dendríticas, en la que se destaca la forma de callampa. D) Imagen de una dendrita secundaria obtenida por microscopía confocal y una magnificación de ésta. Las flechas rojas muestran las espinas dendríticas en forma de callampa. Fuente: (Lippman and Dunaevsky, 2005), C y D) y Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética.

4.8 Homogeneización de muestras para determinación de proteínas, mRNAs y miRNAs

Los hipocampos congelados, procedentes de los hemisferios izquierdos, se homogeneizaron en un homogeneizador vidrio-vidrio en 500 μ L de amortiguador de lisis (Tris HCl 50 mM pH = 7, NaCl 150 mM, EGTA 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,4 mM, Tritón X-100 1%, Deoxicolato 1%) preparado con agua libre de nucleasas y en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas, fosfatasa y RNasas (RNAsin 40 U/ μ L, INVITROGEN, California, EE.UU.). El homogeneizado resultante fue separado en alícuotas de 200 y 300 μ L para la obtención de RNAs y la determinación de niveles de proteínas (mediante *western blot*) (Fig. 11).

4.9 Western blot

Las muestras del homogeneizado se sonicaron (Transsonic Digital D-78224 SinGen/HTW, ELMA, Alemania) a 4°C durante diez minutos y luego fueron centrifugadas (Labofuge 400, Heraeus Instruments, Alemania) a 21000 g durante 30 minutos a 4°C y se descartó el sedimento. En el sobrenadante se realizó la cuantificación de las proteínas mediante un kit, que se basa en el método del ácido bicinonínico (Sapan, Lundblad et al. 1999) en microplacas y que utiliza suero bovino albúmina (BSA) como estándar. Luego de incubar durante 30 min, se determinó la absorbancia a 562 nm tanto de los estándares como muestras. Una vez conocida la concentración de proteínas, las muestras se denaturaron en una relación 3:1 con un amortiguador de carga (concentración final de: Tris 250 mM pH 6,8, SDS 5%, glicerol 6,7% v/v, DTT 0,512 mg/mL, azul de bromo fenol 13,33 mg/mL). Las muestras fueron calentadas a 100°C durante 10 min y posteriormente almacenadas a -80°C para las posteriores determinaciones.

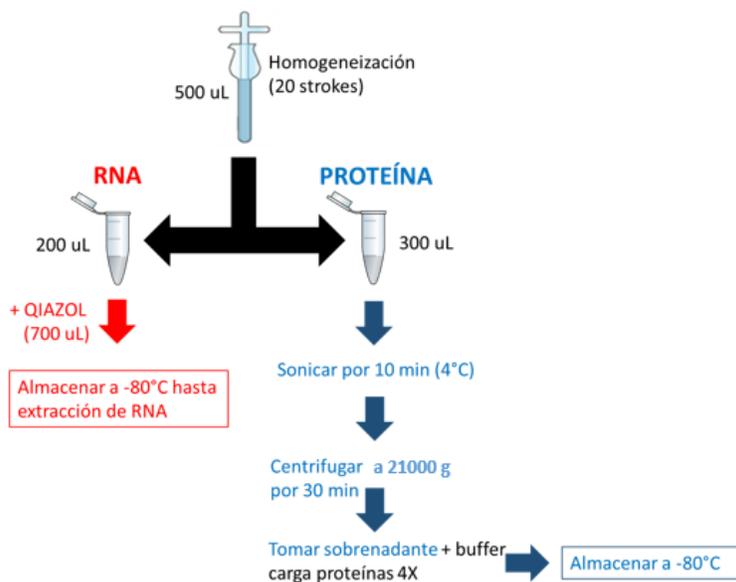


Figura 11. Homogeneización de hipocampos para la obtención de RNA y proteínas. El hipocampo previamente congelado se homogeneizó en un homogeneizador vidrio-vidrio en 500 µL de amortiguador de lisis preparado con agua libre de nucleasas y en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas, fosfatasa y RNasas. Luego, el homogeneizado obtenido se separó en 200 µL, destinado a la obtención de RNA, y en 300 µL, destinado a la obtención e identificación de proteínas. La alícuota destinada para la obtención de RNA fue congelada a -80 °C, previa adición del reactivo comercial QIAZOL (Qiagen, California, EE.UU.) para su posterior procesamiento y extracción de RNA. Por otra parte, la alícuota destinada a la determinación de proteínas fue sonicada por 10 min a 4°C, luego centrifugada a 21000 g por 30 min y posteriormente se adicionó *buffer* o amortiguador de carga (concentración final de: Tris 250 mM pH 6,8, SDS 5%, glicerol 6,7% v/v, DTT 0,512 mg/mL, azul de bromo fenol 13,33 mg/mL) y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Se resolvieron 30 µg de proteína y 5 µL de estándar preteñido de un rango de peso molecular de 10-180 kDa (ThermoFisher, Massachusetts, EE.UU.) en un gel de poliacrilamida-SDS. El gel concentrador contenía 5% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), SDS 0,1%, Tris 125 mM a pH 6,8 y el gel separador contenía Tris 375 mM pH 8,8; SDS 0,1% y una concentración variable (8, 10, 12 o 15%) de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) escogida para lograr la mejor resolución de la proteína de interés. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis (Mini Protean III, BioRad, EE.UU.) y en un tampón de corrida (Tris 2,5 mM, SDS 0,01%, glicina 19 mM) durante 2 a 3 horas a una diferencia de potencial de 80 V en una fuente de poder (Desatronic 500/500, DESAGA, Alemania). Luego

de la separación de las proteínas, se realizó la electrotransferencia (Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cells, BioRad, EE.UU.) de las proteínas a una membrana de PVDF o nitrocelulosa en tampón de transferencia (glicina 19 mM, Tris 2,5 mM, metanol 20%) durante 2 horas a 700 mA totales en una fuente con hielo. Para proteínas de alto peso molecular (superior a 100 kDa) se usó el mismo tampón, pero con 5% de metanol y se realizó la electrotransferencia durante 16 horas a 80 mA. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con leche libre de grasa o BSA y luego incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente con la dilución adecuada (Tabla 6). Al día siguiente se realizaron lavados y se agregó el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Finalmente se realizó la medición de la señal quimioluminiscente con el kit EZ-ECL (Biological Industries, Israel) y a través del equipo G:Box Chemi-XT4 (Syngene Synoptics, Cambridge, Inglaterra). La semicuantificación se realizó con el software UN-SCAN-IT (SilkScientific, Utah, EE.UU.).

Tabla 6. Anticuerpos y condiciones utilizadas en la evaluación de niveles de proteínas

Anticuerpo	Peso (Kda)	Marca	Tiempo de bloqueo (h)	Solución de bloqueo	Dilución anticuerpo primario	Anticuerpo secundario (dilución)
ERK 2	42	Santa Cruz	1	3% leche en PBS	1:500	Conejo (1:10000)
P-ERK 2	42	Cell Signaling	1	3% leche en TBST 0,1%	1:500	Conejo (1:10000)
CREB	43	Cell Signaling	1	1% leche en PBST 0,1%	1:1000	Conejo (1:10000)
P-CREB	43	Millipore	1	3% leche en PBST 0,1%	1:250	Conejo (1:10000)
BCL-2	26	BD	1	1% leche en PBST 0,1%	1:100	Conejo (1:10000)
APT-1	25	Abcam	0,5	3% leche en PBST 0,1%	1:200	Conejo (1:10000)
RHOA	22	Santa Cruz	0,25	1% leche en TBST 0,1%	1:250	Ratón (1:10000)
LIMK	72	Sigma	0,5	1% leche en PBST 0,1%	1:2000	Conejo (1:10000)
P-LIMK	72	Sigma	1	3% leche en TBST 0,1%	1:250	Conejo (1:10000)
NCAM 180	180	S. Systems	1	1% leche en TBST 0,1%	1:250	Rata (1:5000)
N-CADHERINA	100	BD	1	3% leche en TBST 0,1%	1:500	Ratón (1:10000)
β-CATENINA	94	Santa Cruz	1	3% leche en TBST 0,1%	1:500	Conejo (1:10000)
β-ACTINA	42	Sigma	1	3% leche en TBST 0,1%	1:5000	Ratón (1:10000)

La tabla muestra las condiciones en las que se realizó el western blot para cada una de las proteínas utilizadas. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en su respectiva solución de bloqueo, mientras que los anticuerpos secundarios fueron diluidos en una solución de 3% leche en TBST o PBST 0,1%.

4.10 Obtención de RNA

La otra alícuota del homogeneizado hipocampal fue mezclada con 700 μ L de una solución comercial, QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, California, EE.UU.). Con el fin de optimizar el análisis de los miRNAs por RT-qPCR, se obtuvieron fracciones enriquecidas de RNA mayores y menores a 200 nucleótidos (nt). Para ello se utilizaron consecutivamente 2 kit comerciales. El primero permite la concentración de RNAs menores de 200 nt (RNeasy MinElute Cleanup Kit, Qiagen, California, EE.UU.) y el segundo concentra aquellos RNAs mayores a 200 nt (RNeasy Mini Kit, Qiagen). La extracción de cada fracción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La integridad de ambas fracciones enriquecidas de RNA (mayores y menores a 200 nt) fue confirmada mediante un gel denaturante de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La cuantificación de los RNAs se realizó mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.).

4.11 RT-qPCR de mRNAs

Se realizó una transcripción inversa de los RNAs utilizando el kit Super Script II (Invitrogen, California, EE.UU.). Para ello se utilizó 2,5 μ g de RNA total (volumen variable según concentración de la muestra) y 200 U de la RNA polimerasa Super Script II en presencia de partidores hexaméricos azarosos según las instrucciones del fabricante. El perfil térmico utilizado fue el siguiente: 25°C por 10 min, 42°C por 50 min y 70°C por 15 min.

Posteriormente, se tomaron 10 ng de cDNA resultante y se realizó la reacción de PCR en tiempo real en presencia de 0,25 μ M de cada partidador (sentido y antisentido) y Brilliant II Ultra-fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, California, EE.UU.) en un volumen final de 20 μ L, en un termociclador Stratagene Mx3000p (Stratagene, Agilent, California, EE.UU.). El perfil térmico de las amplificaciones fue el siguiente: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 15 s y 70°C por 20 s. Cada reacción se llevó a cabo en duplicado. Los partidadores fueron diseñados utilizando Primer-Blast (NCBI)

y se obtuvieron de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EE.UU.). Se realizaron controles negativos para cada pareja de partidores, en el cual se agregó agua en reemplazo de RNA para la amplificación y se realizó un barrido de temperatura para determinar el perfil de los productos de amplificación generados (curva de disociación). Los partidores empleados para este procedimiento presentaron una eficiencia entre 90 y 110%, recta generada con al menos 5 puntos de concentración de cDNA distinto. La secuencia de los partidores empleados se adjunta en la tabla 7.

4.12 RT-qPCR de miRNAs

Se realizó una transcripción inversa de los miRNAs, para ello se utilizó 500 ng de RNA (menor a 200 nt) y la transcriptasa inversa del kit miScript PCR Starter (Qiagen, California, EE.UU.), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Debido al tamaño pequeño de los miRNAs, es necesario realizar una poliadenilación durante la transcripción inversa, con el fin de extender su tamaño para posteriormente realizar el qPCR. La transcripción inversa emplea un oligodT unido a una secuencia de un adaptador universal. La amplificación por qPCR utiliza un partidor complementario a la secuencia del partidor universal y un partidor complementario a la secuencia completa del miRNA. Un producto de PCR fue clonado y secuenciado para conocer la secuencia del adaptador universal (Anexo 2). El qPCR se realizó con 100 pg de cDNA, 12,5 µL de 2X SYBR Green PCR Master Mix, 10X miScript Universal Primer (2,5 µL), 10X miScript Primer Assay (2,5 µL) y agua libre de RNasas en un volumen final de 25 µL. La reacción se lleva a cabo en duplicado, en un termociclador Stratagene Mx3000p (Stratagene, Agilent). El perfil térmico de la amplificación fue el siguiente: 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 s, 55°C por 30 s y 70°C por 30 s. La secuencia de los partidores empleados se adjunta en la tabla 7.

Tabla 7. Partidores utilizados en la evaluación de mRNAs y miRNAs

RNA	Sentido (5'→3')	Antisentido (5'→3')
miR-16	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG	Partidor universal (miScript PCR Starter, QIAGEN, EE.UU.)
miR-134	TGTGACTGGTTGACCAGAGGGG	Partidor universal (miScript PCR Starter, QIAGEN, EE.UU.)
miR-138	AGCTGGTGTGTGAATCAGGCCG	Partidor universal (miScript PCR Starter, QIAGEN, EE.UU.)
miR-485	AGAGGCTGGCCGTGATGAATTC	Partidor universal (miScript PCR Starter, QIAGEN, EE.UU.)
SNORD95	Provistos por miScript primer Assay (QIAGEN, EE.UU.)	
<i>Arc</i>	GCATCTGTTGACCGAAGTGTC	GCACCCAAGACTGGTATTGCTG
<i>c-Fos</i>	GTTTCAACGCGGACTACGAG	GGCACTAGAGACGGACAGAT
<i>Creb</i>	GAGAACAGAGTGGCAGTGCT	GGTCCTTAAGTGCTTTTAGCTCC
<i>Apt-1</i>	GGATTGGGAGATACTGGGCAC	AAAACGAAGCCCGAAGTGGA
<i>Bcl-2</i>	CAGGGTATGATAACCGGGAGA	GATCCAGGTGTGCAGATGCCG
<i>β-actina</i>	TTGTCCTGTATGCCTCTGGTC	ACCGCTCATTGCCGATAGTG

La tabla muestra la secuencia de los partidores utilizados en la determinación de mRNAs y miRNAs mediante RT-qPCR.

4.13 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU). Los datos se muestran como promedio \pm E.E.M. (error estándar medio). Para determinar diferencias estadísticas entre pares de grupos experimentales, los datos que presentaban sólo un factor que determine la variable dependiente fueron evaluados mediante el test Kruskal-Wallis, seguido por el test de Mann Whitney, ambos con un intervalo de confianza de un 95%. Por otro lado, si los datos presentaban dos factores la significancia estadística fue evaluada mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas, utilizando el test *post hoc* de Bonfferoni o Tukey.

5) RESULTADOS

5.1 Marcadores de estrés: modulación por Sertralina y Fasudil

El protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento corresponde a un modelo válido que es capaz de generar conductas tipo depresivas, además de cambios morfológicos y moleculares que se producen en el animal sometido a este tipo de agente estresor (Bravo et al., 2009, Ulloa et al., 2010, Castaneda et al., 2015). Las alteraciones en ciertos parámetros fisiológicos son utilizadas como indicadores de la respuesta de estrés en el modelo y además permiten explorar el efecto de los fármacos en estudio en dicha respuesta.

A continuación, se detallan los efectos producidos por el estrés en estos parámetros, y se determina si los fármacos Sertralina y Fasudil, son capaces de alterarlos o prevenir los efectos del agente estresor.

5.1.1 Ganancia de peso corporal

Se ha observado que el estrés crónico es capaz de producir una reducción en la ganancia de peso corporal (Gregus et al., 2005). De acuerdo a esto, la ganancia de peso es considerado como un marcador de estrés y por ende constituye un parámetro de utilidad para corroborar o tener un control de la eficacia del protocolo de estrés utilizado.

Se registró el peso de los animales días antes del inicio del tratamiento y durante éste. Con estos datos se determinó el porcentaje diario de ganancia de peso mediante la siguiente fórmula: $\text{peso diario} \times 100 / \text{peso inicial}$. El registro de las variaciones en el peso corporal de los animales, a lo largo de los 14 días de protocolo, muestra patrones diferentes. Por una parte, durante los días precedentes a la administración de fármacos y la aplicación del protocolo de estrés (día 1), la variación en la ganancia de peso entre los grupos de animales no mostró diferencias. Sin embargo, posterior al inicio del tratamiento, los grupos que fueron sometidos al protocolo de estrés mostraron una disminución en la ganancia de peso corporal

comparado con el grupo control. Se realizó un análisis mediante el test ANOVA de dos vías, el cual mostró un efecto significativo del tiempo ($F(24, 600) = 319,2$ $p < 0,001$), el tratamiento ($F(3, 600) = 102,5$ $p < 0,001$) y de la interacción días x tratamiento ($F(72, 600) = 5,102$ $p < 0,001$) en el caso de Sertralina. De la misma forma, Fasudil mostró un efecto significativo durante los días ($F(24, 552) = 520$ $p < 0,001$), el tratamiento ($F(3, 23) = 22,2$ $p < 0,001$) y de la interacción de días x tratamiento ($F(72, 552) = 4,98$ $p < 0,001$).

El grupo estrés (E-SAL) mostró una reducción en la ganancia de peso en alrededor 6% ($p < 0,001$) comparado con el grupo control (C-SAL) al final del tratamiento de 14 días (Figura 12). Por otro lado, el grupo control que recibió Sertralina mostró también una disminución significativa en la ganancia de peso de aproximadamente un 6% ($p < 0,001$), comparado con el grupo control. Más aún los animales estresados tratados con Sertralina mostraron una mayor reducción en la ganancia de peso comparado con el grupo de animales estresados que no recibieron fármaco ($p < 0,01$).

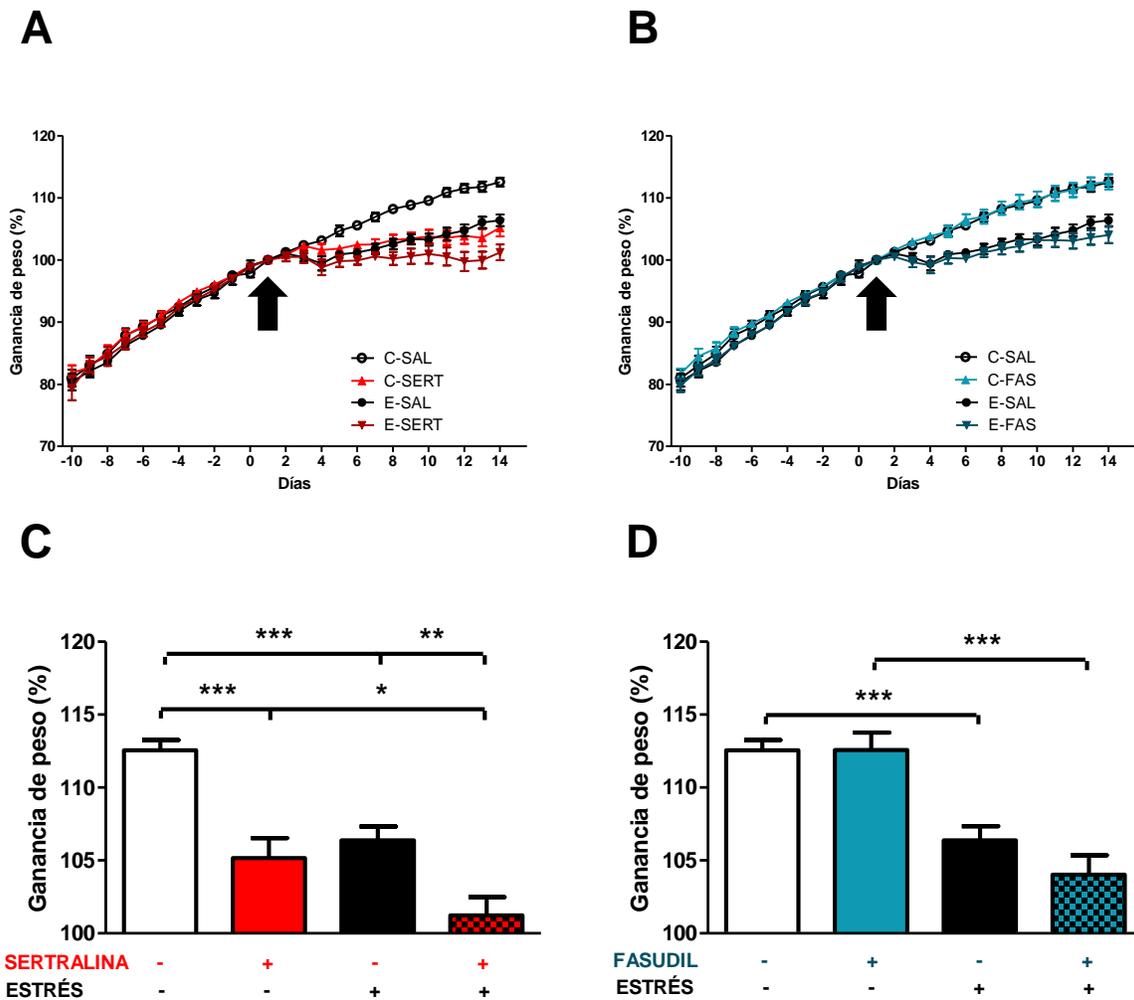


Figura 12. Ganancia de peso corporal. A/B) Los valores corresponden a los promedios \pm E.E.M. de los cambios en el peso corporal como porcentaje de los valores al inicio del tratamiento para los grupos Control (n=8), Control Sertralina (n=8), Control Fasudil (n=7), Estrés (n=6), Estrés Sertralina (n=6) y Estrés Fasudil (n=6). Las flechas negras indican el comienzo del tratamiento y/o de la restricción de movimiento. C/D) Las barras corresponden al último punto de los gráficos A y B (en el día 14 de tratamiento), lo cual representa el porcentaje total de cambio en ganancia de peso. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido del post test de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.1.2 Masa de glándulas adrenales y niveles de corticosterona sérica

El estrés por restricción de movimiento cambia parámetros fisiológicos relacionados a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Dhabhar et al., 1997), como por ejemplo un incremento en el tamaño de las glándulas suprarrenales o adrenales en modelos de estrés crónico (Magariños and McEwen, 1995). Por ello, se determinó el peso de las glándulas adrenales y los niveles de corticosterona sérica basal (en la mañana, cuando su secreción es mínima), posterior a la eutanasia de los animales. En la Figura 13 se muestra la masa de las glándulas adrenales y en la Tabla 8 los niveles de corticosterona sérica en cada grupo experimental. Se observa que el estrés y/o tratamiento no modificaron la masa de la glándula adrenal ni la secreción basal de corticosterona.

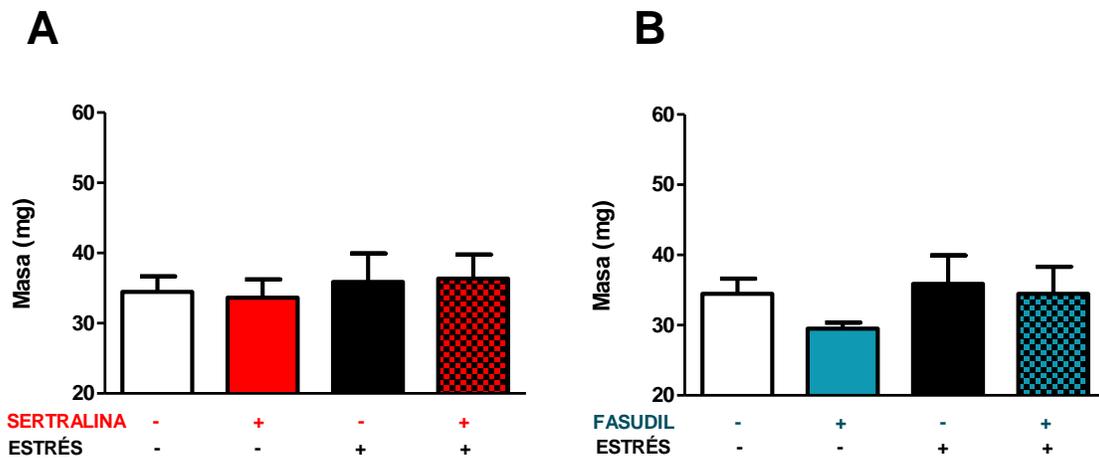


Figura 13. Masa glándulas adrenales. A/B) Los valores representan el promedio \pm E.E.M. de la masa de las glándulas adrenales para cada grupo experimental. N=8 (Control), N=8 (Control Sertralina), N=7 (Control Fasudil), N=6 (Estrés), N=6 (Estrés Sertralina) y N=6 (Estrés Fasudil). Los datos de las masas de las adrenales fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 8. Niveles de corticosterona sérica

GRUPO EXPERIMENTAL	CORTICOSTERONA ($\mu\text{g/dL}$)
Control	2,1 \pm 0,8
Control Sertralina	2,8 \pm 1,0
Control Fasudil	1,5 \pm 0,7
Estrés	1,9 \pm 1,5
Estrés Sertralina	2,7 \pm 0,9
Estrés Fasudil	4,7 \pm 1,8

Los valores representan el promedio \pm E.E.M. de los niveles de corticosterona sérica de los animales. N=6 (Control), N=5 (Control Sertralina), N=5 (Control Fasudil), N=4 (Estrés), N=4 (Estrés Sertralina) y N=4 (Estrés Fasudil). Los datos de las masas adrenales fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

5.1.3 Número de heces producidas durante el protocolo de estrés

El estrés promueve la defecación en las ratas, mediante efectos del aumento en la liberación de 5-HT y su acción sobre los receptores serotoninérgicos del colon y la liberación central de CRH (Nakade et al., 2007). Se determinó la cantidad de heces producidas diariamente por las ratas durante el período de estrés (2,5 horas) (Fig. 14 A) y el promedio de éstas durante los 14 días de este procedimiento (Fig. 14 B). Mediante el análisis de ANOVA de dos vías se determinó que el número de días de estrés afecta significativamente la producción de heces ($F(13,195) = 5,03, p < 0,001$), lo que da cuenta de una adaptación al estrés conforme pasan los días de aplicación del agente estresor.

Al promediar la cantidad de heces producidas en los 14 días de tratamiento, se estableció que el grupo de animales estresados y tratados con Sertralina y no con Fasudil mostró una disminución en aproximadamente 50% en este parámetro con respecto al estrés (E-SAL) (Figura 14 B). Estos resultados indican que la administración de Sertralina en los animales

estresados es capaz de disminuir la producción de heces durante las sesiones diarias de restricción. Adicionalmente se da cuenta de que tanto el grupo estrés (E-SAL), como el grupo estrés Fasudil (E-FAS) muestran niveles de producción de heces mayores a los de un animal control (Línea punteada en figura 14 B, datos del Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética), confirmando un aumento en la defecación de estos animales en el protocolo de estrés.

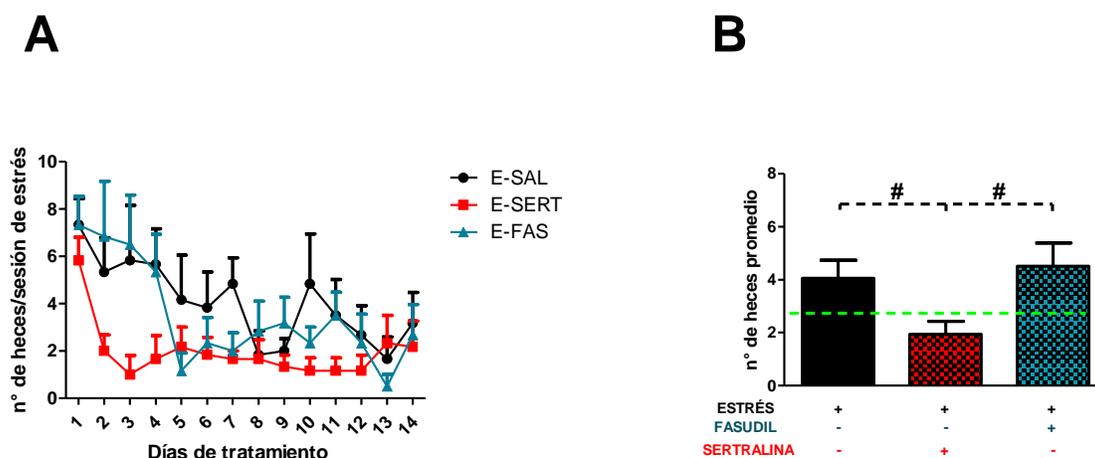


Figura 14. Determinación del número de heces durante el estrés. A) Producción de heces diaria: los puntos representan el promedio \pm E.E.M. de la cantidad de heces producidas durante todo el tratamiento de restricción. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías B) Producción promedio de heces diaria. Los valores son el promedio \pm E.E.M del número de heces diario durante el tratamiento de restricción. La línea punteada representa el número de heces correspondiente a un animal control (aproximadamente 2,5). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Mann Whitney (N=6 para todas las condiciones). # $p < 0,05$ (C-SAL vs E-SERT y E-SERT vs E-FAS).

5.1.4 Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre los niveles de transcritos de genes de activación temprana

Los genes tempranos inmediatos corresponden a genes que son activados de forma rápida y transitoria a nivel transcripcional. Esta regulación rápida que no requiere intermediarios proteicos es una característica fundamental que permite utilizar a estos transcritos como marcadores potenciales de actividad neuronal (Kubik et al., 2007). *c-Fos*

y *Arc* corresponden a transcritos que caben en esta definición y se han utilizado como marcadores de estrés de acuerdo a su rápida transcripción (minutos después del estímulo) (Shyu et al., 1991, Tzingounis and Nicoll, 2006). Uno de los inconvenientes más comunes en la utilización de modelos animales en investigaciones de este tipo corresponde al posible efecto del estrés por la eutanasia. Si bien este procedimiento se realiza de forma rápida es posible que los animales se estresen alterando de esta forma los resultados y la interpretación de éstos. De acuerdo a esto, y para tener un control más estricto de los animales utilizados en el estudio se evaluaron los niveles de genes de expresión temprana.

A través de qRT-PCR se determinaron los niveles del transcrito *Arc* y *c-Fos* (Figura 15), los cuales no mostraron diferencias, lo que indica que los animales no fueron estresados durante el proceso de eutanasia.

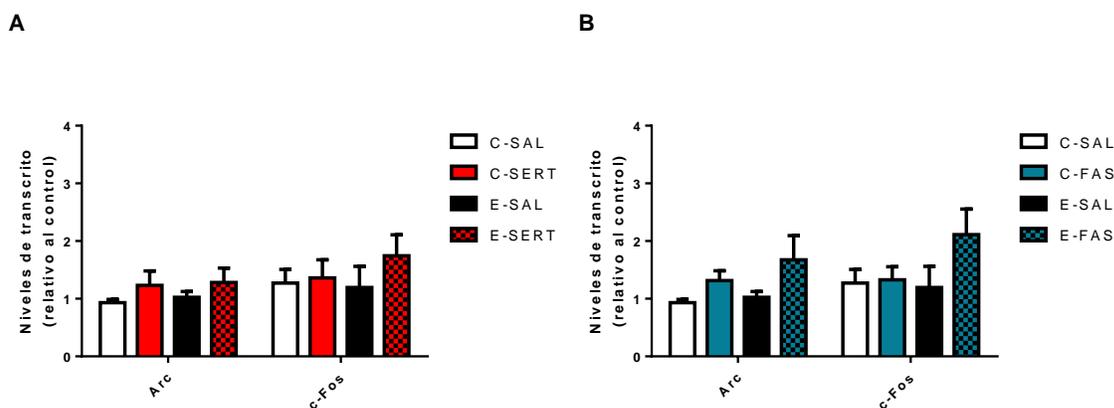


Figura 15. Evaluación de la activación de genes de activación temprana. A/B) Las barras muestran los niveles relativos de los transcritos de *Arc* y *c-Fos* (promedio \pm E.E.M) con respecto al control (C-SAL). Los datos fueron obtenidos mediante qRT-PCR y analizados por la prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney, sin encontrar diferencias significativas. N=5 para todas las condiciones experimentales.

5.2 Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la activación de la vía de supervivencia ERK-CREB-BCL-2 y los miRNAs que potencialmente regulan estas proteínas.

Se encuentra descrita la cascada transduccional en la que participan las proteínas ERK, CREB y BCL-2, como una vía antiapoptótica o asociada a la supervivencia celular (Lu and Xu, 2006). Estudios que utilizan un modelo de estrés prenatal han demostrado una asociación de las conductas tipo depresivas, como el aumento en la inmovilidad en el test de nado forzado, con una disminución en los niveles de activación de la vía ERK-CREB-BCL-2 (Guan et al., 2013) y además fármacos antidepresivos han mostrado ejercer acciones sobre los niveles de estas proteínas (Blendy, 2006, Murray and Hutson, 2007, Bravo et al., 2009, Di Benedetto et al., 2013). Dado los cambios observados en las proteínas asociadas a esta vía en los modelos de depresión y tras el tratamiento con los antidepresivos, se determinó si Fasudil es capaz de afectar los niveles de estas proteínas, su activación o bien modificar los niveles de los miRNAs que potencialmente las regulan, y de esta manera establecer una comparación con un antidepresivo como Sertralina.

5.2.1 Evaluación de los niveles de ERK2 y P-ERK2

La proteína ERK1/2 corresponde a una quinasa que participa activamente en vías de transducción de señales asociadas a plasticidad sináptica y procesos de supervivencia (Einat et al., 2003). ERK1/2 es activada por ciertas neurotrofinas, como BDNF, y es capaz de fosforilar a CREB (Figura 1, Introducción), posicionándola como una proteína relevante en el estudio de la depresión y los antidepresivos. Técnicamente resulta muy complicada la evaluación separada de ERK 1 y 2, de acuerdo a la similitud de sus pesos moleculares. Sin embargo, la gran homología que presentan permiten que la determinación exclusiva de ERK2 sea representativa de ambas (Buscà et al., 2016). Por estos motivos se evaluó de qué manera el estrés y los fármacos estudiados afectan los niveles de ERK2 y su grado de fosforilación. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas muestra que el estrés indujo un aumento de aproximadamente un 50% de incremento en los niveles de ERK2 (ERK2/ β -ACTINA); efecto que fue insensible al tratamiento con Sertralina como con Fasudil. Por otra

parte, en animales controles (sin estresar), Sertralina ($p < 0,05$; C-SAL vs C-SERT) (Fig. 16 A) y Fasudil ($p < 0,01$; C-SAL vs C-FAS) (Fig. 16 B) produjeron un aumento en los niveles de ERK2, en una magnitud similar a la inducida por el estrés crónico. La fosforilación de ERK2 (*Tyr 204*) corresponde a una modificación post traduccional que da cuenta del estado de activación de esta quinasa (Einat et al., 2003), por lo que resultó interesante la evaluación de los niveles de P-ERK2. Los resultados mostraron que solamente Sertralina administrada crónicamente en animales controles produjo un aumento en los niveles de P-ERK2/ β -ACTINA ($p < 0,05$; C-SAL vs C-SERT) (Fig. 16 C). Sin embargo, la razón P-ERK2/ERK2 no varió en las diferentes condiciones experimentales (Fig. 16 E). Esto sugiere que tanto los niveles totales de la proteína como aquellos que se encuentran fosforilados aumentaron de forma concomitante.

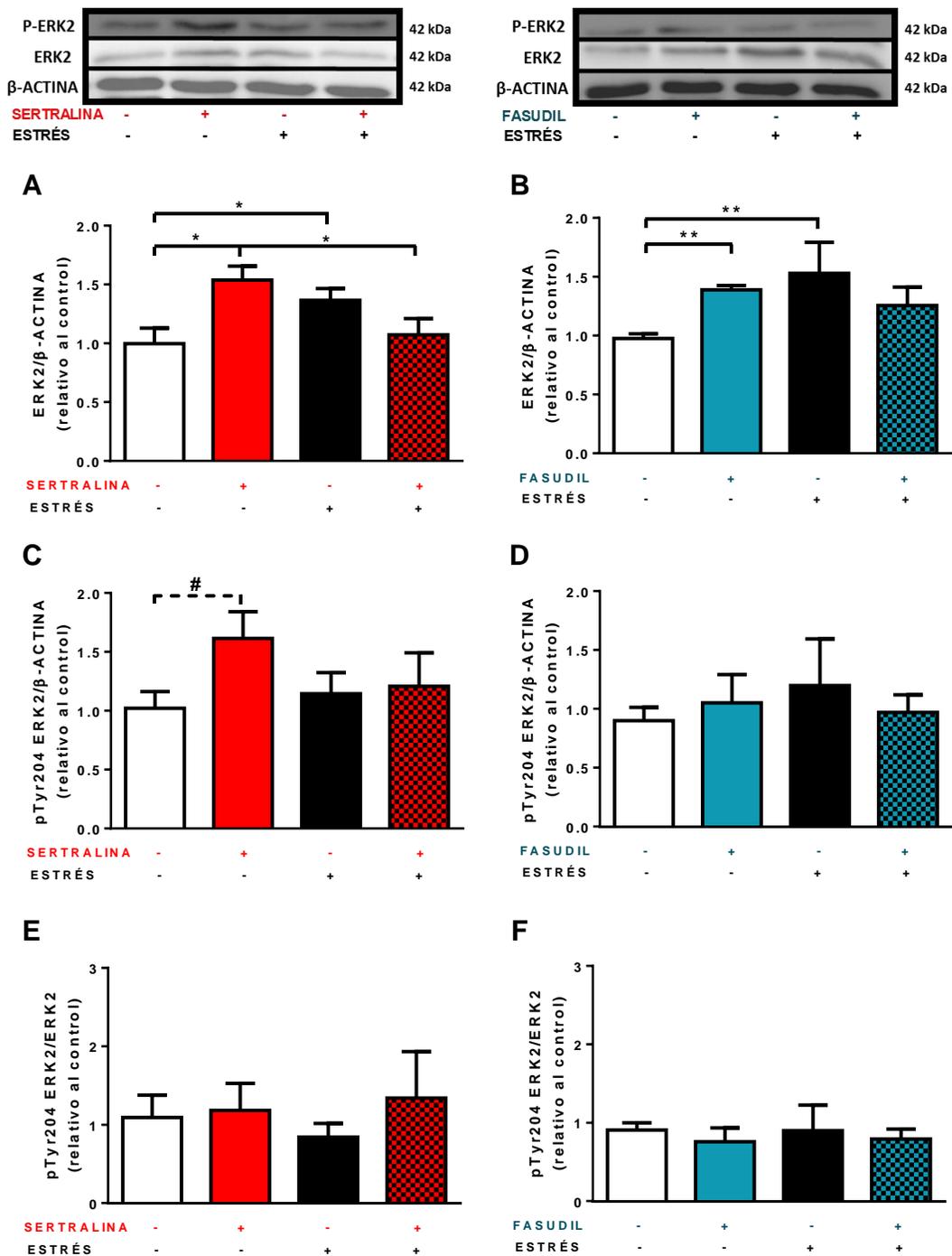


Figura 16. Determinación de los niveles de ERK2 y P-ERK2. La parte superior de la figura muestra los *Inmunoblots* representativos de las proteínas evaluadas. Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. del análisis densitométrico de los niveles de: A/B) ERK2 total normalizado por β -ACTINA; C/D) P-ERK2 normalizado por β -ACTINA y E/F) P-ERK2 expresada como razón con respecto a ERK2 total. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney). # $p < 0,05$ (prueba de Mann Whitney). N=5 para todas las condiciones experimentales.

5.2.2 Evaluación de los niveles de CREB y P-CREB

CREB corresponde a un factor de transcripción que juega un papel importante en vías de transducción de señales relacionadas a la depresión, e históricamente ha sido ligado a la acción de los antidepresivos (Blendy, 2006). Esta proteína es activada por diversas quinasas entre ellas ERK2. CREB fosforilado es capaz de regular transcripcionalmente a BDNF, BCL-2 y otras proteínas relacionadas a la supervivencia celular (Lonze and Ginty, 2002). De acuerdo a estos antecedentes, se evaluaron los niveles de CREB total y fosforilado (P-CREB).

El estrés promovió un aumento significativo de aproximadamente un 50% en la cantidad total de CREB (CREB/ β -ACTINA) con respecto al grupo control (Fig. 17 A y B). Este efecto fue prevenido por Sertralina ($p < 0,05$; E-SAL vs E-SERT) (Fig. 17 A), pero no por Fasudil (Fig. 17 B). En animales controles se observó que tanto Sertralina ($p < 0,01$; C-SAL vs C-SERT) (Fig. 17 A), como Fasudil ($p < 0,01$; C-SAL vs C-FAS) (Fig. 17 B) aumentaron la cantidad total de CREB, en una magnitud similar a la inducida por el estrés crónico. La Figura 17 (C y D) muestra los niveles de la fosforilación activante de CREB (*Ser133*), normalizado por β -ACTINA. El análisis densitométrico reveló que el estrés ($p < 0,05$; C-SAL vs E-SAL), al igual que el tratamiento crónico con Sertralina y Fasudil en animales controles y estresados ($p < 0,05$) aumentó los niveles de P-CREB. Al determinar la proporción de P-CREB con respecto a CREB total (Fig. 17 E y F) se determinó un aumento significativo ($p < 0,05$) en la razón P-CREB/CREB en el grupo de animales estresados que recibieron Sertralina (E-SERT) y Fasudil (E-FAS). Todos estos resultados indicaron un patrón similar entre ambos fármacos.

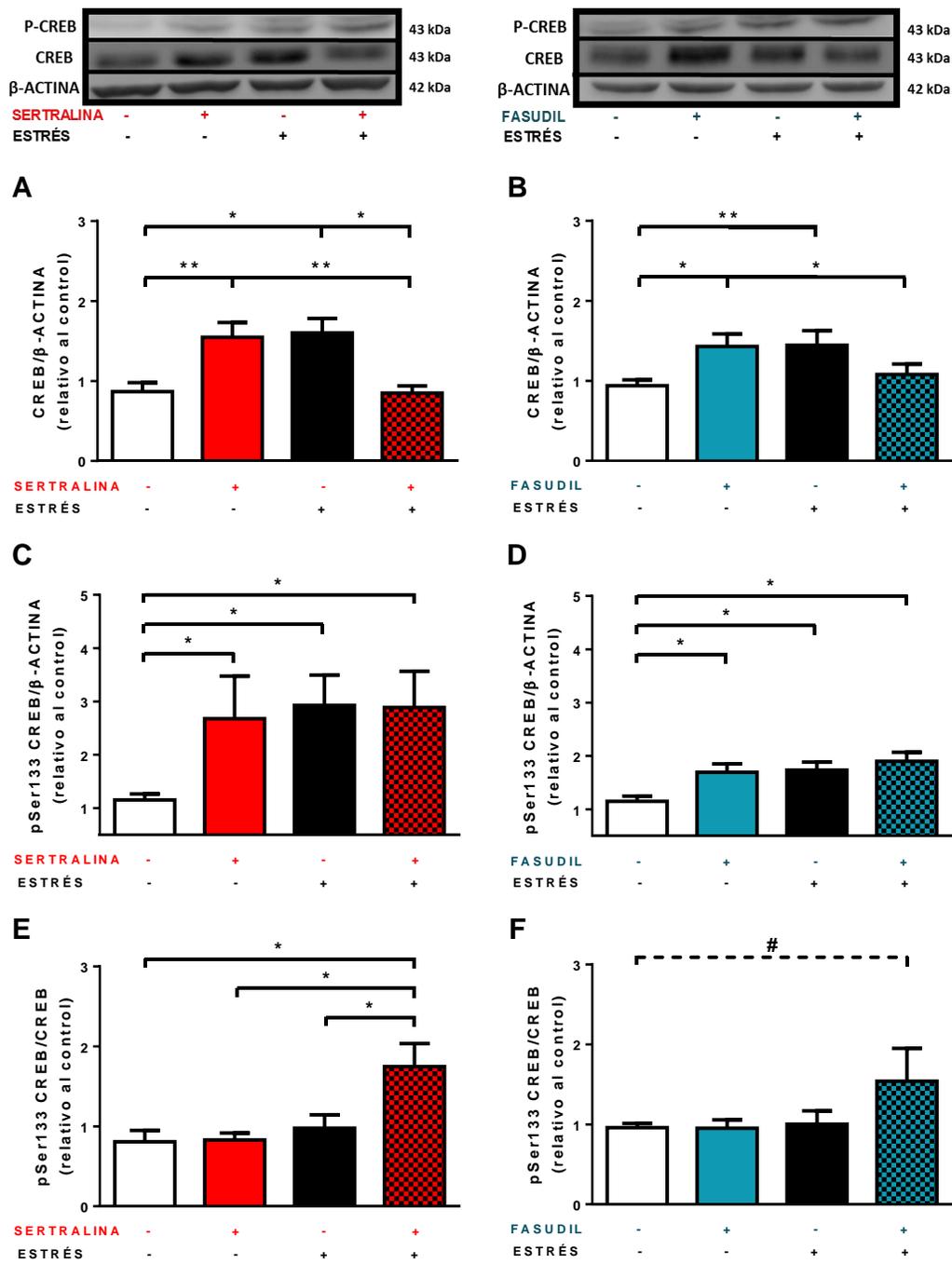


Figura 17. Determinación de los niveles de CREB Y P-CREB. La parte superior de la figura muestra los *Inmunoblots* representativos de las proteínas evaluadas. Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. del análisis densitométrico de los niveles de: A/B) CREB total normalizado por β -ACTINA; C/D) P-CREB normalizado por β -ACTINA y E/F) P-CREB expresada como razón con respecto a CREB total. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney). # $p < 0,05$ (prueba de Mann Whitney). N=5 para todas las condiciones experimentales.

5.2.2.1 Evaluación de los niveles del transcrito de CREB

Antecedentes muestran que administración de antidepresivos como Fluoxetina induce un incremento en los niveles del transcrito de CREB (Tiraboschi et al., 2004). De acuerdo a esto, se determinó si Fasudil al igual que otros antidepresivos incrementan los niveles de transcrito de CREB lo que explicaría el incremento producido en los niveles de su proteína. El estrés crónico no indujo cambios en los niveles del mRNA de CREB en el hipocampo respecto al control. No obstante, la Sertralina administrada en animales controles (C-SERT) y en animales estresados (E-SERT) indujo un aumento significativo ($p < 0,05$) de los niveles del transcrito de CREB (Fig. 18 A). Mientras que, Fasudil aumentó los niveles del transcrito de CREB, pero solo en un contexto de estrés ($p < 0,05$; E-SAL vs E-FAS).

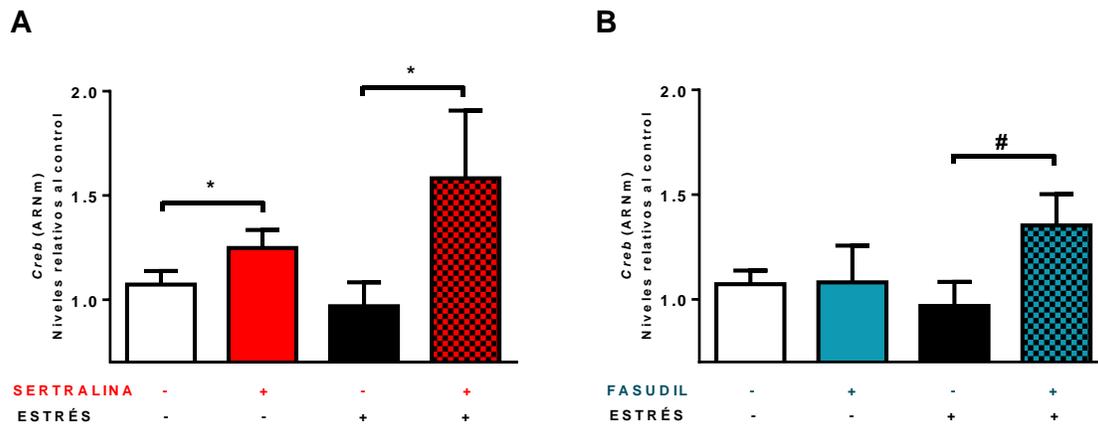


Figura 18. Evaluación de los niveles del transcrito de CREB. Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. de los niveles del transcrito de la proteína CREB normalizado por el transcrito de β -ACTINA y relativizados con respecto al control. * $p < 0,05$ (Prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney). # $p < 0,05$ (prueba de Mann Whitney). $N=5$ para todas las condiciones experimentales.

5.2.2.2 Evaluación de los niveles de miRNAs que regulan potencialmente a CREB: miR-134 y miR-485

Se encuentra reportado que el factor transcripcional CREB corresponde a un blanco del miR-134 (Bicker et al., 2014). De acuerdo a esto, este miRNA, a través de la regulación traduccional de CREB, podría eventualmente tener una participación en la vía de sobrevivencia ERK-CREB-BCL-2. El miR-134, está presente en espinas dendríticas y se ha descrito que el estrés por inmovilización es capaz de inducir una reducción en sus niveles (Meerson et al., 2010). Por otra parte, estudios *in silico* de nuestro grupo han determinado que el transcrito de CREB puede ser blanco del miR-485. Se determinó que el estrés y/o el tratamiento farmacológico no indujeron variaciones en los niveles del miR-134 y 485 (Fig. 19).

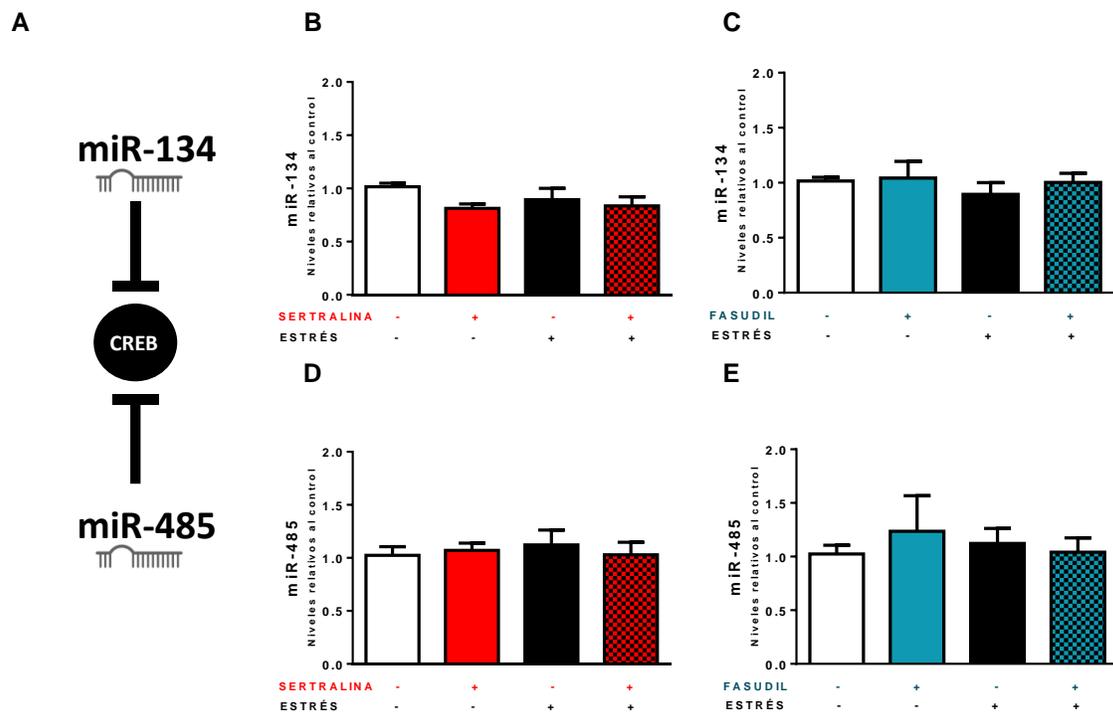


Figura 19. Determinación de los niveles de miR-134 y miR-485. A) La figura corresponde a la relación de regulación potencial entre miR-134, miR-485 y su blanco común CREB. B/C) Los gráficos muestran los niveles (promedio \pm E.E.M.) del miR-134, expresados como cantidad relativa con respecto al control (C-SAL) D/E) Los gráficos muestran los niveles (promedio \pm E.E.M.) del miR-485, expresados como cantidad relativa con respecto al control (C-SAL). Los datos fueron normalizados por SNORD95 y analizados mediante la Prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney, sin encontrar diferencias significativas. N=5 para todas las condiciones experimentales.

5.2.3 Evaluación de los niveles del transcrito de BCL-2

BCL-2 corresponde a una proteína antiapoptótica cuya transcripción es regulada por CREB (D'Sa and Duman, 2002). Se determinó que tanto Sertralina, como Fasudil incrementaron los niveles del transcrito de BCL-2, lo que ocurrió exclusivamente en un contexto de estrés ($p < 0,05$; E-SAL vs E-SERT/FAS) (Figura 20).

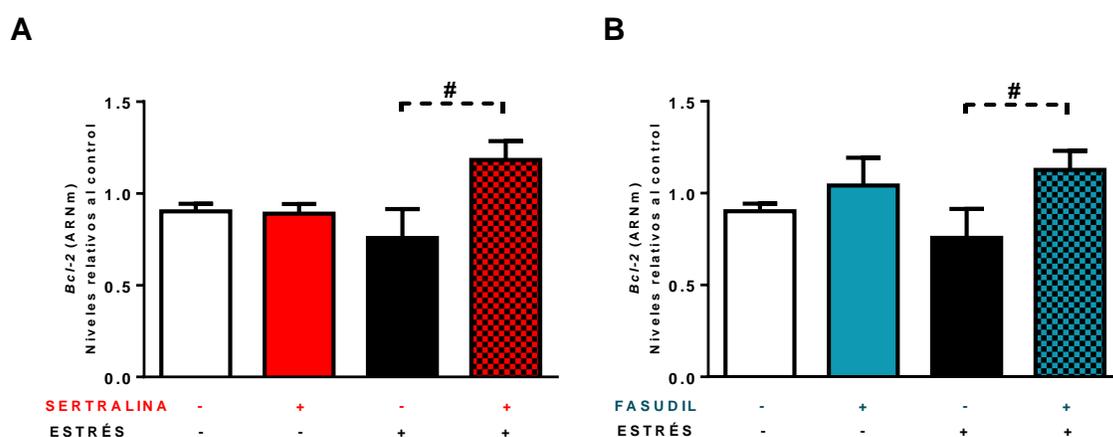


Figura 20. Evaluación de los niveles del transcrito de BCL-2. Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. de los niveles del transcrito de la proteína BCL-2 normalizado por el transcrito de β -ACTINA y relativizados con respecto al control. * $p < 0,05$ (Prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney). # $p < 0,05$ (prueba de Mann Whitney). N=5 para todas las condiciones experimentales.

5.2.4 Evaluación de los niveles de BCL-2

La proteína BCL-2 está relacionada con la neuroprotección, supervivencia y resiliencia celular (Youle and Strasser, 2008) y sus niveles son incrementados por antidepresivos en el hipocampo (Murray and Hutson, 2007, Bravo et al., 2009). Se determinó que tanto Sertralina (Fig. 21 A) como Fasudil (Fig. 21 B) produjeron un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en los niveles proteicos de BCL-2 cuando son administrados en animales controles. Más aún, el estrés o los fármacos en un contexto de estrés no modificaron los niveles de esta proteína.

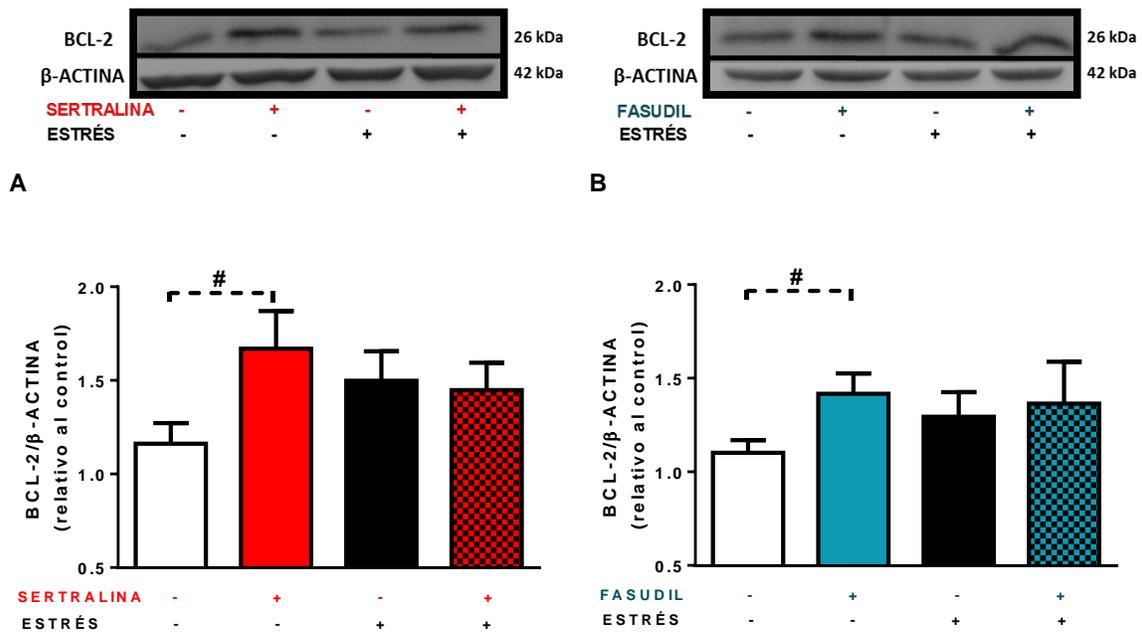


Figura 21. Determinación de los niveles de BCL-2. La parte superior de la figura muestra los *Inmunoblots* representativos de las proteínas evaluadas. A/B) Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. del análisis densitométrico de los niveles de la proteína BCL-2 normalizado por β -ACTINA. Los datos fueron analizados por la prueba de Mann Whitney; # $p < 0,05$. N=5 para todas las condiciones experimentales.

5.2.4.1. Evaluación de los niveles del miR-16

La fluoxetina ha mostrado disminuir los niveles del miR-16 en el hipocampo (Michan et al., 2010), lo que podría explicar el aumento en los niveles de su blanco proteico BCL-2 y consecuentemente el incremento en los procesos de neurogénesis y supervivencia (Launay et al., 2011) en este tejido. Se determinó el efecto del estrés y tratamientos farmacológicos sobre los niveles del miR-16 en el hipocampo.

La administración de Sertralina en animales no estresados disminuyó de manera significativa ($p < 0,05$) los niveles del miR-16 con respecto al grupo control (C-SAL vs C-SERT) (Figura 22 A). Mientras que, los animales estresados tratados con SERT no presentaron variación en los niveles del miR-16. Tanto el estrés como la administración de Fasudil no modificaron los niveles de este miRNA.

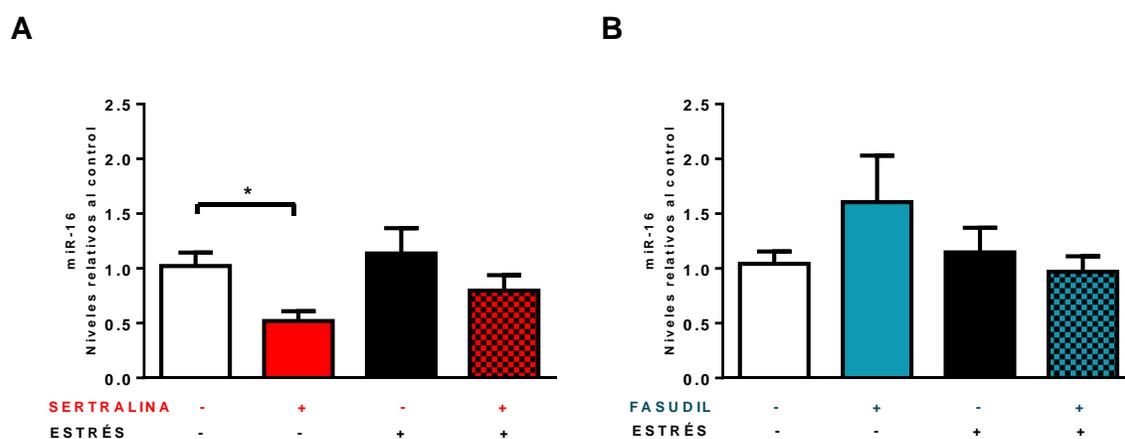


Figura 22. Determinación de los niveles del miR-16. A/B) Los gráficos muestran los niveles (promedio \pm E.E.M.) del miR-16, expresados como cantidad relativa con respecto al control (C-SAL) y normalizados por SNORD95. * $p < 0,05$ (Prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney). $N=5$ para todas las condiciones experimentales.

5.3 Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la densidad y morfología de espinas dendríticas hipocampales

Las espinas dendríticas proporcionan parte del sustrato funcional en donde se lleva a cabo la sinapsis. Tanto el estrés crónico como los antidepresivos son capaces de generar alteraciones morfológicas como en el tamaño, densidad y número de espinas dendríticas (Magarinos and McEwen, 1995, Magariños et al., 1999). Se evaluó el efecto del estrés, y de los fármacos Sertralina y Fasudil sobre la densidad de espinas dendríticas de las neuronas hipocampales de CA1. Considerando toda protrusión procedente desde la dendrita como espina. Además, cabe destacar que los datos fueron obtenidos desde dendritas apicales secundarias de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, dando cuenta de las sinapsis producidas entre los axones provenientes de CA3 y las dendritas de CA1 (Fig. 23 A).

El estrés produjo una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$; C-SAL vs E-SAL) en la densidad de espinas dendríticas, efecto que fue prevenido por la administración de Sertralina ($p < 0,05$; E-SAL vs E-SERT) (Fig. 23 C) y Fasudil ($p < 0,05$; E-SAL vs E-FAS) (Fig. 23 D). Ambos fármacos no alteraron la densidad de espinas dendríticas cuando fueron administradas en animales controles, sugiriendo un efecto diferencial en animales estresados. Para evaluar si los efectos descritos para el estrés y el tratamiento con los fármacos en estudio, cambiaron en función de la distancia desde la ramificación inicial en la dendrita, se analizó el número de espinas por segmento dendrítico (Figura 23 E y F). El análisis ANOVA de dos vías en los datos correspondientes a Sertralina, mostró un efecto significativo de la distancia ($F(9, 126) = 17,8$ $p < 0,001$) y de los tratamientos ($F(3,14) = 13,9$ $p < 0,001$), pero no existió una interacción significativa entre estos dos factores. Mientras que Fasudil, de forma similar, mostró un efecto significativo de la distancia ($F(9, 150) = 6,37$ $p < 0,001$) y de los tratamientos ($F(3,150) = 44,2$ $p < 0,001$), pero tampoco existió una interacción significativa entre estos dos factores. El análisis posterior (test de Bonferroni) mostró que el estrés disminuye la densidad de espinas a lo largo de la dendrita con respecto al control. Sin embargo, el efecto de Sertralina en animales estresados se concentró en la zona más distal de la dendrita (Fig. 23 E). Por su parte Fasudil presentó cambios estadísticamente significativos (post test de Bonferroni) en la mayoría de los segmentos dendríticos analizados (Fig. 23 F).

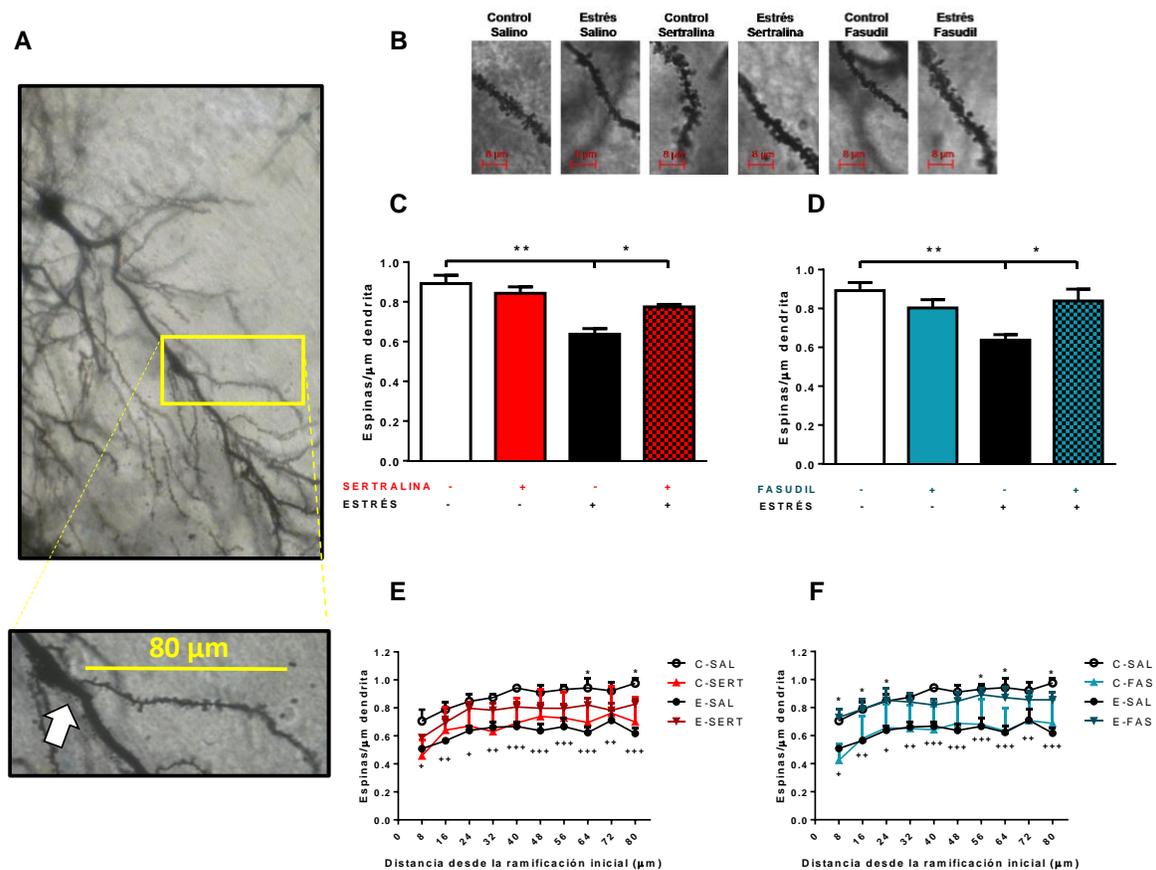


Figura 23. Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la densidad de espinas dendríticas. A) La imagen corresponde a una neurona piramidal de la zona CA1 del hipocampo y una dendrita apical magnificada utilizada para determinar la densidad de espinas dendríticas en un segmento de 80 μm desde la ramificación inicial (flecha blanca). B) Los cuadros representan segmentos dendríticos representativos para cada condición experimental estudiada. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). E/F). C/D) Los gráficos de barra (promedio \pm E.E.M) muestran el efecto del tratamiento (Sertralina o Fasudil) y el estrés en el número total de espinas dendríticas en un segmento de 80 μm . Los puntos representan el promedio \pm E.E.M. del número de espinas dendríticas en segmentos de 8 μm desde el inicio de la ramificación en la dendrita secundaria hasta 80 μm . Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni. Control v/s Estrés (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$); Estrés v/s Estrés Fasudil o Sertralina * $p < 0,05$. N=5 (C-SAL; E-SAL; E-FAS), N=4 (C-SERT; C-FAS; E-SERT).

Las espinas dendríticas pueden adoptar diversas formas como: filopodios, delgadas, en forma de copas o en forma de callampas, siendo éstas últimas las funcionales para los contactos sinápticos (Ethell and Pasquale, 2005). Con el objetivo de evaluar un efecto diferencial en función de la forma de la espina, se determinó la densidad de las espinas dendríticas de tipo callampa y del resto de las espinas (espinas totales – espinas tipo callampa), las cuales incluyen filopodios y las formas de espinas antes mencionadas.

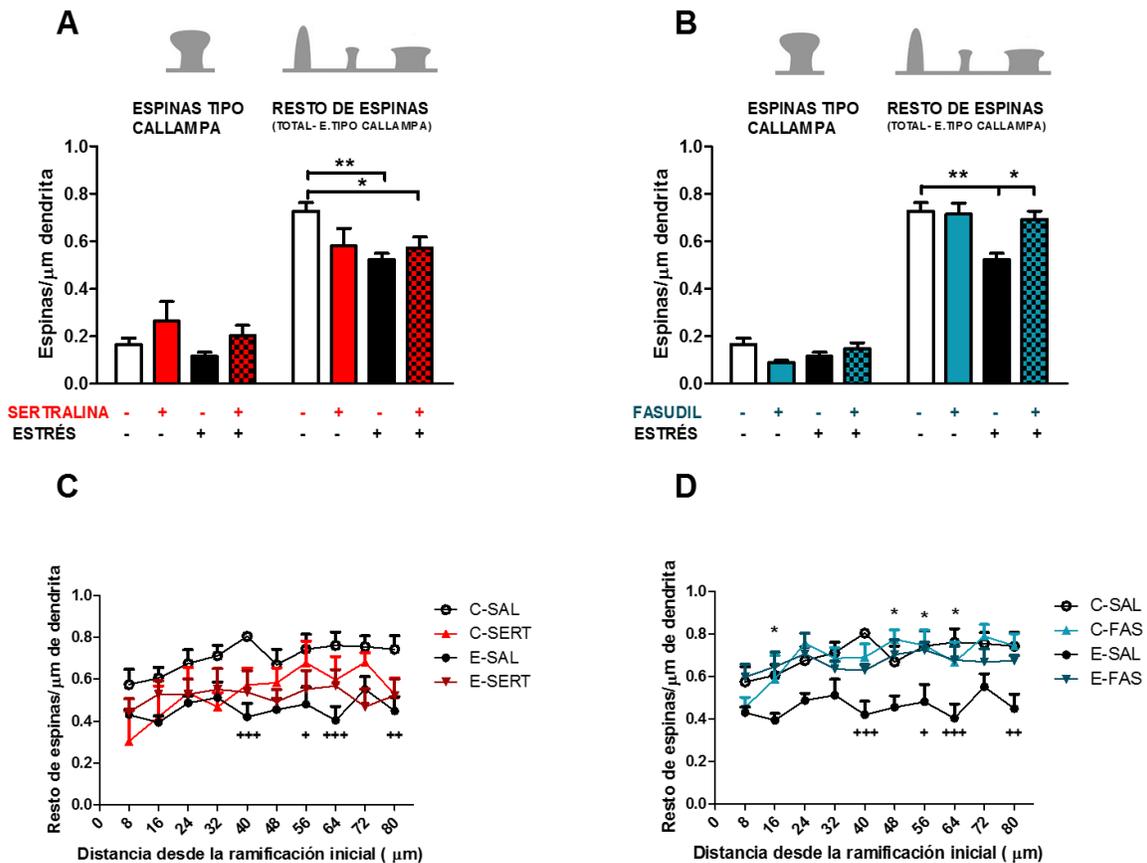


Figura 24. Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la morfología de espinas dendríticas. A/B) Las barras representan el promedio \pm E.E.M. de las espinas tipo callampa (barras de la izquierda) o del resto de las espinas (barras de la derecha) por μm de dendrita. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). C/D) Los puntos representan el promedio \pm E.E.M. de la razón espinas tipo callampa/espinas totales en segmentos de $8 \mu\text{m}$ desde la ramificación inicial de la dendrita secundaria hasta los $80 \mu\text{m}$. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni. Control v/s Estrés (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$); Estrés v/s Estrés Fasudil o Sertralina * $p < 0,05$. $N=5$ (C-SAL; E-SAL; E-FAS), $N=4$ (C-SERT; C-FAS; E-SERT).

La reducción en la densidad de espinas inducida por el estrés ocurrió en las espinas diferentes a las espinas tipo callampa ($p < 0,01$; C-SAL vs E-SAL) (Fig. 24 A y B); sugiriendo que la disminución estaría asociada a las espinas “inmaduras”. Por otra parte, el tratamiento con Fasudil en animales estresados previno la reducción en las espinas diferentes a las espinas tipo callampa ($p < 0,05$; E-SAL vs E-SERT). Sin embargo, en el caso de animales estresados y tratados con Sertralina existió una leve tendencia al aumento en las espinas tipo callampa, la que no llegó a ser estadísticamente significativa (Fig. 24 A), sugiriendo que su efecto estaría repartido entre los diferentes tipos de espinas dendríticas. Efectos similares se observaron cuando se determinó la densidad de espinas en función de la distancia desde la ramificación inicial (Fig. 24 C y D) indicando que los efectos de los fármacos no dependieron de la distancia desde la ramificación inicial en el segmento dendrítico.

5.4 Efecto del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre los niveles de proteínas relacionadas a remodelamiento de espinas dendríticas y los miRNAs que potencialmente las regulan

Las proteínas asociadas a remodelamiento de espinas, corresponden a los efectores moleculares de los cambios morfológicos en la densidad de espinas dendríticas (Ethell and Pasquale, 2005, Duman and Duman, 2015). Determinar el efecto de los fármacos antidepresivos sobre los niveles de estas proteínas entrega información valiosa con respecto a las vías y mecanismos que probablemente pueden dar cuenta del mecanismo de acción farmacológica. Para evaluar los efectos del estrés crónico y de los fármacos Sertralina y Fasudil, se determinaron los niveles de las proteínas relacionadas con el remodelamiento de espinas dendríticas, específicamente de las vías asociadas a las GTPasas de la familia Rho. Adicionalmente se determinaron los niveles de miRNAs que se relacionan a estas vías transduccionales.

5.4.1 Evaluación de los niveles de LIMK Y P-LIMK

La proteína LIMK es regulada por diversas cascadas de transducción de señales, principalmente mediante GTPasas de la familia Rho para influenciar en la arquitectura del citoesqueleto de actina. LIMK es activada por RAC1 y en ese estado es capaz de fosforilar a la proteína cofilina, estabilizando la espina dendrítica (Lai and Ip, 2013). Se evaluaron los niveles de LIMK total y de su fosforilación activante, sin encontrar diferencias significativas (Fig. 25).

Por otro lado, la proteína LIMK fue descrita como blanco de miR-134 (Schratt et al., 2006); sin embargo, en este trabajo los niveles del miR-134 (Fig. 19 B y C), al igual que LIMK no mostraron variaciones en ningún grupo experimental utilizado.

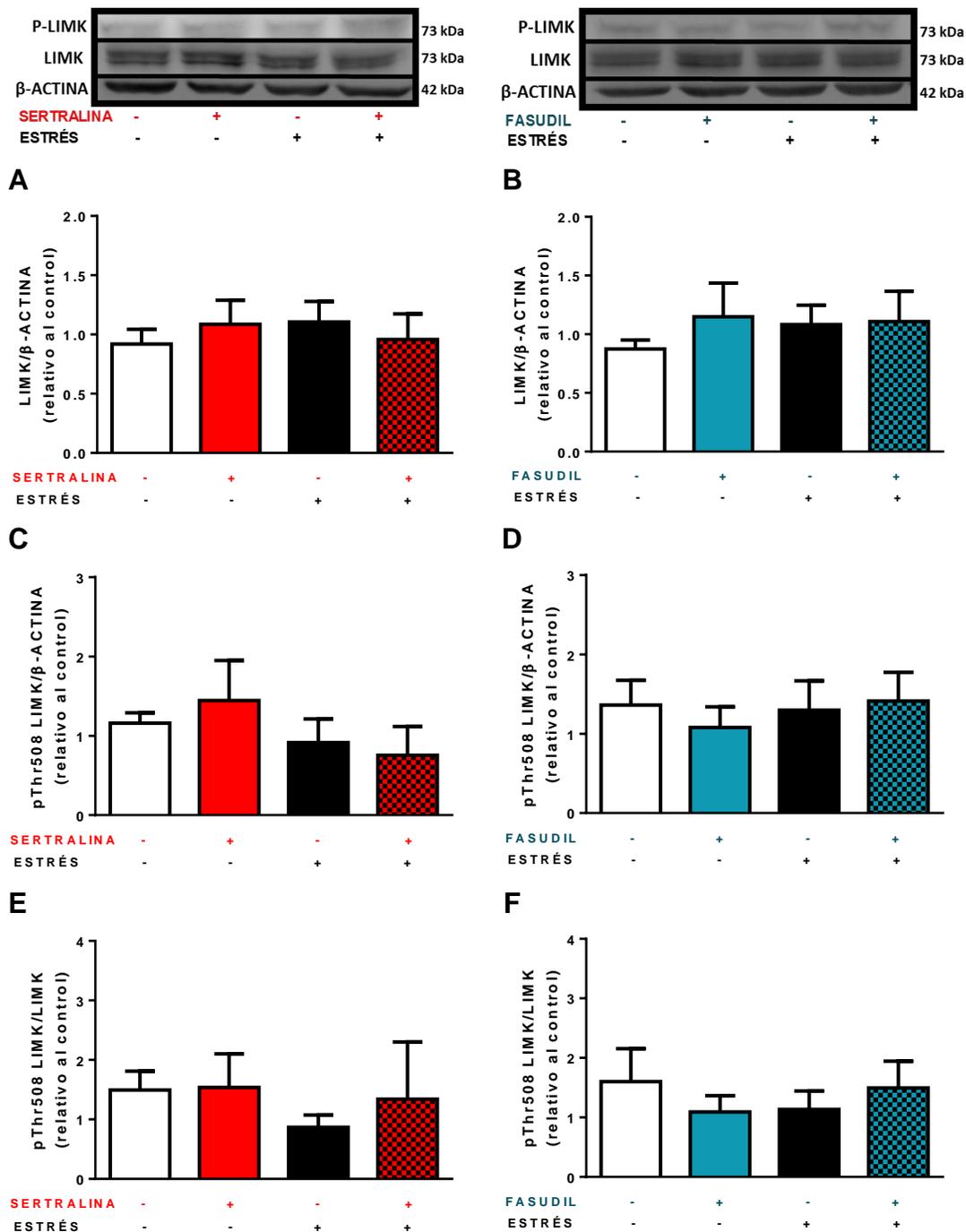


Figura 25. Determinación de los niveles de LIMK Y P-LIMK. La parte superior de la figura muestra los *Inmunoblots* representativos de las proteínas evaluadas. Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. del análisis densitométrico de los niveles de: A/B) LIMK total normalizado por β -ACTINA; C/D) P-LIMK normalizado por β -ACTINA y E/F) P-LIMK expresada como razón con respecto a LIMK total. Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney, sin encontrar diferencias significativas. N=5 para todas las condiciones experimentales.

5.4.2 Evaluación de los niveles de RHOA

La proteína RHOA corresponde a una GTPasa de la familia Rho, cuyo efector es la quinasa ROCK. Hemos demostrado que el estrés activa la vía Rho-ROCK (Garcia-Rojo et al., 2017). Se determinó que el estrés induce un incremento en los niveles de RHOA ($p < 0,05$; C-SAL vs E-SAL) y este efecto no fue prevenido por Sertralina ni Fasudil (Fig. 26 A).

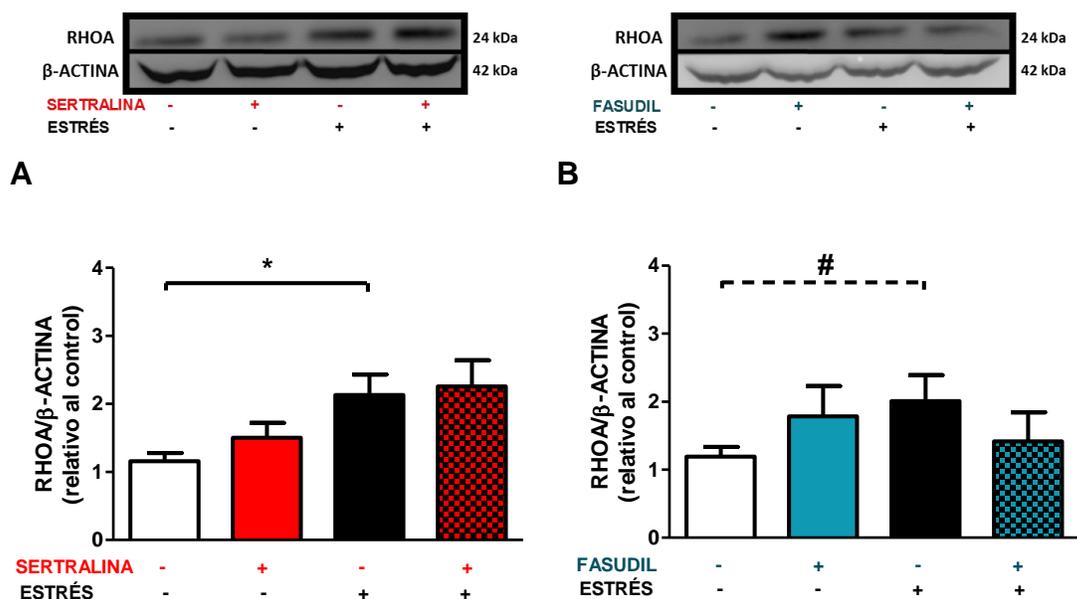


Figura 26. Determinación de los niveles de RHOA. La parte superior de la figura muestra los *Inmunoblots* representativos de las proteínas evaluadas. A/B) Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. del análisis densitométrico de los niveles de la proteína RHOA normalizado por β -ACTINA. * $p < 0,05$ (Prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney). # $p < 0,05$ (prueba de Mann Whitney). N=5 para todas las condiciones experimentales.

5.4.3 Evaluación de los niveles de APT-1

APT-1 corresponde a una proteína que regula el nivel de palmitoilación de proteínas que intervienen en cascadas transduccionales involucradas en el control del volumen de espinas dendríticas, como la proteína RHOA (Siegel et al., 2009). La figura 27 muestra los resultados *del immunowestern blot* para APT-1, los que no mostraron diferencias significativas en ningún grupo experimental.

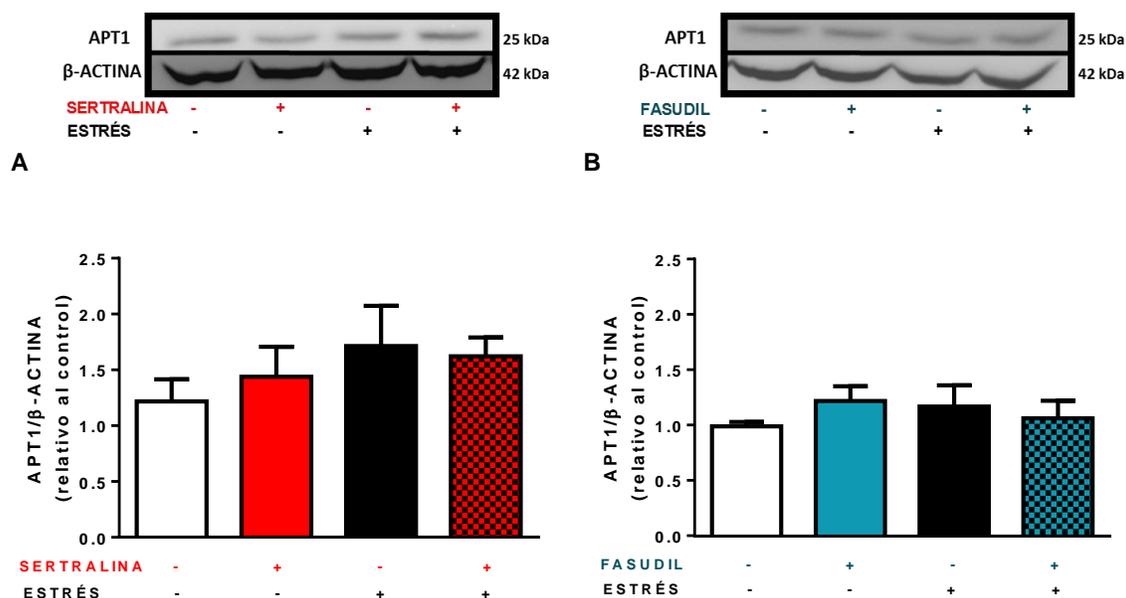


Figura 27. Determinación de los niveles de APT-1. La parte superior de la figura muestra los *Immunoblots* representativos de las proteínas evaluadas. A/B) Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. del análisis densitométrico de los niveles de la proteína APT-1 normalizado por β -ACTINA. Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney, sin obtener diferencias estadísticamente significativas. N=5 para todas las condiciones experimentales.

5.4.3.1 Evaluación de los niveles del miR-138

El miR-138 corresponde a un miRNA relacionado con el remodelamiento de espinas dendríticas (Bicker et al., 2014). Este miRNA tiene como blanco validado al mRNA que codifica para la proteína APT-1 (Siegel et al., 2009). Así, el incremento en el miR-138 aumenta los niveles de Gα13 palmitoilada en la membrana plasmática, resultando en una activación de la vía RHOA/ROCK y en la reducción en el tamaño de espinas (Siegel et al., 2009). Si bien, en este trabajo no se observaron cambios en los niveles de la proteína APT-1, un antecedente reciente de nuestro Laboratorio mostró un aumento de los niveles del miR-138 en hipocampo dorsal de ratas sometidas a estrés crónico (Castaneda et al., 2015). La figura 28, muestra los resultados de la evaluación del estrés y el tratamiento farmacológico sobre los niveles del miR-138.

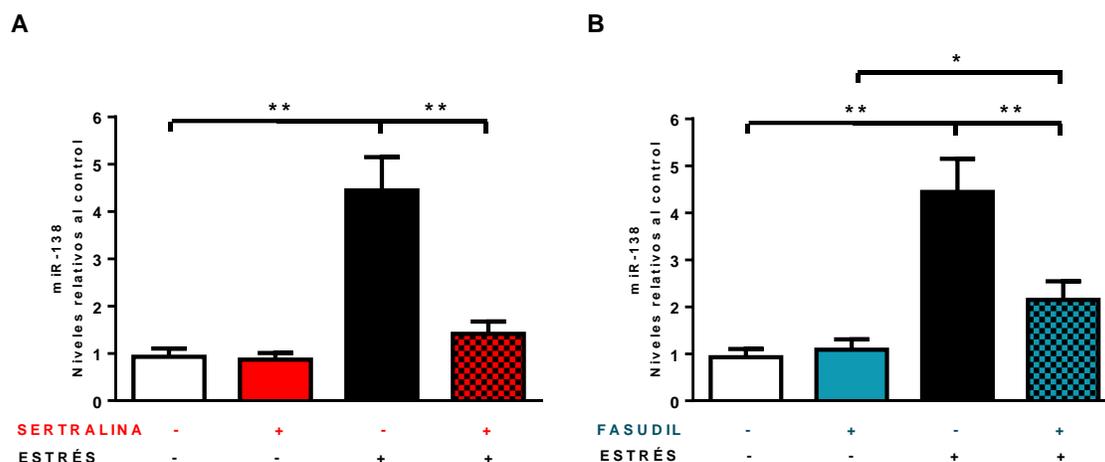


Figura 28. Determinación de los niveles de miR-138. A/B) Los gráficos muestran los niveles (promedio \pm E.E.M.) del miR-138, expresados como cantidad relativa con respecto al control (C-SAL) y normalizados por SNORD95. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney). $N=5$ para todas las condiciones experimentales.

El estrés crónico incrementó de forma significativa ($p < 0,01$) los niveles del miR-138. El cambio generado por el estrés fue de 4 veces los niveles del control. Este aumento en los niveles del miR-138 producido por el estrés, fue prevenido totalmente en el grupo que recibió Sertralina (E-SERT) (Fig. 28 A) y parcialmente por Fasudil ($p < 0,05$; E-SAL vs E-FAS). (Fig. 28 B). Adicionalmente cabe destacar que los fármacos no mostraron variaciones en los niveles del miR-138 cuando fueron administradas en animales sin estresar (C-SERT y C-FAS).

Aunque los niveles protéicos de APT1-1 no mostraron diferencias significativas, se determinó si el estrés y el tratamiento farmacológico afectaban los niveles de su transcrito. Se determinó que los niveles del mRNA de APT1 no se modificó en ninguna de las condiciones experimentales (Figura 29).

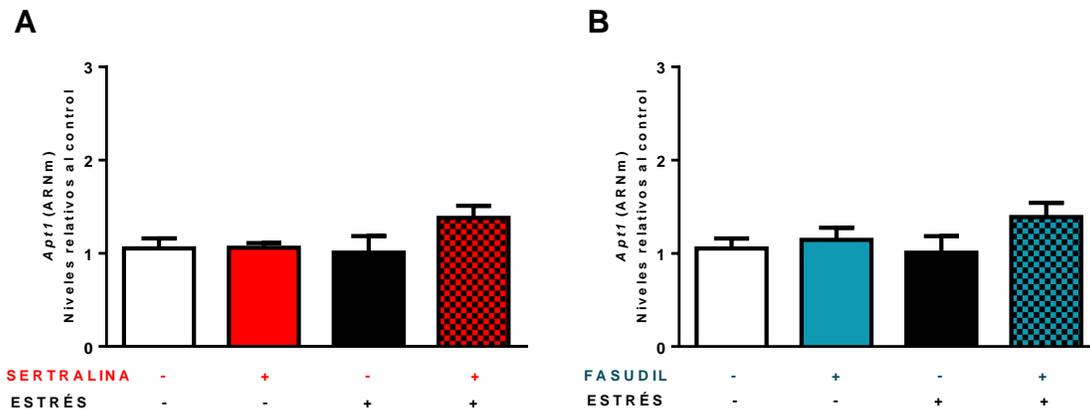


Figura 29. Determinación de los niveles del transcrito de APT-1. A/B) Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. de los niveles del transcrito de la proteína APT-1 normalizado por el transcrito de β -ACTINA. Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney sin encontrar diferencias significativas. N=5 para todas las condiciones experimentales.

5.5 Determinación los blancos y las vías transduccionales potencialmente asociadas al miR-138

Los miRNAs son moléculas que regulan la traducción a través de la interacción con sus transcritos blancos. Éstos pueden ser determinados *in silico* mediante la predicción de alineamientos de su secuencia con los mRNAs existentes en un organismo determinado. En la actualidad se cuenta con diversos *softwares* y sitios web de acceso libre que permiten entregar información sobre los blancos más probables de un miRNAs o los miRNAs que con más probabilidad puedan interactuar con algún transcrito en particular. De acuerdo a diferentes algoritmos utilizados por estos programas se asigna un puntaje o *score*, que da cuenta de la probabilidad de que esa interacción ocurra en un contexto real. A pesar de esta novedosa y útil forma de predecir dichas interacciones, éstas no siempre tienen un correlato perfecto con el efecto evaluado experimentalmente. De acuerdo a esto, la validación experimental entrega un puntaje y una seguridad de la interacción muchísimo mayor y es una comprobación fundamental en el estudio de los miRNAs. A través de una colaboración del Dr. John Cidlowski (NIEHS, EE.UU.) se ha permitido tener acceso al *software* INGENUITY® *Pathway analysis*, que permitió entregar información acerca de los blancos y las vías de transducción de señales asociadas al miR-138. Este análisis entregó una lista de candidatos que ascendió a 682 blancos. Al filtrar los resultados validación experimental, el sistema entregó 8 candidatos (los que se detallan en la Tabla 9).

Tabla 9. Blancos del miR-138 experimentalmente descritos según el *software* INGENUITY®.

miRNA	BASE DE DATOS	SÍMBOLO DEL GEN
rno-miR-138-5p	miRecords	ALDH1A2
rno-miR-138-5p	miRecords	KRT19
rno-miR-138-5p	TargetScan	APT-1
rno-miR-138-5p	TargetScan, miRecords	RHOC
rno-miR-138-5p	TargetScan, miRecords	ROCK2
rno-miR-138-5p	TarBase	SLC45A3
rno-miR-138-5p	TarBase, TargetScan	TERT
rno-miR-138-5p	miRecords	VCAN

En la tabla se muestra el resultado obtenido al filtrar los blancos del miR-138 según su validación experimental. Además, se indica la base de datos de la cual el *software* INGENUITY® recopiló la información.

Si bien, los blancos experimentalmente validados corresponden a una confirmación de las predicciones computacionales, es necesario indicar que la gran mayoría de las proteínas potencialmente asociadas al miR-138 no han sido validadas experimentalmente.

La integración de los potenciales blancos en vías de transducción en las que participan, permite entregar información valiosa acerca de la funcionalidad y de las eventuales redes involucradas en la regulación por parte de los diferentes miRNAs. Adicionalmente, mediante un análisis más profundo e integrativo de los blancos, que permite el *software* INGENUITY®, se determinaron las vías biológicas y las redes de interacción mayormente relacionadas. La Tabla 10 y la Figura 30 muestran las redes y vías de transducción de señales potencialmente asociadas al miR-138, de acuerdo a sus blancos putativos y experimentalmente validados.

Tabla 10. Funciones de los blancos potenciales de miR-138 en las diferentes redes de señalización asociadas

FUNCIONES EN REDES ASOCIADAS	PUNTAJE
Enfermedades infecciosas, morfología celular, función y mantenimiento celular	45
Replicación de ADN, recombinación y reparación, cáncer	45
Cáncer y enfermedades gastrointestinales	45
Desarrollo, crecimiento y proliferación celular, y función del sistema nervioso	42
Ciclo celular, señalización e interacción célula a célula, crecimiento y proliferación	41

En la tabla se muestran los cinco grupos de funciones vinculadas a los blancos potenciales del miR-138 con un mayor puntaje de asociación. Los parámetros que determinan las redes indicadas y sus puntajes, corresponden a parámetros obtenidos desde el *software* **INGENUITY**[®]

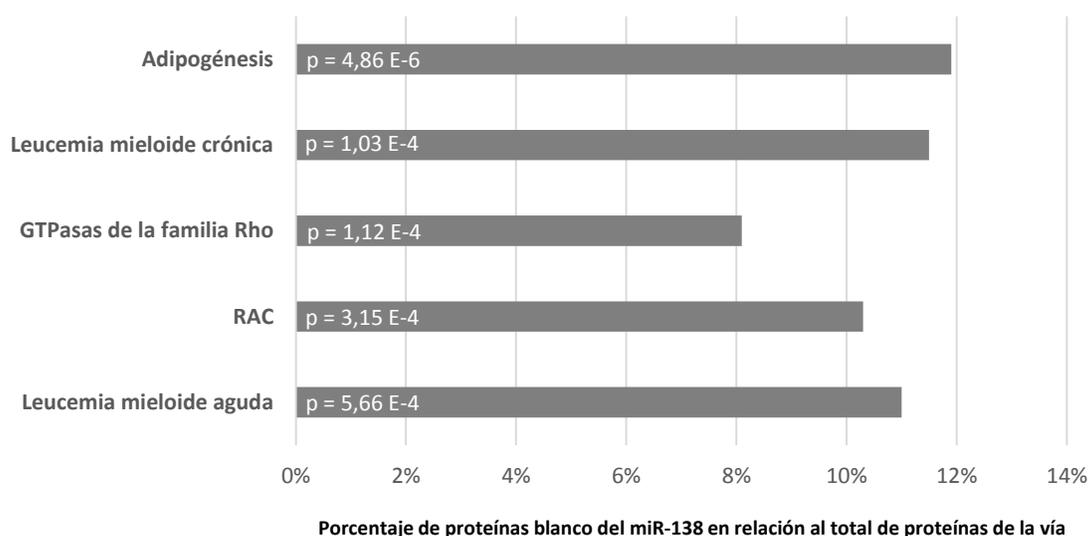


Figura 30. Vías de transducción de señales relacionadas a los blancos potenciales del miR-138 según el *software* **INGENUITY[®].** En la gráfica se muestran las vías de transducción canónicas mayormente relacionadas de acuerdo al análisis mediante el *software* **INGENUITY**[®]. En cada barra se indica el valor de *P* correspondiente a la significancia de la asociación de los blancos del miRNA y las vías indicadas. Además, en el eje X, se indica el porcentaje de las proteínas que son identificadas como blancos del miRNA, con respecto a las proteínas totales que integran cada vía.

El análisis realizado muestra una gran asociación de los blancos potenciales del miR-138 con las vías correspondientes a las GTPasas de la familia Rho y a la cascada transduccional relacionada a la proteína RAC. (Fig. 31).

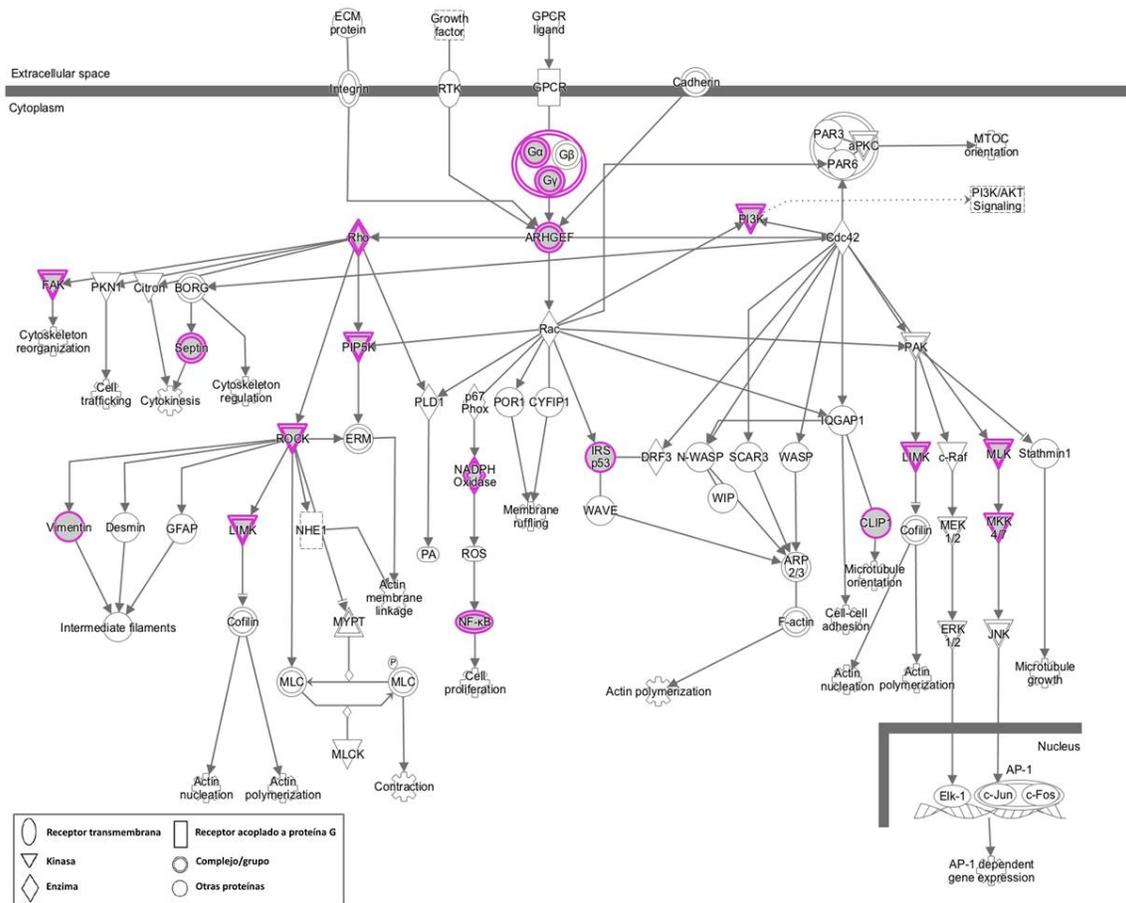


Figura 31. Blancos de miR-138 en las vías de señalización asociadas a proteínas de la familia Rho. Los símbolos coloreados en lila indican los blancos propuestos por el *software* INGENUITY®, dentro de la vía de transducción de señales moleculares asociada a las proteínas de la familia Rho.

5.6 Resumen de los resultados obtenidos

Los resultados más importantes emanados de la presente Tesis doctoral se enumeran a continuación. Adicionalmente la tabla 11 resume los resultados obtenidos.

1. Fasudil no previene los efectos del estrés crónico sobre la ganancia de peso ni tampoco afecta la cantidad de heces producidas durante la sesión de estrés. Esto indica que, a diferencia del antidepresivo Sertralina, Fasudil no ejerce efectos sobre los marcadores de la respuesta de estrés evaluados en esta Tesis.
2. Fasudil activa la vía de sobrevivencia CREB-BCL-2 de forma independiente a ERK y esta activación tiene lugar solamente en un contexto de estrés. El perfil de modificación de los niveles de las proteínas y sus transcritos, es similar al del antidepresivo Sertralina.
3. El aumento en los niveles de las proteínas CREB y BCL2 inducida tanto por Fasudil como Sertralina, no muestra relación con los niveles de los miRNAs 134 ni 485.
4. La administración crónica de Sertralina disminuye los niveles del miR-16 en el hipocampo, lo que se relaciona con el aumento en los niveles de su blanco BCL-2. En contraste, Fasudil no altera los niveles de este miRNA, indicando la especificidad de Sertralina sobre los niveles del miR-16 de forma similar a los efectos reportados para otros ISRS como Fluoxetina.
5. Fasudil, al igual que el antidepresivo Sertralina, es capaz de prevenir la disminución en la densidad de espinas dendríticas promovida por el estrés en el área CA1 del hipocampo, indicando una acción relevante de este fármaco sobre la morfología hipocámpal en situación de estrés.

6. Los efectos de Fasudil y Sertralina sobre la densidad y morfología de espinas dendríticas no se relacionan a variaciones en los niveles de proteínas asociadas a remodelamiento de espinas dendríticas evaluadas en esta Tesis.
7. Fasudil, al igual que el antidepresivo Sertralina, previenen el incremento en los niveles del miR-138 promovido por el estrés en el hipocampo. Es así que, Fasudil ejerce una prevención parcial, mientras que en el caso de Sertralina esta prevención es total, sugiriendo que ambos fármacos comparten ciertos mecanismos.
8. La administración de Fasudil o Sertralina en animales controles no modifica los niveles de miR-138, indicando, al igual que en la evaluación de la densidad de espinas dendríticas, que estos fármacos ejercen acciones diferenciales de acuerdo al estado fisiológico del animal.
9. Las variaciones en los niveles del miR-138 no se relacionan con su blanco descrito APT-1, sugiriendo la potencial regulación de blancos alternativos a éste.
10. Estudios *in silico* muestran que el miR-138 se relaciona con una alta probabilidad con vías de señalización y blancos relacionados a remodelamiento de espinas dendríticas, indicando que las variaciones observadas en los niveles de este miRNA podrían tener eventualmente una relevancia funcional.

Tabla 11. Resumen de resultados obtenidos.

		E-SAL	C-SERT	E-SERT	C-FAS	E-FAS
MARCADORES DE ESTRÉS	GANANCIA DE PESO	↓	↓	↓	↔	↓
	CORTICOSTERONA	↔	↔	↔	↔	↔
	MASA G. ADRENALES	↔	↔	↔	↔	↔
	N° HECES/SESIÓN ESTRÉS	↑		↓		↑
	GENES ACT. TEMPRANA	↔	↔	↔	↔	↔
MORFOLOGÍA	DENSIDAD ESPINAS D.	↓	↔	PREVIENE	↔	PREVIENE
	ESPINAS TIPO CALLAMPA	↔	↔	↔	↔	↔
	RESTO DE ESPINAS	↓	↔	↓	↔	PREVIENE
PROTEÍNAS Y mRNAs	ERK2	↑	↑	↔	↑	↔
	P-ERK2	↔	↑	↔	↔	↔
	P-ERK2/ERK2	↔	↔	↔	↔	↔
	CREB	↑	↑	PREVIENE	↑	↔
	CREB mRNA	↔	↑	↑	↔	↑
	P-CREB	↔	↑	↑	↑	↑
	P-CREB/CREB	↔	↔	↑	↔	↑
	BCL-2	↔	↑	↔	↑	↔
	BCL-2 mRNA	↔	↔	↑	↔	↑
	APT-1	↔	↔	↔	↔	↔
	APT-1 mRNA	↔	↔	↔	↔	↔
	RHOA	↑	↔	↑	↔	↔
	LIMK	↔	↔	↔	↔	↔
	P-LIMK	↔	↔	↔	↔	↔
	P-LIMK/LIMK	↔	↔	↔	↔	↔
	NCAM (Anexo 3)	↔	↔	↔	↔	↔
	N-CADHERINA (Anexo 3)	↔	↔	↔	↔	↔
B-CATENINA (Anexo 3)	↔	↔	↔	↔	↔	
microRNAs	miR-16	↔	↓	↔	↔	↔
	miR-134	↔	↔	↔	↔	↔
	miR-138	↑	↔	PREVIENE	↔	PREVIENE
	miR-485	↔	↔	↔	↔	↔

Las flechas indican el cambio ↑ (aumento) y ↓ (disminución) con respecto al grupo control. Cuando existió un efecto en el grupo E-SAL y este fue prevenido por la administración de Sertralina o Fasudil se utilizó la expresión “PREVIENE”.

6) DISCUSIÓN

A pesar de que los mecanismos moleculares de la depresión mayor son muy poco conocidos, hoy en día existe una gran cantidad de tratamientos farmacológicos disponibles. Estos fármacos varían en su estructura química, blancos farmacológicos y efectos adversos. Sin embargo, han mantenido sus niveles de efectividad que hasta ahora parecen insuficientes (Arroll et al., 2009). En este sentido un estudio realizado por Mali y colaboradores, mostró un 60% de remisión en pacientes depresivos que recibieron tratamiento psicológico y Sertralina, comparado con un 47% en el grupo placebo que solo recibió terapia psicológica (Malt et al., 1999). Más importante aún, los antidepresivos siguen presentando un inicio de acción tardía, lo que propicia un gran abandono de los tratamientos. Desde estos antecedentes en su conjunto surge la necesidad de establecer nuevas y mejores estrategias que permitan un tratamiento más rápido y eficaz de la depresión.

La utilización de modelos animales de depresión ha permitido que el estudio de los mecanismos utilizados por los antidepresivos revele, además, aspectos desconocidos de la patología. De esta forma, el estudio de los antidepresivos no solo incide en el descubrimiento de nuevos fármacos, sino que adicionalmente contribuye en el conocimiento profundo de las alteraciones moleculares que subyacen a la depresión. Favoreciendo así, el desarrollo de estrategias farmacológicas más eficaces. De acuerdo a lo anterior, la presente Tesis doctoral buscó dilucidar aspectos de la acción antidepresiva y los efectos deletéreos del estrés, que podrían contribuir a explicar algunas características presentes en sujetos depresivos y comprender de mejor manera las acciones ejercidas por este tipo de fármacos. La utilización de Fasudil como una herramienta comparativa frente a un antidepresivo conocido como Sertralina, permitió conocer algunos puntos convergentes entre dos fármacos, de familias y mecanismos conocidos muy diferentes. Entregando de esta forma información valiosa en la búsqueda del efecto depresivo *per se*.

A continuación, se discute en detalle cada uno de los aspectos evaluados en función de la hipótesis planteada, los antecedentes existentes en la literatura y los resultados obtenidos.

6.1 Modelo de estrés como herramienta para evaluar acción de fármacos antidepressivos

Un modelo animal ideal debe poseer homología en la sintomatología (validez aparente) y en los factores causantes (validez etiológica) de la patología que busca emular. Además, debe ser capaz de responder específicamente a las terapias efectivas conocidas (validez predictiva) (Mitchell and Redfern, 2005). En el caso de la depresión, la búsqueda de un modelo ideal ha resultado especialmente compleja, de acuerdo a la naturaleza subjetiva de gran parte de su sintomatología, la falta de marcadores moleculares específicos y de pruebas objetivas inequívocas para su diagnóstico, entre otros (Nestler and Hyman, 2010).

El diagnóstico de la depresión se realiza mediante la identificación de un grupo variado de síntomas (Tabla 1, Introducción) en los que se incluyen síntomas cognitivos (pensamientos suicidas y de culpa), emocionales (ánimo deprimido y anhedonia) y neurovegetativos (alteraciones del sueño, cambios en el peso y falta de energía) (Nestler and Hyman, 2010). Es importante destacar que pueden existir diversas combinaciones de estos síntomas para un diagnóstico de depresión mayor, lo que sugiere subtipos de depresión existentes, que poco tienen en común, bajo un mismo diagnóstico. Esto sumado a que solo ciertos síntomas pueden ser medidos objetivamente en roedores, resulta en una complejidad importante en razón de buscar un modelo de validez aparente, ideal para la depresión.

En el presente estudio se utilizó un modelo de estrés crónico por restricción de movimiento. Si bien no corresponde a un modelo que logre emular todos los aspectos de la depresión, es capaz de recrear uno de los dos síntomas considerados centrales en el diagnóstico de la depresión, como la anhedonia. Es por esto que se le considera como un modelo de validez aparente (Willner, 1997). Los animales sometidos a estrés crónico muestran conductas anhedónicas, determinadas en función de la disminución en la preferencia a la sacarosa. Esta conducta puede ser prevenida mediante la administración crónica de antidepressivos conocidos como la Desipramina, sustentando de esta manera la validez predictiva del modelo (Bravo et al., 2009).

Ante la ausencia de causas genéticas específicas validadas para la depresión, el estrés ha sido erigido como el principal factor que otorga validez etiológica. Este tipo de validez es el principal factor que posiciona a los modelos basados en estrés, por sobre otros modelos de depresión que se basan en intervenciones quirúrgicas o farmacológicas, como en el caso del modelo de bulbectomía olfatoria y de administración de Clomipramina, respectivamente (Mitchell and Redfern, 2005).

El diseño experimental incluyó la utilización de dos fármacos que han mostrado efectos antidepressivos en pruebas conductuales que determinan la eficacia antidepressiva y que previenen las alteraciones en memoria asociativa inducida por el estrés (Anexo 1). Por un lado, se evaluaron los efectos de Sertralina, un fármaco que ha mostrado mayor eficacia que Fluoxetina y mayor tolerabilidad que otros antidepressivos (Amitriptilina, Imipramina, Paroxetina y Mirtazapina) (Cipriani et al., 2010). La utilización de Sertralina entrega un punto de referencia en cuanto a los clásicos antidepressivos de los que se conocen sus efectos tanto en la depresión, como en el modelo de estrés por restricción de movimiento. La elección de Sertralina por sobre otros antidepressivos, radica principalmente en que éste corresponde a un fármaco ampliamente utilizado en nuestro laboratorio y que ha mostrado efectos antidepressivos reproducibles en un modelo de estrés crónico. Adicionalmente, entrega información novedosa, ya que la mayor parte de los antecedentes existentes corresponden a Fluoxetina. Por otro lado, se evaluaron los efectos de Fasudil, que corresponde a un fármaco que es capaz de inhibir competitivamente a ROCK, al unirse al sitio de unión al ATP, un mecanismo que no posee ningún antidepressivo conocido. Sin embargo, es pertinente tener en cuenta que la existencia de mecanismos conocidos de los fármacos no implica que sean los únicos, e incluso en algunos casos ni siquiera explican sus efectos terapéuticos.

Si bien la manipulación de los animales y la inyección es de forma inherente un estresor adicional, ésta se realizó en todos los animales, incluidos los controles, lo que buscó anular una eventual contribución del estrés que involucra la administración intraperitoneal en los grupos experimentales. De hecho, la administración de suero salino no produce un quiebre en la pendiente de la ganancia de peso. Las dosis y el esquema de administración utilizados

fueron los mismos que lograron producir efectos tipo antidepresivos en las pruebas conductuales detalladas en el anexo 1. De esta manera se evalúan aspectos que no habían sido considerados y que permiten conocer o explicar los mecanismos subyacentes a la conducta. En el caso de la Sertralina se ha determinado que 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 $43,7 \pm 2,7$ ng/ml y de $23,1 \pm 2,7$ ng/ml en animales inyectados con 5 mg/kg (Peng et al., 2008). Estos niveles son comparables a los detectados (20 - 200 ng/mL) en pacientes depresivos tratados con dosis orales entre 100 - 200 mg/diarios (DeVane, 1999). Más aún, de acuerdo a la similitud que existe en las K_i para la sertralina por el transportador de serotonina entre roedores y humanos (0,29 nM vs 0,15 nM), la dosis de 10 mg/kg es apropiada para hacer estudios del efecto del fármaco sobre la conducta y cambios moleculares en sistema nervioso. En el caso de Fasudil la dosis utilizada replica el esquema posológico utilizado en los animales sometidos a las pruebas conductuales (Anexo 1). Además, se basa en la observación de que la administración intraperitoneal de 5 - 15 mg/kg de Fasudil induce neuroprotección en el sistema nervioso central (Wu et al., 2012, Song et al., 2013). Estas dosis fueron administradas diariamente y para poder dissociarse de efecto agudo del fármaco, los animales fueron eutanasiados 24h después de la última inyección.

En los estudios existentes, la utilización de los antidepresivos en modelos animales ha sido previo, durante o posterior al estresor. La administración posterior al agente estresor busca demostrar la reversión de los efectos y probablemente es lo que mejor se acerca a la condición clínica de los pacientes bajo tratamiento. Sin embargo, el objetivo de la presente tesis buscó dilucidar los mecanismos que explican la protección ante efectos del estrés, como los reportados para los experimentos conductuales. Por este motivo el tratamiento se realizó previa a la exposición al estresor. La administración de los fármacos en estudio en animales sin estresar permitió diferenciar los efectos propios del fármaco en animales sanos (control vs fármaco) y el efecto o protección ejercida ante los efectos deletéreos del estrés (estrés vs estrés + fármaco).

Por otro lado, es válido preguntarse si el hipocampo fue un tejido apropiado para el desarrollo de este trabajo. El hipocampo está compuesto de neuronas glutamatérgicas e interneuronas fundamentalmente GABAérgicas (Tonegawa and McHugh, 2008). Cumple un rol importantísimo en el procesamiento emocional y cognitivo (Dale et al., 2016). De ahí que esta estructura altamente plástica y sensible al estrés, muestra alteraciones en patologías asociadas al ánimo. En la depresión se ha reportado una disminución o atrofia hipocampal, la que ha sido asociada a alteraciones morfológicas en las neuronas que lo componen y a una disminución en la neurogénesis (Sapolsky, 2001). Además, el hipocampo corresponde a un tejido extensamente inervado por fibras noradrenérgicas y serotoninérgicas (Dale et al., 2016), que ingresan desde la corteza entorrinal y desde las vías del cíngulo y fornix hacia todo el hipocampo en el caso de las fibras serotoninérgicas procedentes del *raphe* (Moore and Halaris, 1975). Esto explica además la presencia de una diversidad considerable de receptores que son capaces de influir en la señalización de las células que lo componen y lo posiciona como un tejido muy interesante de evaluar.

La variabilidad interindividual de los animales de laboratorio también fue un aspecto considerado en el diseño de este estudio. El diseño en camadas utilizado apuntó a disminuir este tipo de variabilidad, y en la misma línea, cabe destacar que independiente de los aspectos evaluados (densidad de espinas dendríticas, RNAs, proteínas, etc.), éstos se realizaron de forma paralela en los mismos animales, otorgando la posibilidad de establecer una relación de mayor robustez.

6.2 Marcadores de estrés

El estrés corresponde a una respuesta compleja, que es capaz de producir alteraciones que se manifiestan a nivel periférico y central. En este trabajo se determinaron algunos parámetros fisiológicos que permiten corroborar el efecto del estrés, y por otro lado explorar los efectos de Sertralina y Fasudil a este nivel. Uno de los efectos más importantes y reportados del estrés crónico corresponde a la activación del eje HHA con el consecuente aumento del factor liberador de corticotrofina (CRF) y de los glucocorticoides (Tafet and

Bernardini, 2003). Los animales sometidos a estrés crónico por restricción de movimiento no mostraron diferencias significativas en los niveles de corticosterona con respecto al grupo control. El estrés por restricción de movimiento genera una liberación de corticosterona de forma casi inmediata (menos de 15 min luego de la aplicación del estresor) para posteriormente decaer paulatinamente en unas horas hasta volver a sus niveles basales en un tiempo inferior a 24h (datos no publicados del Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética). Dada la cinética que sigue la corticosterona en sangre resulta muy complicado determinar los cambios producidos durante el estrés por métodos no invasivos. Esto de acuerdo a que la toma de muestra (al momento de la eutanasia) para el análisis de la corticosterona utilizado en este estudio fue 24 h posterior a la última sesión de estrés, a una hora en que la secreción de la hormona se encuentra nuevamente en estado basal (durante la mañana). En concordancia con esto, se encuentra un estudio publicado por Marín y colaboradores, en el que muestra que animales controles y estresados crónicamente, eutanasiados 24 h posterior a la última sesión de estrés, muestran niveles de corticosterona similares. En este mismo estudio, además se determinaron los niveles de corticosterona inmediatamente después de que los animales fueran sometidos a un nuevo estresor y se determinó que el aumento de los niveles de corticosterona en animales previamente estresados fue mucho mayor que en animales sin estresar o controles (Marin et al., 2007). Esto sugiere que el efecto del estrés crónico por restricción de movimiento es capaz de alterar los mecanismos que subyacen a la liberación de corticosterona, volviéndolo más sensible ante un nuevo estímulo estresor y aumentando la magnitud en la elevación de la corticosterona. Por lo tanto, la determinación del estado del eje HHA, requeriría la utilización de animales adicionales destinados exclusivamente a la evaluación de este parámetro o bien determinar a futuro los niveles de metabolitos de corticosterona presentes en las heces (Touma et al., 2004) como una medida indirecta de los niveles de esta hormona. De todas maneras, es importante recalcar que la respuesta de estrés corresponde a un fenómeno muy complejo compuesto de una gran cantidad de mediadores, por lo que la sola determinación de este parámetro no daría cuenta de la respuesta de estrés en su real dimensión.

Los resultados tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la masa de las glándulas adrenales. La evaluación de la masa de estas glándulas corresponde a otro parámetro utilizado para determinar indirectamente el estado del eje HHA. Está descrito que el estrés crónico produce una hipertrofia de las glándulas adrenales (McEwen, 2007), sin embargo esto es discutible ya que existen antecedentes en los cuales tampoco se reportan cambios (Magariños et al., 1999, Marin et al., 2007). Una explicación radica en que la evaluación de la masa como una medida indirecta de la hipertrofia de la glándula resulta una relación que no siempre es tan precisa, por lo tanto, no correspondería a la metodología más confiable para una determinación de este tipo. La determinación de hipertrofia por medio de análisis histológicos de la glándula abordaría de forma ideal este aspecto. Por otro lado, es posible que la activación del eje HHA, inducida por la restricción de movimiento, no sea de una magnitud que genere cambios tan drásticos como los que se producen por paradigmas de estrés más potentes como el crónico variable. Se encuentra reportado que los niveles basales de corticosterona en ratas se sitúan alrededor de 4 µg/dL en suero durante la mañana (Schaaf et al., 2000), lo cual es concordante con los niveles informados en el presente trabajo. Esto sugiere que los animales utilizados no fueron estresados durante la eutanasia. En concordancia con lo anterior, los resultados de los niveles de los marcadores tempranos de actividad sináptica, que pueden ser interpretados como marcadores de estrés (*Arc* y *c-Fos*) tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas. Los niveles de estos transcritos son capaces de aumentar luego de minutos de iniciar una respuesta de estrés (Imaki et al., 1996, Bateup et al., 2013), por lo tanto estos resultados refuerzan la idea de que no existió estrés durante o inmediatamente anterior a la eutanasia en ningún grupo experimental.

Se encuentra extensamente reportado que los modelos de estrés crónico generan una disminución en la ganancia de peso (Alario et al., 1987, Marin et al., 2007, Tamashiro et al., 2007, Bravo et al., 2009, Castaneda et al., 2015), por lo que este efecto ha sido utilizado como un marcador fisiológico importante del protocolo de estrés aplicado en animales de laboratorio. En este trabajo la evaluación de este parámetro mostró una tasa de ganancia de peso similar en todos los animales días previos a la aplicación del estrés y/o a la

administración de fármacos, lo que demostró un estado fisiológico normal y similar entre la totalidad de los animales de experimentación. Luego, desde el día 1 de estrés, los animales estresados mostraron una disminución significativa en la ganancia de peso, lo que podría estar mediado por una menor ingesta de alimento (Alario et al., 1987, Heinrichs et al., 1992, Marin et al., 2007, Jeong et al., 2013). La regulación central de la ganancia de peso ocurre en el hipotálamo, el cual contiene múltiples sistemas neuronales que juegan roles importantes en el control de la homeostasis energética (Woods et al., 1998). En un estudio del funcionamiento de este centro hipotalámico, Jeong y colaboradores determinaron que el estrés crónico disminuye la ingesta de alimentos solo en los primeros días, sin embargo, la disminución en la ganancia de peso se mantuvo constante al igual que en los resultados informados en este trabajo. Esto indica que los efectos sobre el estrés sobre la ganancia de peso corporal no son explicados íntegramente por la disminución en la ingesta de alimentos, sino que corresponde a una respuesta mucho más compleja que incluye cambios metabólicos, entre otros (Jeong et al., 2013). El alza en los niveles de corticosterona en los animales sometidos a estrés contribuye de igual forma en la disminución de la ganancia de peso. A pesar de que el eje HHA no mostró una activación permanente o una alteración en los mecanismos que utiliza para frenar el alza de glucocorticoides, es posible como se describió anteriormente, que el disparo o los niveles que alcanza esta hormona durante el protocolo de estrés sean tan altos como para incidir en la ganancia de peso. Al respecto, se ha descrito que la administración crónica de corticosterona en ratas, reduce la ganancia de peso corporal (Johnson et al., 2006). La activación del eje HHA promueve procesos metabólicos como la glucogenólisis, proteólisis y lipólisis (Munck et al., 1984), y más importante aún es el aumento en la defecación (Miyata et al., 1998). Los resultados obtenidos en el presente estudio, indicaron que el estrés aumentó la cantidad de heces producida durante el protocolo de restricción de movimiento. Contribuyendo así, en la disminución en la ganancia de peso de los animales estresados que no recibieron tratamiento farmacológico.

Con respecto a la acción de los agentes farmacológicos utilizados, se pudo constatar que a diferencia de Fasudil, la Sertralina produjo una disminución en la ganancia de peso en animales no estresados. Esto se encuentra extensamente descrito para antidepresivos ISRS

en publicaciones anteriores (Zhang et al., 2000, Ulloa et al., 2010), por lo que corresponde a un efecto esperado para Sertralina. Existe evidencia de que este fármaco es capaz de inducir saciedad y por ende una disminución en el consumo de alimento en las ratas, por un mecanismo dependiente de Serotonina (Simansky and Vaidya, 1990, Zhang et al., 2000). Este fundamento concuerda con el hecho de que Fasudil, un fármaco sin acciones sobre la transmisión serotoninérgica, no mostró cambios en la ganancia de peso observada. En cuanto a los animales estresados, fue posible demostrar que los fármacos utilizados no son capaces de prevenir la disminución en la ganancia de peso, ya que, a pesar del tratamiento farmacológico, estos animales mostraron un patrón de peso similar al grupo estresado (E-SAL). Estos resultados demuestran que el tratamiento farmacológico utilizado no es capaz de intervenir en todos los niveles de los denominados efectos deletéreos del estrés crónico. Asimismo, resultó interesante el análisis del porcentaje de ganancia de peso total para los animales estresados (E-SAL) o los que recibieron Sertralina (C-SERT) versus los que recibieron este mismo fármaco, pero en un contexto de estrés diferente (E-SERT), ya que ambos factores (fármaco y estrés) fueron capaces de disminuir la ganancia de peso por sí solos. En este sentido, los resultados indicaron que la combinación de estrés y sertralina (E-SERT) mostró una disminución de mayor magnitud en la ganancia de peso que el estrés o la Sertralina por sí sola. Este efecto fue aditivo, ya que el estrés o la Sertralina de forma aislada, logran una disminución en el peso final de 5 a 6% aproximadamente, mientras que una combinación de ambos logró cerca de 11% de disminución. Esta observación no determina si el efecto del estrés o del fármaco en la ganancia de peso ocurre mediante mecanismos iguales o diferentes, pero logra demostrar que éstos no son capaces de potenciarse al no mostrar un comportamiento sinérgico.

El sistema nervioso central y entérico se encuentran conectados directamente por el nervio vago y pueden influir uno al otro. Esto explicaría la alta frecuencia en la cual los trastornos psiquiátricos se correlacionan con enfermedades en el tracto intestinal (Gershon, 2003). En este sentido el CRF juega un rol importante, actuando como uno de los principales mediadores del eje cerebro-intestino (Tache and Million, 2015). El estrés activa el eje HHA aumentando la liberación de CRF, que a través de sus receptores a nivel central estimulan

nervios vagales, resultando en una liberación de serotonina desde las células enterocromafines del colon proximal. La serotonina activa a los receptores 5-HT₃ localizados en el aferente vagal lo que desemboca en la estimulación de la motilidad colónica (Nakade et al., 2007). La importancia de la serotonina y del receptor 5HT-3 queda de manifiesto luego de que antagonistas de este receptor, como el fármaco Ondansetrón, son capaces de anular el efecto inductor en la defecación causado por el estrés (Miyata et al., 1998).

Si el aumento de CRF incrementa la serotonina y produce un aumento de la motilidad colónica, los antidepresivos que son capaces de influir en la transmisión serotoninérgica, como la Sertralina o Fluoxetina podrían afectar la defecación. Es así que se esperaría que estos fármacos aumentaran aún más la motilidad intestinal incrementando el número de heces, lo que podría explicar la disminución en la ganancia de peso observada en animales que recibieron Sertralina. De forma contraria a este supuesto, Sertralina mostró una disminución en el número de heces, comparado con el grupo estresado durante el protocolo de restricción de movimiento. Este aparente contrasentido podría ser explicado en cuanto a que, los trabajos que describen un incremento en la defecación por parte de ISRS fueron realizados en animales controles no estresados (Abdel Salam, 2004), por lo que es posible que en animales estresados este efecto sea diferencial. En esta línea se encuentra el trabajo de Zhang y colaboradores, en el cual se muestra que el efecto en la defecación fue diametralmente contrario en ratas estresadas y controles, lo que sugiere que los mecanismos afectados dependen del estado fisiológico del animal. Este efecto diferencial podría explicar por un lado la disminución en la ganancia de peso (atribuida a un eventual aumento en la defecación) en animales controles que recibieron Sertralina, y por otro lado, la cantidad inferior de heces producida en animales estresados a los que se les administró este fármaco.

Existen trabajos en la literatura que muestran resultados similares a los obtenidos en este trabajo en cuanto a la disminución en la motilidad colónica o en la defecación de animales estresados que recibieron antidepresivos ISRS (Zhang et al., 2000, Afzal, 2015). Este efecto aparentemente contrario a lo esperado, según los mecanismos serotoninérgicos descritos anteriormente, se ha atribuido a efectos ansiolíticos y compensatorios en la transmisión

serotoninérgica. Por un lado, los ansiolíticos como el Diazepam logran disminuir la motilidad colónica durante situaciones estresantes (Narducci et al., 1985) y existen trabajos en donde se han demostrado efectos ansiolíticos de Fluoxetina, los cuales se correlacionan y han sido atribuidos por los autores como el mecanismo responsable de la disminución en la defecación (Zhang et al., 2000). La prueba utilizada para la determinación de los efectos ansiolíticos mencionados fue realizada luego de 12 días de administración diaria de Fluoxetina, temporalidad en la cual está descrito el inicio de efectos ansiolíticos para este fármaco (Kurt et al., 2000). Sin embargo, en este estudio la disminución en el número de heces producida por Sertralina comienza tan temprano como el día 2, por lo que es discutible la explicación de que un eventual efecto ansiolítico pueda fundamentar la disminución en la producción de heces. Por otro lado, es posible que exista un efecto compensatorio en la transmisión serotoninérgica luego de un aumento drástico en la liberación de serotonina por el efecto de estrés combinado con el del antidepresivo. Está descrito que los primeros días de tratamiento con fármacos ISRS se reduce la liberación de serotonina mediante la acción indirecta sobre autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} por lo que se reduce el disparo neuronal (Gardier et al., 1996). Luego de varios días de administración estos autorreceptores se desensibilizan resultando en un aumento en el tono serotoninérgico, lo que también se ha atribuido al inicio tardío del efecto de este tipo de antidepresivos (Le Poul et al., 1995). Considerando que el autorreceptor 5HT_{1A} también está presente en el colon (Neal and Bornstein, 2006) sería posible explicar la disminución inicial en la defecación (de los animales que recibieron Sertralina) observada en este trabajo mediante mecanismos compensatorios iniciales, pero esto resulta controversial de acuerdo a que existen reportes en donde se demuestra que los agonistas de este autorreceptor son capaces de aumentar la defecación (Crocì et al., 1995).

Los resultados en el número de heces producida por Fasudil indican que a diferencia de Sertralina, este fármaco no interviene en los mecanismos asociados a la producción de heces. Esto, sumado a la ausencia de diferencias en la ganancia de peso por Fasudil, permite indicar que solamente Sertralina ejerce acciones sobre la ganancia de peso y la defecación.

Estableciendo de esta manera una importante diferencia entre ambos fármacos, pero que no parecen tener relación con su efecto antidepresivo.

Finalmente, cabe destacar que estos resultados, responden a lo esperado según la literatura en cuanto a su uso como marcador de estrés. Más aún, demostraron reproducibilidad al ser coincidentes con los resultados obtenidos en trabajos anteriores del Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética, en donde se utiliza la misma estrategia experimental y los mismos agentes farmacológicos (Bravo et al., 2009, Ulloa et al., 2010, Vilches, 2011, Castaneda et al., 2015).

6.3 Fasudil muestra acciones sobre proteínas asociadas a la vía de sobrevivencia celular ERK-CREB-BCL-2 en un perfil similar a Sertralina

6.3.1 Sertralina y Fasudil ejerce acciones similares en la vía ERK-CREB

Se encuentra descrita la participación de la vía ERK-CREB en la depresión y en la acción de los antidepresivos (Blendy, 2006, Qi et al., 2008, Di Benedetto et al., 2013). En esta Tesis se determinó que el estrés crónico por restricción de movimiento incrementó los niveles de las proteínas ERK2 y CREB, un efecto que fue prevenido por Sertralina y Fasudil en el caso de CREB. Algunos de estos resultados resultan discrepantes con respecto a los efectos reportados por el estrés crónico en estas proteínas, en los cuales se describe una disminución de los niveles de ERK2 y CREB (Qi et al., 2008). Resultados de nuestro Laboratorio indican resultados similares a los obtenidos en este trabajo en animales estresados crónicamente mediante el mismo protocolo de restricción de movimiento (Bravo et al., 2009), lo que indica por una parte, reproducibilidad del modelo de estrés utilizado en los efectos del estrés sobre los niveles de estas proteínas. Mientras que, por otro lado, el incremento en la masa de ambas proteínas por efecto del estrés podría sugerir un efecto compensatorio que ocurre con el estresor y las temporalidades utilizadas.

La literatura ofrece numerosos estudios en los que se utilizan animales controles y se evalúan estas proteínas luego de administraciones agudas o crónicas de antidepresivos. En

este estudio ambos fármacos produjeron un incremento en los niveles de ERK2 y CREB en animales controles, lo que es concordante con lo descrito para Desipramina y Fluoxetina (Nibuya et al., 1996, Tiraboschi et al., 2004, Bravo et al., 2009). Resulta importante destacar la similitud que muestra Fasudil, en cuanto al incremento en los niveles de ERK2 y CREB, con Sertralina y otros antidepresivos.

La terapia electroconvulsiva y la administración crónica de antidepresivos incrementa los niveles del transcrito de CREB (Nibuya et al., 1996, Tiraboschi et al., 2004). Esto es concordante con los resultados obtenidos, que muestran que la administración de Sertralina en animales no estresados incrementa el nivel de los transcritos de CREB; efecto coincidente con el aumento en los niveles de la proteína en los animales controles. En contraste, Fasudil no altera los niveles del transcrito y solo es capaz de inducir un incremento en los niveles proteicos de CREB. Esto podría sugerir que el incremento de la proteína CREB, compartido por ambos fármacos, estaría mediado por mecanismos diferentes. El aumento en los transcritos de CREB observado en un contexto de estrés (E-SERT y E-FAS) tampoco es coincidente con los niveles de la proteína CREB en los grupos mencionados. Esto estaría sugiriendo que el fármaco induce un aumento en su transcripción u otras alteraciones que desembocan en un incremento en los niveles de su transcrito. De cualquier manera, esto no alcanza a ser reflejado en un aumento de la proteína, probablemente debido a un bloqueo o modificaciones en los mecanismos de regulación de su traducción.

La serotonina es capaz de activar la vía de las MAPK a través de la activación de sus receptores (especialmente el receptor 5-HT₇) en neuronas del hipocampo (Errico et al., 2001). Los resultados mostraron que solamente Sertralina fue capaz de promover un aumento en los niveles de ERK2 fosforilado, sin embargo, este aumento resultó concomitante con los niveles de la proteína total, indicando un aumento en su expresión, pero manteniendo la proporción de su población fosforilada constante. Si bien este resultado revela que no existió una activación directa de la vía de las MAPK, es posible indicar que la cantidad de proteína ERK2 fosforilada total aumentó, lo que de igual manera podría afectar a las vías activadas por esta quinasa. La ausencia de efectos en la fosforilación de ERK2 por parte de Fasudil corresponde a otra diferencia entre ambos fármacos.

Por otro lado, la fosforilación activante de CREB (Ser133) ha sido descrita como un efecto propio de los antidepresivos y se ha propuesto como un punto convergente entre diversas clases de este tipo de fármacos (Blendy, 2006). Al evaluar los niveles de P-CREB en los diferentes grupos experimentales se observó un aumento de éstos en todos los grupos experimentales con respecto al control. Sin embargo, solo en el grupo de animales estresados que recibieron tratamiento con Sertralina y Fasudil, existió un aumento en la relación P-CREB/CREB. Este aumento en la relación P-CREB/CREB, resulta concordante con estudios en los que se han utilizado otros antidepresivos como Fluoxetina (Qi et al., 2008) y podría estar relacionado con la prevención de los efectos deletéreos del estrés. Este antecedente sumado a los resultados obtenidos, demuestran un comportamiento de Fasudil de forma similar a los antidepresivos cuando se evaluó la fosforilación activante de CREB. Considerando que los niveles de fosforilación de ERK2 no cambiaron a causa de la administración de fármacos, se desprende que el incremento de P-CREB/CREB no sería explicado por una activación de la vía ERK. De acuerdo a esto, es posible que otras quinasas estén involucradas en la fosforilación de CREB, como las proteínas PKA o CaMK (Deak et al., 1998, Blendy, 2006).

Los resultados obtenidos en esta Tesis en cuanto a los niveles y al estado de fosforilación de las proteínas ERK2 y CREB muestran puntos de concordancia y discrepancia con respecto a otros estudios. Esto puede deberse a que los parámetros evaluados dependen tanto del modelo de estrés o depresión utilizados como de la duración del mismo, la dosis utilizada de antidepresivos y el tiempo de administración. De todas maneras, es posible observar que los cambios en los niveles de las proteínas ERK y CREB siguen un mismo patrón, y más importante aún fue posible determinar que este patrón de modificación fue similar en cada uno de los fármacos estudiados. De igual forma, los niveles del transcrito de CREB y los niveles en la relación P-CREB/CREB muestran cambios idénticos en los animales estresados tratados con un fármaco u otro. Estos hallazgos muestran que ambos fármacos, independiente de su mecanismo de acción conocido, son capaces de activar vías de transducción similares o bien que convergen en un mismo punto.

6.3.2 Niveles de los miRNAs reguladores potenciales de CREB.

La proteína CREB corresponde a un blanco validado en un estudio *in vitro* de miR-134 (Gao et al., 2010). Si bien esta proteína y su transcrito mostraron variaciones, éstas no se relacionaron con los niveles de miR-134, lo que descarta la participación de este miRNA en la regulación traduccional de esta proteína. Sin embargo, cabe mencionar que los trabajos publicados en los que se basa esta relación miRNA-mRNA/proteína fueron realizados *in vitro*, lo que podría no ser reproducible en un sistema más complejo como es el modelo *in vivo*, que además involucra la utilización de estrés y fármacos. El hecho de que miR-134 no muestre diferencias estadísticamente significativas podría tener una explicación en la vida media de estas moléculas. Al estimular cultivos neuronales es posible observar un incremento en los niveles del miR-134, el que llegó a un máximo a las 2 h (Fiore et al., 2009). En este trabajo la eutanasia y posterior obtención de los tejidos ocurrió 24 h posterior a la última sesión de estrés o tratamiento farmacológico, por lo que resulta probable que este desfase pueda explicar la ausencia de un efecto observable. Es posible también que el protocolo de estrés no sea lo suficientemente potente como para producir cambios observables en los niveles de estos miRNAs. Meerson y colaboradores reportaron cambios atribuidos al estrés crónico en una gran cantidad de miRNAs en el área CA1 del hipocampo (Meerson et al., 2010), entre ellos el miR-134. Sin embargo, el protocolo utilizado correspondió a 4 h de estrés, a diferencia de las 2,5 h aquí utilizadas.

Otro miRNA que potencialmente es capaz de regular a CREB, corresponde al miR-485. Este miRNA no mostró variaciones, lo que contrasta con información reciente (no publicada) del Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética, en donde se indica que existe un aumento importante en los niveles del miR-485 en el hipocampo dorsal de animales estresados crónicamente. Los resultados obtenidos en la evaluación de este miRNA no arrojaron resultados similares a los reportados, probablemente debido a una eventual expresión diferencial del miR-485 en el hipocampo. Además, existen diferencias tanto funcionales como en los circuitos involucrados entre las áreas dorsal y ventral del hipocampo (Pinto et al., 2015), las que podrían tener efectos contrarios en los niveles de este miRNA en particular, quizás resultando en una anulación de su variación total en el homogeneizado de

hipocampo utilizado para la evaluación de miRNAs. Tampoco los fármacos utilizados mostraron ejercer efectos sobre los niveles del miR-485, por lo que cabe la posibilidad de analizar a futuro los niveles de este miRNA y sus blancos potenciales de manera diferencial en hipocampo dorsal y ventral.

6.3.3 Sertralina y Fasudil incrementan de forma similar los niveles de la proteína o el transcrito de BCL-2, efecto que depende del estado fisiológico del animal.

BCL-2 corresponde a una proteína con propiedades antiapoptóticas y neurotróficas que es regulada positivamente por CREB (Wilson et al., 1996). Estas propiedades han despertado el interés en la relación que esta proteína podría tener en los efectos de sobrevivencia mostrados por los antidepresivos en contraste con la muerte neuronal en áreas como el hipocampo (Duman, 2004). Está demostrado que el gen de BCL-2 contiene una región de respuesta a CREB (Wilson et al., 1996), lo que posiciona a esta proteína como un regulador transcripcional de BCL-2. El aumento en los niveles del transcrito de BCL-2 en los grupos de animales estresados tratados con Sertralina o Fasudil puede ser explicado mediante un aumento en la transcripción mediado por CREB, tomando en cuenta la activación de esta proteína (P-CREB) en los mismos grupos experimentales. Por lo que estos resultados, dan cuenta de una activación de la vía CREB-BCL-2 mediada por ambos fármacos, pero solo en un contexto de estrés.

Cuando se evaluaron los niveles de la proteína BCL-2 se observó un aumento en los grupos de animales controles que recibieron Sertralina o Fasudil, a diferencia del efecto sobre el transcrito, que solo ocurrió en un contexto de estrés. Este efecto había sido reportado anteriormente con otros antidepresivos por Murray y colaboradores, los cuales indicaron que este incremento en los niveles de BCL-2 en el hipocampo solo ocurre ante administraciones crónicas de agentes antidepresivos que son capaces de aumentar el tono serotoninérgico (Murray and Hutson, 2007) e incluso otros autores afirman que este efecto depende de la dosis utilizada, existiendo una ventana de dosificación en el caso de Amitriptilina y Venlafaxina (Xu et al., 2003). Trabajos más recientes han relacionado los efectos de Fluoxetina sobre BCL-2 con los niveles del miR-16, que tiene como blanco a dicha proteína (Launay et al., 2011). Los resultados obtenidos en los niveles de este miRNA son capaces de

explicar el aumento en los niveles de BCL-2 en los animales que recibieron Sertralina (un efecto discutido en mayor detalle más adelante en la sección 6.4). Sin embargo, resulta interesante el hecho de que Fasudil sea capaz de converger en un incremento de BCL-2 sin tener efectos directos sobre la transmisión serotoninérgica o en los niveles del miR-16.

Estos hallazgos indican que los efectos de estos fármacos sobre las vías transduccionales que controlan la expresión y transcripción de esta proteína dependerían del estado fisiológico del animal. Lo que es consistente con un trabajo en donde la administración crónica de antidepresivos no es capaz de modificar los niveles del transcrito de BCL-2 en animales no estresados (Kosten et al., 2008). De todas formas, es importante destacar que los efectos de ambos fármacos fueron similares en ambos parámetros evaluados (proteína y transcrito), por lo que queda por determinar de qué manera Fasudil produce los efectos aquí descritos.

6.4 Sertralina, a diferencia de Fasudil, disminuye los niveles de miR-16 en el hipocampo, los que se relacionan con los niveles de su blanco BCL-2

Los resultados indicaron una disminución estadísticamente significativa del miR-16 en el grupo de animales controles que recibieron Sertralina, mientras que en el grupo de animales estresados a los que se les administró este mismo fármaco mostraron una tendencia que no llegó a ser significativa. Tanto el estrés crónico, como Fasudil no fueron capaces de modificar los niveles de este miRNA, demostrando de esta forma que los efectos sobre miR-16 se atribuyen exclusivamente a Sertralina. Esto es consistente con los reportes que relacionan una disminución del miR-16 mediada por Fluoxetina, sugiriendo un efecto de Sertralina similar al modelo postulado por Launay y colaboradores, en el que se muestra por primera vez a un miRNA como una parte esencial del mecanismo de acción de un fármaco antidepresivo (Launay et al., 2011) (Fig. 32).

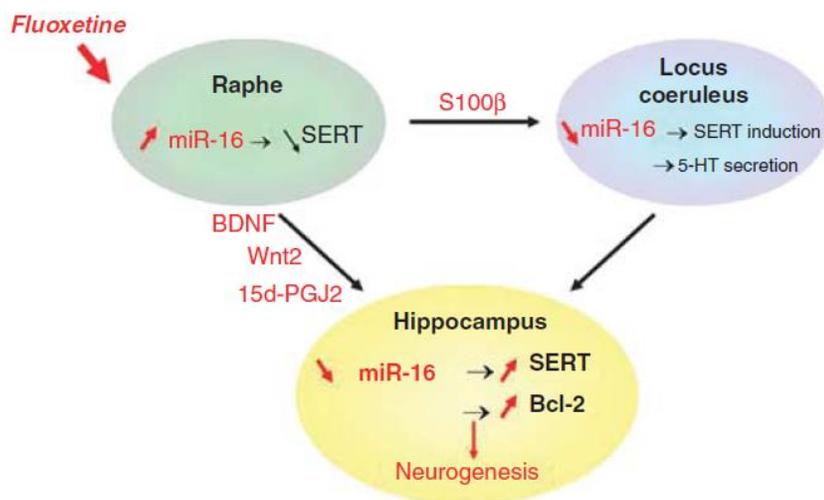


Figura 32. Modelo de la participación de miR-16 inducida por Fluoxetina en el cerebro. El esquema muestra el modelo propuesto por Launay y colaboradores, en donde la Fluoxetina a través de la regulación de los niveles del miR-16 y de un *cross-talking* o conversación cruzada del área del *raphe*, locus coeruleus e hipocampo es capaz de ejercer sus efectos antidepresivos. Figura obtenida desde (Launay et al., 2011)

Fluoxetina es capaz de afectar los niveles de miR-16 de forma diferencial en las neuronas serotoninérgicas del *raphe* y noradrenérgicas del locus coeruleus (LC). Una reducción de miR-16 en el LC, mediada por la acción del péptido S100 β liberado por las neuronas del *raphe*, sería capaz de producir un aumento en la expresión del blanco de este miRNA, el transportador de serotonina. Adicionalmente, las neuronas del *raphe*, liberan BDNF, Wnt2 y la prostaglandina 15d-PGJ2; las cuales actúan cooperativamente en el hipocampo disminuyendo los niveles de miR-16 con el aumento concomitante de sus blancos, como el transportador de serotonina y BCL-2 (Launay et al., 2011). La proteína BCL-2 se encuentra relacionada a la neurogénesis en el hipocampo y en esta Tesis se mostró que el aumento en la masa de BCL-2 fue coincidente con la disminución del miR-16 en los animales tratados con Sertralina. Cabe destacar que la relación entre el miRNA y la proteína no se explica por cambios en los niveles del transcrito de BCL-2, por lo que la eventual

acción del miR-16 podría estar mediada por una represión traduccional y no a través de una destrucción del transcrito blanco.

Finalmente, los resultados apuntan a que existe una activación de CREB inducida por ambos fármacos en situación de estrés, la cual promueve un aumento en la transcripción de BCL-2, sin embargo, la activación inicial de CREB no estaría mediada por ERK. De esta manera es posible indicar que Sertralina y Fasudil activan solamente una parte de la cascada transduccional indicada en la hipótesis, y ésta estaría condicionada a la presencia de un estado de estrés. Queda por determinar específicamente de qué manera Fasudil modifica inicialmente esta vía transduccional. De todas formas, los resultados obtenidos entregan información novedosa que muestra, ahora de un punto de vista molecular, las similitudes de Fasudil con agentes antidepresivos conocidos como Sertralina.

6.5 Sertralina y Fasudil previenen la disminución en la densidad de espinas dendríticas promovida por el estrés

En esta tesis se determinó que el modelo de estrés crónico por restricción de movimiento fue capaz de disminuir la densidad de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo, lo que había sido reportado anteriormente en este y otros modelos de estrés (Martinez-Tellez et al., 2009, Bedrosian et al., 2011, Qiao et al., 2014, Castaneda et al., 2015, Huang et al., 2015). Las alteraciones morfológicas reportadas en algunos trabajos citados, fueron acompañadas por conductas tipo depresivas en pruebas conductuales, otorgando cierta validez en la relación conducta-morfología hipocampal. En esta misma línea, es importante destacar que la disminución en la densidad de espinas dendríticas, evidenciado en este trabajo, es concordante con los resultados de los experimentos en los que se evalúa el aprendizaje asociativo (ver Anexo, sección 9.1.2), una función que involucra a varias estructuras además del hipocampo y que ha sido relacionada previamente con alteraciones morfológicas en esta área del cerebro (Leuner et al., 2003). Con respecto al área del hipocampo analizada para la determinación de la densidad de espinas dendríticas, resulta pertinente indicar que, si bien la literatura en cuanto al reporte de este parámetro en modelos de estrés es extensa, existe una mayor cantidad de trabajos que evalúan el área CA3, mientras

que los cambios en CA1 se encuentran menos documentados (Qiao et al., 2016). Esta diferencia puede ser explicada en relación a que las neuronas en CA1 se encuentran en mayor densidad que en CA3, constituyendo una dificultad técnica para encontrar y determinar la densidad de espinas dendríticas en neuronas aisladas. Además, algunos autores sugieren que CA3 correspondería a un área del hipocampo más sensible que CA1 en respuesta al estrés crónico impredecible y por restricción de movimiento (Qiao et al., 2016). En nuestro modelo, el área CA1 evidenció cambios reportados en la literatura para protocolos de estrés que producen conductas tipo depresivas en roedores. Más aún, el hecho de que el antidepresivo Sertralina, haya sido capaz de producir una prevención de este efecto en la densidad de espinas dendríticas, demuestra validez predictiva en este parámetro.

El efecto de los agentes antidepresivos en la reversión de los cambios en las espinas dendríticas hipocampales de roedores en modelos de depresión corresponde a un aspecto extensamente reportado para los antidepresivos disponibles. En este sentido los antidepresivos tricíclicos Amitriptilina (Norrholm and Ouimet, 2001), Imipramina (Chen et al., 2010), Desipramina (Hajszan et al., 2009) y el Fluoxetina (Wang et al., 2013) han demostrado revertir la disminución de espinas dendríticas en el área CA1. En este trabajo, sin embargo, se demostró una prevención en el efecto deletéreo del estrés, en cuanto a la disminución de espinas dendríticas en el hipocampo por parte de Sertralina. Un aspecto que solo se encontraba reportado en corteza prefrontal para este fármaco (Noorafshan et al., 2015), por lo que constituye un hallazgo nuevo, aunque esperado tomando en cuenta la información disponible en la literatura. Por otro lado, el efecto preventivo en la disminución de espinas dendríticas ejercido por Fasudil corresponde a un resultado novedoso e importante en cuanto a que tiende a reforzar los efectos de este fármaco en relación a la prevención de conductas tipo depresivas y además sugiere la participación de ROCK, en la modificación de espinas dendríticas. Recientemente, se demostró que neuronas primarias hipocampales expuestas a Y-27632, un inhibidor de ROCK fue capaz de aumentar la cantidad de espinas (Swanger et al., 2015). Los antecedentes aportados por nuestro grupo, que demuestran que los efectos del estrés y Fasudil sobre la densidad de espinas dendríticas se relacionan con la activación e inhibición de ROCK, respectivamente (determinado mediante los niveles de

fosforilación de MYPT1) (Garcia-Rojo et al., 2017), refuerzan la idea de una activa participación de ROCK sobre estos cambios morfológicos hipocampales.

La prevención, en la disminución de espinas dendríticas por estrés, ejercida por Sertralina y Fasudil en este trabajo es un efecto que coincide con la prevención en conductas tipo depresivas (Anexo 1, sección 9.1). Esta relación entre la densidad de espinas dendríticas y las conductas tipo depresivas ha sido demostrada de igual forma por antidepresivos clásicos como Desipramina (Hajszan et al., 2009), Fluoxetina (Wang et al., 2013) y por uno de los agentes antidepresivos más promisorios y estudiados en la actualidad como Ketamina (Yang et al., 2015). En esta línea, resulta interesante la posibilidad a futuro de determinar los efectos de Sertralina y Fasudil en otras pruebas conductuales relacionadas a funciones hipocampales, como el laberinto de agua de Morris, ya que se ha visto una relación directa entre la pérdida de espinas dendríticas en CA1 y las alteraciones en memoria espacial (Eilam-Stock et al., 2012).

Un agente novedoso en el tratamiento de la depresión, como el antidepresivo de acción multimodal (inhibidor de la recaptura de serotonina y con efectos directos en ciertos receptores serotoninérgicos) Vortioxetina, también ha demostrado influir en la morfología hipocampal, ya que se encuentra descrito que este fármaco es capaz de aumentar la densidad de espinas dendríticas en CA1 (Chen et al., 2016), al igual que la terapia electroconvulsiva (Chen et al., 2009). Esta convergencia de efectos en las espinas dendríticas hipocampales, por una diversidad de agentes y tratamientos que son utilizados para la depresión mayor indican una clara relación de esta patología y su tratamiento, con el remodelamiento de espinas dendríticas que subyace a los cambios morfológicos informados en esta Tesis y en la literatura.

El diseño experimental de este trabajo tomó en cuenta los efectos de Sertralina y Fasudil en animales estresados, pero también en animales controles. Los resultados muestran que ambos fármacos fueron incapaces de cambiar la densidad de espinas de animales controles, lo que indica que el efecto dependería del estado fisiológico del animal. Existen antecedentes que muestran resultados similares en animales controles cuando se administró Amitriptilina

(Norrholm and Ouimet, 2001) o Fluoxetina (Chen et al., 2016) por 14 días. Mientras que con administraciones más prolongadas (mayor a 28 días) se produce un aumento en la densidad de espinas dendríticas (Chuang et al., 2012, Rubio et al., 2013, Chen et al., 2016), lo que explicaría la ausencia de un efecto observable cuando se evaluó este parámetro.

6.5.1 Sertralina y Fasudil parecen afectar diferencialmente la morfología de espinas dendríticas

La evaluación de la densidad de espinas dendríticas con respecto a la forma de las espinas fue capaz de mostrar algunas diferencias sutiles entre los fármacos estudiados. En general, se considera a las espinas delgadas y a los filopodios (denominado en la sección resultados como “Resto de las espinas”) como espinas plásticas de aprendizaje, mientras que las espinas maduras tipo callampa componen sinapsis más fuertes, por los que se las considera espinas de memoria (Bourne and Harris, 2008). Los resultados mostraron que el estrés crónico disminuyó principalmente las espinas diferentes a las espinas tipo callampa, lo que concuerda con el hecho de que este tipo de espinas son más sensibles al estrés e incluso a modelos que producen efectos tipo depresivos mediante administración crónica de corticosterona (Wang et al., 2013). Mientras que los fármacos estudiados mostraron diferencias en la densidad de espinas cuando fueron evaluadas en función a su morfología particular. Los resultados mostraron que en el caso de Sertralina, las espinas inmaduras o “resto de las espinas” no explican la prevención del efecto del estrés por si solas, existiendo una tendencia que, si bien no es estadísticamente significativa, sugiere que este fármaco estaría aumentando además la cantidad de las espinas tipo callampa. Un efecto mayoritario en este tipo de espinas ya ha sido reportado en la literatura para otros fármacos ISRS como Fluoxetina (Rubio et al., 2013) e incluso un estudio reciente mostró que Sertralina fue capaz de prevenir los efectos del estrés en la densidad de espinas, ejerciendo un efecto en espinas tipo callampa e inmaduras de la corteza prefrontal (Noorafshan et al., 2015). Por otra parte, Fasudil ejerce su acción fundamentalmente en las espinas inmaduras, de forma similar a la acción que ejerce otro inhibidor de ROCK, como Y-27632 en cultivos primarios de neuronas hipocampales (Swanger et al., 2015).

Otra diferencia que pudo ser evidenciada cuando se evaluó la densidad de espinas dendríticas totales en función a la distancia del soma, corresponde a que Fasudil fue capaz de ejercer un efecto a lo largo de toda la dendrita, mientras que Sertralina fundamentalmente en la zona más distal de ésta. Dicha discrepancia en este parámetro podría tener relación con mecanismos diferenciales que podrían estar explicando las acciones de estos fármacos sobre la densidad de espinas dendríticas. Esto, sumado a las diferencias en la proporción de las espinas tipo callampa mencionadas anteriormente constituye importantes elementos a tomar en cuenta para el análisis de los mecanismos moleculares que controlan el remodelamiento de espinas dendríticas y la plasticidad de espinas dendríticas.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo dan cuenta de un efecto tipo antidepresivo de Fasudil a nivel morfológico, en una magnitud similar al antidepresivo Sertralina. Estos resultados indican por un lado que la prevención de la disminución en la densidad de espinas dendríticas hipocampales no depende necesariamente de la inhibición en la recaptura de serotonina ni de la inhibición de ROCK. Mientras que, por otra parte, abre la puerta para explorar los eventuales mecanismos moleculares asociados, que son capaces de sustentar estos cambios, para esclarecer las vías asociadas al efecto preventivo.

6.6 Los efectos del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la densidad dendrítica no se explican por cambios en los niveles de las proteínas de adhesión celular

En este trabajo se evaluaron algunas proteínas de adhesión celular que se han relacionado con cambios morfológicos de las sinapsis hipocampales en la literatura (Anexo 3). Sin embargo, en ninguna de las proteínas evaluadas se observaron cambios estadísticamente significativos. Estos resultados parecen contradictorios con respecto a lo informado en relación a los cambios morfológicos, pero pueden ser explicados por diversos motivos, en su mayoría técnicos.

Por un lado, los niveles de la proteína NCAM no se vieron afectados, un resultado discrepante con respecto a la literatura en donde se reportan cambios en los niveles de esta

proteína en modelos de estrés crónico y en la utilización de agentes antidepresivos (Sandi, 2004). Esto es explicado de acuerdo al efecto diferencial que poseen las diferentes isoformas de esta proteína. El gen que codifica a la proteína NCAM sufre de *splicing* alternativo, lo que deriva en la generación de diferentes isoformas, dentro de las más importantes están NCAM-120, NCAM-140 y NCAM-180, las cuales poseen pesos moleculares de 120, 140 y 180 kDa, respectivamente (Cunningham et al., 1987). Estas isoformas comparten similitud en fragmentos extracelulares, pero difieren en su dominio citoplasmático (Jorgensen, 1995), lo que les confiere propiedades de señalización diferenciales. Tanto así que, se ha observado que ratas sometidas a estrés crónico presentan una disminución exclusiva del transcrito (Venero et al., 2002) y de la proteína de la isoforma NCAM-140 (Touyarot and Sandi, 2002), mientras que los niveles de NCAM 120 y 180 se mostraron inalterados. Considerando que en este trabajo se utilizó un anticuerpo que solo posee afinidad con la isoforma de 180 kDa, resulta lógica la ausencia de diferencias observada para esta proteína.

Por otro lado, la proteína N-CADHERINA interactúa con β -CATENINA y es capaz de estabilizar el citoesqueleto de actina (Huntley et al., 2002). Prueba de esto, se ha visto que el bloqueo de la función de N-CADHERINA como de β -CATENINA, desestabiliza espinas maduras lo que incrementa el número de filopodios en el hipocampo, aunque este cambio no determina una alteración en la densidad de espinas totales (Togashi et al., 2002, Okuda et al., 2007). Los resultados informados en esta Tesis, dan cuenta de variaciones en el número de espinas maduras e inmaduras entre los grupos experimentales utilizados. De acuerdo a estos resultados, cabría esperar una variación en la misma línea, pero a nivel molecular, reflejado en estas proteínas. Sin embargo, los resultados no muestran variación alguna cuando se evaluaron sus niveles. Para intentar explicar esta aparente incongruencia de las alteraciones morfológicas-moleculares, es necesario referirse a un trabajo de Bozdagi y colaboradores, en el que demostraron que en la fase tardía de la LTP existe síntesis de N-CADHERINA y ésta es reclutada inmediatamente a las nuevas sinapsis generadas (Bozdagi et al., 2010). Esto hace posible que los cambios puedan existir, pero de manera localizada y quizás en una cantidad tan baja con respecto al total, que no pueda ser determinado al evaluar un homogeneizado de hipocampo completo. Los resultados antes expuestos que dan cuenta de variaciones en la

proteína (Touyarot and Sandi, 2002) y el transcrito de NCAM-140 (Venero et al., 2002) dan fuerza a esta posibilidad, en relación a que fueron obtenidos mediante el uso de fracciones sinápticas enriquecidas (sinaptosomas). Todos estos antecedentes hacen imposible descartar la eventual participación de estas proteínas de adhesión celular, y deja abierta la posibilidad de que jueguen un rol importante en las alteraciones observadas a nivel morfológico.

6.7 Sertralina muestra un efecto similar al estrés sobre la masa de la proteína RHOA

Los mecanismos moleculares que subyacen a los cambios observados a nivel morfológico en esta Tesis no están del todo descritos, pero existe un consenso general en relación a la participación del citoesqueleto y las proteínas que lo controlan (Penzes et al., 2011). La vía de las GTPasas de la familia Rho es una de las más estudiadas y se encuentra descrita su función en el remodelamiento de espinas dendríticas (Martino et al., 2013). Existen reportes que indican la participación directa de antidepresivos sobre la dinámica de citoesqueleto, sugiriendo nuevos mecanismos que puedan explicar los efectos de este tipo de fármacos. Bianchi y colaboradores mostraron que Fluoxetina es capaz de modular elementos del citoesqueleto de forma diferencial en cuanto a su administración aguda y crónica, lo que puede explicar los cambios estructurales en las espinas dendríticas (Bianchi et al., 2009). Adicionalmente el estrés crónico ha mostrado participar, a través de la hormona CRH, disminuyendo el número de espinas delgadas en el hipocampo mediante un mecanismo dependiente de la activación de RHOA (Chen et al., 2013). En el presente trabajo, los niveles de RHOA se encuentran incrementados en el grupo de animales estresados, lo cual es coincidente con la pérdida de espinas dendríticas inmaduras o delgadas, replicando los resultados de estudios anteriores del Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética (Castaneda et al., 2015). Asimismo, solo Fasudil fue capaz de prevenir la pérdida de este tipo de espinas, lo que tiene sentido con una aparente prevención en los niveles de RHOA (resultado que tiende a ser significativo). Esto resultaría consistente con trabajos publicados de nuestro laboratorio (Castaneda et al., 2015, Garcia-Rojo et al., 2017) en donde el estrés se relaciona a un aumento de la actividad de RHOA-ROCK. Los animales

que recibieron Sertralina no muestran un efecto preventivo en espinas inmaduras, lo que coincide con la incapacidad de este fármaco para prevenir el aumento en la masa de la proteína RHOA por efecto del estrés. De todas maneras, los resultados aquí descritos no son capaces de determinar los niveles de activación de RHOA, ya que solo muestran niveles de masa de proteína. Queda por determinar el estado de activación de esta proteína G pequeña, para establecer la participación de ésta en un eventual efecto sobre las espinas dendríticas.

6.8 Los efectos del estrés y de los fármacos (Sertralina y Fasudil) sobre la densidad dendrítica no se explican por cambios en los niveles de las proteínas de remodelamiento de espinas dendríticas APT-1 y LIMK1

Por otro lado, se evaluaron otras proteínas que participan igualmente en la vía de las Rho GTPasas y que modulan la dinámica estructural de las espinas dendríticas, como APT-1 y LIMK. La proteína APT-1 depalmitoila a un activador de RHOA y es blanco del miR-138 (Siegel et al., 2009), por lo que fue un importante foco de evaluación en este trabajo. Sin embargo, no se observaron cambios en ningún grupo experimental. La evaluación de LIMK y su fosforilación activante, tuvo un resultado similar al no encontrar diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos experimentales. Esto es coincidente con resultados anteriores del Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética, en donde tampoco se encontraron cambios en dichos parámetros (Castaneda et al., 2015). Los resultados en ambas proteínas, tanto APT-1, como LIMK podrían descartar la participación de las vías RHOA y RAC en la dinámica estructural de espinas dendríticas. No obstante, es posible que los cambios en los niveles de estas proteínas en subpoblaciones o *pools* sinápticos no sean representados cuando se evalúan sus niveles en homogeneizados de hipocampo completo, ya que estos *pools* podrían corresponder a un pequeño porcentaje del total. Esto deja abierta la posibilidad de que todavía puedan existir cambios, los cuales serían evidenciados si se utilizaran muestras más representativas del comportamiento sináptico localizado de estas proteínas mediante técnicas de fraccionamiento subcelular.

6.9 El estrés incrementa los niveles del miR-138, efecto que es prevenido de forma total y parcial por Sertralina y Fasudil, respectivamente.

El miR-138 corresponde un miRNA extensamente estudiado en trabajos *in vitro*. En estos trabajos se relaciona al miR-138 con una regulación negativa del tamaño de espina (Siegel et al., 2009), además de la gran cantidad de reportes relacionados al cáncer que lo describen como un supresor de tumores (Bicker et al., 2014). La memoria de reconocimiento se correlaciona con la expresión del miR-138 en el sistema nervioso central (Tatro et al., 2013), antecedente que refuerza el rol que posee este miRNA en el cerebro. En modelos de estrés por separación materna se han descrito cambios en el perfil de expresión de miRNAs por fármacos como Fluoxetina, Ketamina y terapia electroconvulsiva, demostrando que los cambios en los miRNAs hipocampales representan un componente importante en las patologías inducidas por estrés (O'Connor et al., 2013). De igual manera, un reporte reciente del Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética indicó un incremento del miR-138 en animales estresados crónicamente (Castaneda et al., 2015). En este trabajo no solo se pudo corroborar este resultado, sino que además se pudo observar un importante aumento en los niveles de este miRNA y más interesante aún, se determinó que tanto Sertralina como Fasudil fueron capaces de prevenir este aumento del miRNA mediado por el estrés. En primer lugar, los cambios dependieron del estado fisiológico del animal, ya que, en animales controles, los fármacos no producen efectos. Este comportamiento resulta interesante en cuanto a que se repitió en gran cantidad de los diferentes parámetros evaluados a lo largo del trabajo, demostrando que el estrés es capaz de influir de forma significativa en las vías controladas o que controlan el remodelamiento de espinas dendríticas. En segundo lugar, la prevención en el aumento de los niveles del miR-138 fue total en Sertralina y parcial en el caso de Fasudil. Al igual que en las pruebas conductuales (diferencia en las conductas activas) y en los parámetros morfológicos (diferencia en la morfología de espina), se pudo evidenciar similitudes y diferencias entre un fármaco y otro.

El miR-138 se encuentra enriquecido en el cerebro, lo que sugiere que cumple un rol importante en este tejido (Obernosterer et al., 2006). De hecho, miR-138 se encuentra enriquecido en espinas dendríticas en una razón sinaptoneurosomas/homogeneizado total de

2,16 (Siegel et al., 2009). Ante un eventual efecto diferencial en subpoblaciones sinápticas de este miRNA y su blanco APT-1, sería interesante determinar sus niveles en fracciones sinápticas. Los resultados obtenidos, de igual manera muestran diferencias importantes en los niveles de miR-138 lo que sugiere que la variación corresponde a una magnitud significativa y es muy probable que ésta sea aún mayor al evaluar en sinaptoneurosomas. Por otro lado, se ha demostrado que los miRNAs sufren modificaciones post transcripcionales, las que pueden explicar su presencia diferencial en distintos tejidos (Obernosterer et al., 2006). Por tanto, es posible que los cambios que se describen para el miR-138 no solo se expliquen por cambios en su transcripción, sino que también pueden ser un reflejo de modificaciones en los mecanismos que controlan su procesamiento post transcripcional, como también en su degradación. Adicionalmente, se conoce que existen dos locus genómicos en diferentes cromosomas (MIR 138-1, MIR 138-2), los que codifican para dos formas precursoras diferentes de miR-138. Aunque ambas formas precursoras convergen en un mismo miRNA maduro, poseen diferencias en cuanto a su localización y a su expresión en procesos del desarrollo, entre otros (Bicker et al., 2014). Según su patrón de expresión y localización es muy probable que los cambios evidenciados en este trabajo sean el reflejo del precursor denominado pri-miR-138-2. Una forma de determinar la contribución de los cambios transcripcionales y de los diferentes locus genómicos en estos miRNAs, corresponde a la evaluación de especies precursoras de estas moléculas a través de qRT-PCR.

Estudios *in vitro* indican que el miR-138 reduce el tamaño de espinas dendríticas mediante la represión traduccional del mRNA de APT-1, con lo cual se vería favorecida la activación de la vía RHOA-ROCK. Esta reducción en el tamaño de espinas tiene una significancia funcional, de acuerdo a que es capaz de afectar las corrientes postsinápticas en el hipocampo (Siegel et al., 2009). Los resultados obtenidos dan cuenta de una relación entre la disminución en la densidad de espinas dendríticas y un concomitante incremento en los niveles de este miRNA, lo que no parece depender de la participación de APT-1 en el modelo *in vivo* utilizado. Es importante tener en cuenta que en el estudio realizado por Siegel y colaboradores, no se determinó la densidad de espinas dendríticas, al corresponder a un

estudio *in vitro*, aunque resulta interesante el hecho de que el miR-138 esté relacionado de manera tan evidente con los procesos que controlan la morfología de espinas. Los resultados obtenidos indican que los niveles de transcrito y proteína de APT-1 no se modifican, lo que indica un mecanismo diferente al descrito. De todas maneras, cabe la posibilidad de una acción del miR-138 de forma localizada sobre APT-1 en la espina o bien que este miRNA esté ejerciendo su acción reguladora sobre otras proteínas involucradas en el remodelamiento de espinas dendríticas. Recientemente Yoshikawa y colaboradores demostraron que los inhibidores de ROCK son capaces de facilitar la acción de los miRNAs sobre sus mRNAs blancos. En dicho estudio los autores describen que Fasudil y otros inhibidores de ROCK incrementan la interacción de la proteína ROCK con el factor transcripcional HNF4A, el cual a su vez aumenta la expresión de la proteína PAIP2, que promueve la degradación de transcritos unidos a miRNAs (Yoshikawa et al., 2015). Esto constituye un antecedente interesante que entrega más posibilidades en la interpretación de los resultados obtenidos y posiciona a Fasudil como un modulador de la actividad de los miRNAs en general.

Dada la correlación entre los resultados en varios aspectos evaluados en esta Tesis, es posible sugerir una relación directa entre los niveles de este miRNA y la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo. Si bien existe una coincidencia entre los perfiles de variación en ambos parámetros evaluados resulta imposible determinar si los niveles de miR-138 corresponden a una causa o a una consecuencia de los cambios morfológicos. Asimismo, sería interesante determinar a futuro si los efectos deletéreos del estrés sobre las pruebas conductuales realizadas y su prevención por los fármacos con acción antidepressiva utilizados dependen de la participación de este miRNA en particular. De igual manera queda por determinar experimentalmente el o los blancos que son regulados por este miRNA y cuáles son sus implicancias funcionales en el hipocampo.

6.10 El miR-138 se relaciona con vías y blancos relacionados a remodelamiento de espinas dendríticas

La relevancia de los cambios en los niveles de ciertos miRNAs puede ser determinada a diferentes niveles. Por ejemplo, en la búsqueda de marcadores de ciertas patologías o de respuesta a un determinado tratamiento, los niveles de los miRNAs corresponden a parámetros de utilidad por sí mismos. Desde otro punto de vista, los miRNAs han sido descritos como actores de un mecanismo de regulación traduccional novedoso que posiciona a estas pequeñas moléculas como parte de las cascadas transduccionales en las que participan sus blancos. En esta tesis se observó que el miR-138 varía sus niveles en relación al estrés y a los fármacos estudiados, por lo que resulta factible que estas variaciones en los niveles de este miRNA podrían tener un correlato funcional que posiblemente pudiera explicar ciertos efectos compartidos por Sertralina y Fasudil. Actualmente las bases de datos son capaces de entregar información muy valiosa acerca de los posibles blancos de un miRNA en particular, pero aún no hemos sido capaces de predecir con un 100% de probabilidad las interacciones que ocurren en un contexto real. Es por esto que la validación experimental sigue siendo la forma de confirmar la relación entre un miRNA y su transcrito blanco.

El miR-138 posee un gran número de potenciales blancos, los cuales fueron obtenidos mediante un programa que es capaz de compilar bases de datos. En primer lugar, el análisis estuvo enfocado en la determinación de blancos validados experimentalmente, ya que, según lo mencionado anteriormente, corresponden a blancos en los que se encuentra comprobada su interacción. De acuerdo a esto, resulta interesante la presencia de ciertas proteínas, como por ejemplo VCAN, ROCK2, y RHOC. La proteína Versican (VCAN) forma parte de la matriz extracelular que compone la red perineuronal, una estructura extracelular que sostiene e interactúa con las neuronas en áreas del cerebro como el hipocampo. Tanto así, que una disrupción en la red perineuronal hipocampal afecta el desempeño en algunas pruebas conductuales (Hylin et al., 2013). Existen receptores para componentes de la matriz en las neuronas, los cuales controlan la estabilidad de las espinas dendríticas por medio de cascadas transduccionales y está demostrado que la proteína Versican estabiliza espinas dendríticas (Levy et al., 2014). Por otro lado, ROCK2 y RHOC corresponden a proteínas pertenecientes

a la vía de las GTPasas de la familia Rho y fueron validados como blancos en estudios relacionados con el cáncer (Jiang et al., 2010). Sin embargo, estos blancos no fueron evaluados en este trabajo, por lo que queda por determinar su implicancia en los aspectos observados en esta Tesis. Todos estos antecedentes abren las posibilidades de que las variaciones del miR-138 tengan una significancia funcional en la morfología, a través de proteínas asociadas a remodelamiento. De todas maneras, la mayoría de los posibles blancos para este miRNA no han sido sometidos a pruebas para validarlos, por lo que es perfectamente posible que el miR-138 esté regulando a gran parte de los candidatos entregados (682 en total). Este escenario es altamente complejo y dista bastante de las aproximaciones simplistas en las que un miRNA se encuentra relacionado a un solo transcrito blanco. Es por esto que el programa INGENUITY[®], integra los resultados y determina las funciones y vías de transducción de señales asociadas con mayor presencia de blancos del miRNA en cuestión. Así, es posible visualizar la eventual regulación del miRNA en un contexto más general e inferir su significancia a nivel funcional de acuerdo a las cascadas transduccionales canónicas entregadas. Por un lado, se determinó que las funciones asociadas la morfología, crecimiento y desarrollo celular se encuentran altamente relacionadas a los blancos del miRNA. Asimismo, los blancos se relacionaron en alta probabilidad con “la función del sistema nervioso”, que está en absoluta concordancia con el tema de Tesis aquí expuesto, y además de una fuerte relación con el “crecimiento y proliferación celular en el cáncer”. Esto último relacionado con los estudios en los que se describe al miR-138 como un supresor de tumores (Jiang et al., 2010). De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible sugerir una relación importante de estos blancos con las funciones que determinan algunos resultados del presente trabajo. Adicionalmente, resulta muy interesante que dentro de las vías canónicas mayormente asociadas a estos blancos se encuentre la vía de las GTPasas de la familia Rho y la vía de RAC con 20 y 12 blancos, respectivamente.

Al identificar estos blancos putativos en las vías mencionadas es posible indicar que el miR-138 podría estar afectando proteínas en todos los niveles de esta red de transducción de señales, incrementando las posibilidades de que las variaciones observadas en este miRNA

tengan una consecuencia en los procesos que comandan el control morfológico y expliquen parte de los efectos del estrés y de los fármacos con acción antidepresiva en esta tesis. Dentro de la gran cantidad de blancos presentes en esta vía, la proteína BAIAP2 (mostrado en la Figura 31 como IRSp53) concita un interés especial de acuerdo a su relación ampliamente descrita con la dinámica de espinas dendríticas. Esta proteína se encuentra de forma abundante en la densidad post sináptica y mediante la regulación del citoesqueleto de actina, es capaz de influir en la densidad de espinas dendríticas (Kang et al., 2016). De hecho, la sobreexpresión de BAIAP2 en cultivos neuronales incrementa la densidad de espinas dendríticas, mientras que un *knockdown* de esta proteína la disminuye (Choi et al., 2005). Esta relación de BAIAP2 con la densidad de espinas dendríticas estaría en concordancia con los cambios observados en los niveles del miR-138, posicionando a esta proteína como un blanco promisorio. De todas formas, queda por determinar su validación como blanco y al mismo tiempo la evaluación de sus niveles para corroborar esta posibilidad de interacción que entregaría una relevancia funcional a las variaciones en los niveles del miR-138, descritas en esta Tesis.

6.11 Consideraciones finales

Los avances en la farmacología en el último tiempo no solo se han atribuido al descubrimiento de nuevos fármacos, sino además al “redescubrimiento” de fármacos existentes. Los avances en áreas como la epigenética, nos ha permitido explorar acciones que permiten comprender ciertos efectos adversos o bien descubrir efectos de relevancia terapéutica en áreas diferentes a las originalmente descrita. Además, esto conlleva la identificación de dianas farmacológicas que no habían sido tomadas en cuenta en el pasado. En el área de los fármacos relacionados al sistema nervioso central y en particular al tratamiento de la depresión, los avances no han sido del todo satisfactorios, de acuerdo a un desconocimiento general de las vías y mecanismos etiológicos y fisiopatológicos asociados a esta patología. En el último tiempo Vortioxetina, inhibidor de la recaptura de serotonina con acción directa además sobre ciertos receptores de este neurotransmisor y Ketamina,

antagonista de receptores de NMDA han concentrado el interés científico y representan los más novedosos agentes antidepresivos en los estudios actuales. Ketamina es también un ejemplo del “redescubrimiento” de fármacos ya existentes. Originalmente descrito como anestésico en 1962, actualmente se le atribuyen acciones antidepresivas con un inicio de acción rápido nunca antes visto, lo que es considerado como el avance más importante en el campo en las últimas décadas.

En este trabajo se buscó explorar conceptos que van en esta misma línea, ya que se proponen a los miRNAs como actores fundamentales en procesos relacionados con la etiología de la depresión, como el estrés y además con la acción de fármacos que han mostrado acciones antidepresivas. Más aún, el uso de Fasudil como un fármaco, que al igual que Ketamina, fue descrito originalmente con propósitos diferentes y ha mostrado tener una acción antidepresiva, permitió obtener información valiosa acerca de los efectos morfológicos y moleculares asociados a través de una comparación con el antidepresivo ISRS Sertralina.

Los resultados de este trabajo mostraron similitudes importantes en el efecto de ambos fármacos estudiados. Entre dichas similitudes se destaca el efecto en la densidad de espinas dendríticas, los patrones de expresión y fosforilación de las proteínas ERK2 y CREB, los transcritos y niveles protéicos de BCL-2 y finalmente en los niveles del miR-138. Existieron también diferencias sutiles en cuanto a la morfología de espinas y en el nivel de prevención mostrados en los niveles del miR-138. Como también diferencias marcadas como la reducción de miR-16 o los efectos en la ganancia de peso y defecación, todos los cuales fueron exclusivos de Sertralina. Una convergencia en general de los parámetros evaluados, sumado a diferencias puntuales, sugiere que ambos fármacos, a pesar de su naturaleza estructural son capaces de compartir aspectos específicos inesperados de acuerdo al conocimiento actual de estos agentes farmacológicos. A propósito de los efectos conocidos de los fármacos utilizados, es importante mencionar que Fasudil ha sido descrito como un potente vasodilatador, característica que fundamenta su utilización en los países donde ha sido aprobado. Por tanto, sería importante considerar los efectos de esta vasodilatación a nivel cerebral, lo que podría explicar parte de sus efectos *in vivo*.

En general, se pudo observar que, en gran cantidad de aspectos evaluados en esta tesis, los cambios dependieron del estado fisiológico del animal y que en algunos casos la condición de estrés pareció incrementar la sensibilidad de respuesta ante los fármacos. De hecho, los efectos más importantes ejercidos de forma convergente por ambos fármacos tuvieron lugar en un contexto de estrés. Cabe destacar, además, que los resultados en donde fue posible evidenciar cambios estadísticamente significativos correspondió en su gran mayoría a proteínas o mRNAs localizados preferentemente en el soma, como ERK, CREB y BCL-2; mientras que las proteínas asociadas a remodelamiento de espinas dendríticas, cuya función se relaciona a la espina dendrítica, no mostraron variaciones. Esta diferencia podría radicar en la naturaleza de la muestra utilizada en la evaluación de dichos parámetros, ya que la utilización de homogeneizado de hipocampo no permite determinar las variaciones específicas localizadas en la sinapsis.

Por otro lado, desde un punto de vista farmacocinético, la administración de ambos fármacos en una dosis única diaria debe ser considerada en el análisis e interpretación de los resultados. Algunas características y propiedades farmacocinéticas varían bastante entre los fármacos utilizados. Dentro de las cuales, se encuentra el tiempo de vida media, que corresponde a 26 h en el caso de Sertralina, mientras que para Fasudil e hidroxifasudil (metabolito activo) este tiempo es de 0,78 h y 4,66 h, respectivamente. Tales diferencias podrían explicar parcial o totalmente las variaciones observadas cuando se comparan los resultados de ambos fármacos. Sugiriendo de esta manera, que el esquema posológico utilizado para Fasudil podría resultar insuficiente para obtener un efecto farmacológico comparable con Sertralina en alguno de los parámetros evaluados.

El esquema posológico empleado se sustenta en replicar el modelo experimental utilizado en pruebas conductuales, que son la base de este estudio, y que permitieron explorar a nivel morfológico y molecular lo observado anteriormente en dichas pruebas. La naturaleza de la interacción de un fármaco con su receptor determina muchas veces el formato posológico utilizado. Por ejemplo, la inhibición irreversible de la bomba de protones por parte de Omeprazol, determina que la duración del efecto terapéutico dependa del tiempo de recambio de esta proteína y no necesariamente de la vida media del fármaco. En el caso de

Fasudil, al no conocer con certeza la o las dianas responsables de los efectos aquí informados no es posible determinar si la administración diaria en una dosis es la más apropiada y es comparable con el efecto informado por Sertralina. Existen estudios en los que se administra Fasudil mediante el agua que el animal consume *ad libitum* (Meziane et al., 2016), obteniendo así una administración constante, pero sin un control de la dosis suministrada. Es por esto que aparece como una opción interesante, la utilización de un diseño experimental que involucre más de una administración del fármaco, en futuros estudios.

Las consideraciones farmacocinéticas antes expuestas podrían sustentar las diferencias en magnitud que se observan en la prevención del aumento del miR-138 producido por el estrés. Sugiriendo de esta forma que la dosis o el esquema posológico utilizado para Fasudil resultó insuficiente para obtener una prevención total, como Sertralina. Asimismo, la diferencia aparente (no significativa) en la morfología de las espinas dendríticas que sustentan la prevención en la disminución de su densidad, por parte de ambos fármacos, podría ser resultado de lo mismo. Esto explicaría que los efectos de Fasudil sobre las espinas dendríticas se concentren principalmente en las espinas inmaduras (diferentes a las tipo callampa), dado que éstas corresponden a una estructura que precede a una espina madura y funcional como la del tipo callampa (Lippman and Dunaevsky, 2005). Es posible, por lo tanto, que sea necesaria una mayor cantidad de administraciones del fármaco en el día para establecer espinas maduras y obtener un efecto comparable al de Sertralina.

Finalmente, esta tesis entrega la primera evidencia de que la prevención de los efectos deletéreos del estrés (sobre la conducta de inmovilidad en el FST y la densidad de espinas dendríticas) se relacionan a la prevención del incremento en los niveles de un miRNA en particular y más aún que este efecto es compartido por fármacos con mecanismos de acción (conocidos hasta ahora) diferentes. La convergencia de los efectos de estos dos fármacos en los niveles de un miRNA corresponde a un antecedente que abre la posibilidad de que existan mecanismos diferentes a los ya conocidos, que expliquen el efecto terapéutico de los fármacos denominados antidepresivos.

7) CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral permitieron cumplir con la totalidad de los objetivos propuestos y de esta manera fue posible confirmar la hipótesis planteada de forma parcial.

Por lo tanto, la presente Tesis doctoral permitió concluir que:

El inhibidor de ROCK Fasudil, al igual que el antidepresivo Sertralina, activa la vía de sobrevida CREB-BCL-2 y previene los efectos del estrés sobre la densidad de espinas dendríticas hipocampales, lo que se relaciona con el cambio en los niveles del miR-138 en un contexto de estrés.

Este trabajo demuestra en su conjunto que Fasudil, un fármaco cuyo mecanismo de acción dista bastante de los ejercidos por antidepresivos, es capaz de ejercer acciones similares al antidepresivo Sertralina, en aspectos tanto morfológicos como moleculares en el hipocampo (Figura 33). Estos efectos se relacionan al cambio en los niveles de un miRNAs relacionado con alta probabilidad a procesos de remodelamiento de espinas dendríticas, abriendo la posibilidad de explorar nuevos puntos de convergencia que sean capaces de explicar las acciones antidepresivas *per se*.

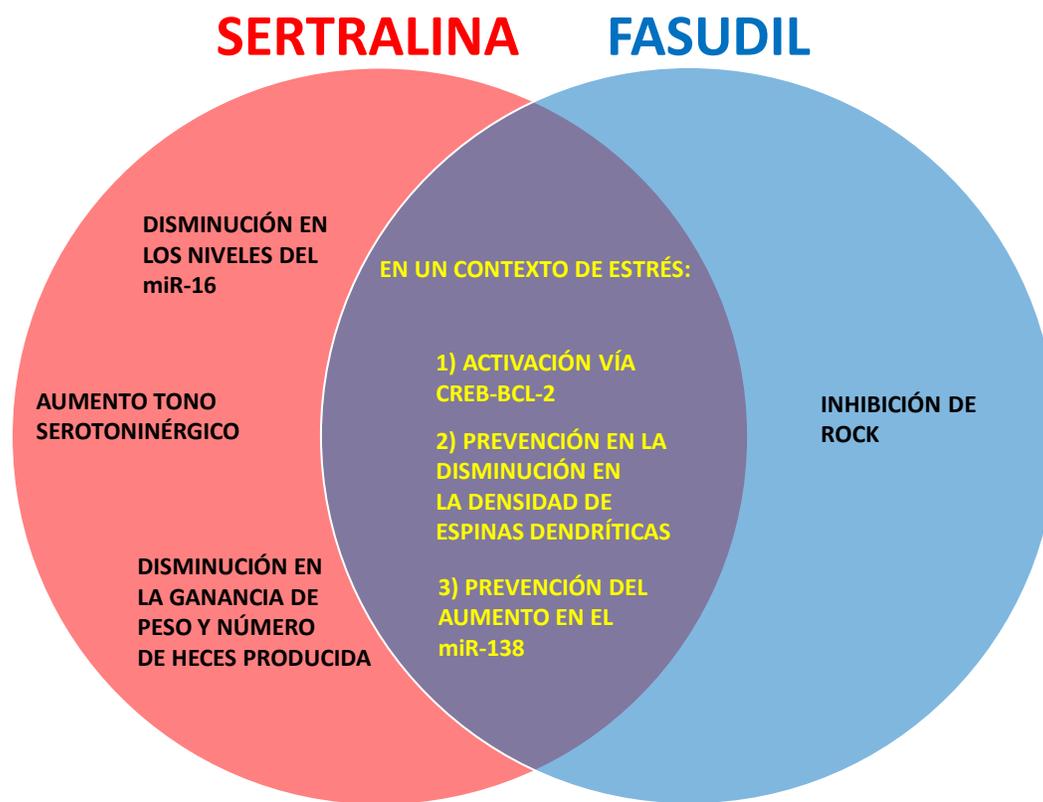


Figura 33. Esquema gráfico de las conclusiones. La figura muestra una esquematización de las principales conclusiones obtenidas en este trabajo. Fasudil es capaz de inhibir a ROCK, mientras que el fármaco Sertralina, a diferencia de Fasudil, produce inhibición de la recaptura de serotonina, una disminución en la ganancia de peso, en la cantidad de heces producida en el protocolo de estrés y en los niveles del miR-16. Las acciones compartidas por ambos fármacos en nuestro modelo de estudio fueron producidas en un contexto de estrés y corresponden a lo siguiente: 1) Activación de la vía CREB-BCL-2; 2) Prevención de la disminución en la densidad de espinas dendríticas, producida por el estrés; 3) Prevención del aumento en los niveles del miR-138, producido por el estrés.

8) LIMITACIONES Y PROYECCIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y a la discusión en relación a éstos, es posible identificar ciertas limitaciones en el desarrollo de esta Tesis. En primer lugar, no fue posible determinar el nivel de incremento en la concentración de corticosterona durante el protocolo de estrés, impidiendo de esta forma la evaluación de la sensibilidad del eje HHA en estos animales. Resultaría interesante determinar estos parámetros en el futuro para conocer si los fármacos Sertralina y Fasudil son capaces de influenciar la liberación de la corticosterona o los niveles máximos de liberación en el estrés. Asimismo, resulta importante determinar de qué manera es activada la vía CREB-BCL-2, ya que como fue descrito en este trabajo, dicha activación fue independiente de ERK, dejando como una proyección la determinación del origen de la activación de esta cascada transduccional. En el caso de la prevención de la disminución en la densidad de espinas dendríticas, se hace necesario corroborar la tendencia que establece una diferencia en la forma de espina afectada por un fármaco u otro.

Una limitación importante en este estudio fue la incapacidad de evaluar los niveles de proteínas, mRNAs y miRNAs en fracciones sinápticas, por lo que una importante proyección considera la exploración de estos parámetros en una muestra enriquecida en elementos sinápticos como puede ser un sinaptoneurosoma. De esta forma sería posible confirmar o descartar la participación de muchas proteínas y miRNAs que no mostraron diferencias en este trabajo. Finalmente, la proyección más inmediata y significativa que deja esta Tesis corresponde a la validación y evaluación de blancos del miR-138, además de la determinación de una significancia funcional de las variaciones ejercidas por el estrés y los fármacos utilizados.

9) ANEXOS

9.1 ANEXO 1: Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales corresponden a herramientas muy valiosas en el estudio y descubrimiento de nuevos fármacos. Éstas son capaces de mostrar el efecto final de una molécula, luego de que un sinnúmero de mecanismos se produce en el organismo del animal de experimentación. Lo que permite entregar información del producto final resultante de procesos de altísima complejidad.

Para demostrar el efecto de las moléculas estudiadas sobre la eficacia antidepressiva, el aprendizaje asociativo y la memoria, se exponen los resultados existentes para Sertralina y Fasudil en la prueba de nado forzado y la prueba de condicionamiento por evitación activa. Los experimentos no fueron realizados en el marco de esta Tesis, sin embargo, corresponden a resultados anteriores del Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética, publicados en el caso de Sertralina (Ulloa et al., 2010) y no publicados para Fasudil. Los animales utilizados fueron sometidos a los mismos protocolos de estrés y administración de fármacos descritos en la presente Tesis. Las pruebas se realizaron según el trabajo realizado por Ulloa y colaboradores (Ulloa et al., 2010). De acuerdo a la importancia de estos resultados, los cuales complementan los datos entregados en el presente documento, se incluyen como anexo.

9.1.1 Prueba de Natación Forzada

La prueba de natación forzada o nado forzado (FST, del inglés *forced swim test*), es utilizada frecuentemente para evaluar la eficacia de potenciales fármacos antidepressivos en roedores. 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 (Slattery and Cryan, 2012). El tratamiento antidepressivo disminuye la conducta

de inmovilidad, cambio acompañado por un aumento en la respuesta activa o de escape (escalar y nadar) (Lucki, 1997).

En condiciones normales los animales pasan un 60% del tiempo en conductas activas y un 40% inmóviles. Sin embargo, las ratas estresadas muestran un aumento significativo en el tiempo que permanecieron inmóviles, disminuyendo por consecuencia el tiempo en conductas activas (Fig. Sup. 1). Tanto Sertralina como Fasudil fueron capaces de prevenir el aumento en la inmovilidad producido por el estrés, mediante un aumento en las conductas activas. Sertralina aumentó el tiempo de nado (Fig. Sup. 1 A), mientras que Fasudil aumentó significativamente el tiempo de escalamiento (Fig. Sup. 1 B). Finalmente, ninguno de los fármacos utilizados mostró variaciones cuando fueron administrados en animales no estresados (C-SERT y C-FAS).

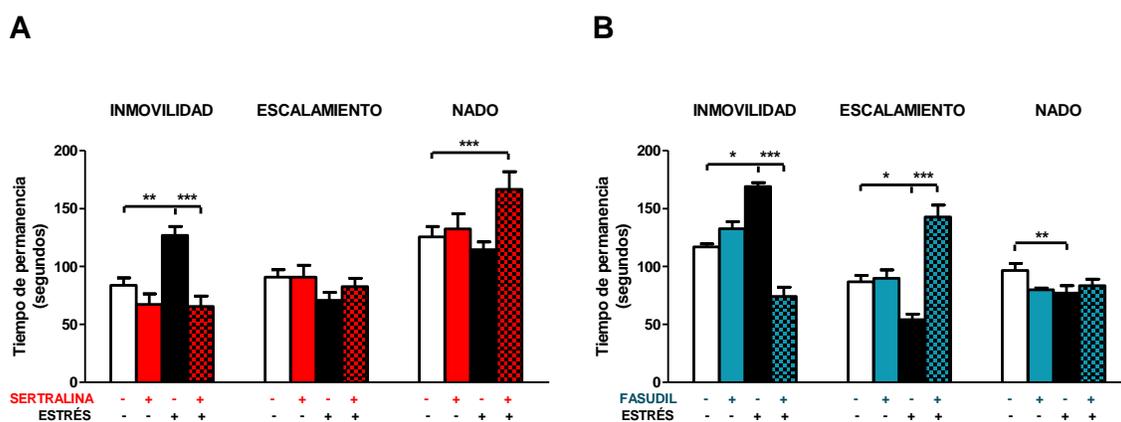


Figura suplementaria 1. Efecto Sertralina y Fasudil en la prueba del nado forzado. A/B) Los gráficos muestran el tiempo de permanencia (promedio \pm E.E.M.) expresado en segundos para la conducta de inmovilidad y las conductas activas, que corresponden a escalamiento y nado. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del post test de Bonferroni. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Tamaño muestral en figura A: C-SAL, $n = 13$; C-SERT, $n = 14$; E-SAL, $n = 8$; E-SERT, $n = 7$. Tamaño muestral en figura B. C-SAL, $n = 7$; C-FAS, $n = 5$; E-SAL, $n = 7$; E-FAS, $n = 6$.

En el FST, está reportado que el estrés crónico aumenta el tiempo de inmovilidad, lo cual es consistente con los resultados mostrados y es usualmente interpretado en la literatura como una conducta depresiva denominada “desesperanza”. Todos, o la gran mayoría de los antidepresivos que existen actualmente (incluyendo Sertralina) logran reducir el tiempo de inmovilidad en esta prueba (Cryan et al., 2005). De acuerdo a que Fasudil es capaz de prevenir el aumento en la inmovilidad, se le considera a la luz de los resultados, como un agente farmacológico con acción antidepresiva.

La disminución del tiempo de inmovilidad implica un aumento en las conductas activas y de acuerdo a esto, se encuentra reportado que los antidepresivos que incrementan la transmisión serotoninérgica muestran un aumento predominantemente en el nado, mientras que los que afectan la transmisión noradrenérgica se relacionan con incrementos en el escalamiento (Detke et al., 1995). Sertralina muestra un aumento en la respuesta activa de natación, lo cual es consistente con el aumento en la transmisión serotoninérgica que es capaz de producir este fármaco. Por otro lado, Fasudil presentó un perfil similar a los fármacos que incrementan la transmisión noradrenérgica, reproduciendo los resultados obtenidos para el antidepresivo Desipramina en estudios anteriores del laboratorio (Bravo et al., 2009). Sin embargo, hasta la fecha no existe información que relacione a Fasudil con la transmisión noradrenérgica. En un estudio reciente, se determinó que inyecciones bilaterales repetidas (24 h, 4 h y 15 min antes de la prueba de natación forzada) de otro inhibidor de ROCK, Y-27632, en la corteza infralímbica fue capaz de aumentar ambas conductas activas simultáneamente (Inan et al., 2015). De forma similar a los fármacos que actúan sobre la transmisión serotoninérgica y noradrenérgica de forma conjunta. Según esto, es posible que las conductas activas diferenciales solamente coincidan con la naturaleza de los antidepresivos clásicos, pero sean otros los factores que las determinen. De cualquier forma, queda de manifiesto un efecto tipo antidepresivo de Fasudil en el FST de acuerdo a la prevención en el tiempo de inmovilidad.

No está demás indicar que actualmente la interpretación de los resultados en el FST ha sido un tema controversial en la comunidad científica. Esto debido a que existen autores que postulan que esta conducta, lejos de reflejar aspectos de la depresión, correspondería a una

respuesta adaptativa en la que el animal aprende de la primera sesión de la prueba, y en la segunda busca guardar energía y esperar, ante una situación inescapable (Molendijk and de Kloet, 2015). De cualquier forma, existen reportes que muestran que los antidepresivos logran reducir el tiempo de inmovilidad incluso en la primera sesión (Overstreet et al., 2004), sugiriendo que el aprendizaje no jugaría un rol en la utilidad de esta prueba como indicador de la actividad antidepresiva. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta las limitaciones de esta prueba como indicador de conductas depresivas, sin embargo, se mantiene vigente como una herramienta inicial que permite la identificación de fármacos con acción antidepresiva. La validez predictiva altísima con la que cuenta el FST para identificar fármacos con acción antidepresiva apoya su utilización, aunque se sugiere la realización de una prueba para determinar actividad locomotora, en paralelo. Esto debido a que la mayoría de los falsos positivos que han sido reportados corresponden a sustancias que aumentan la locomoción (Cryan et al., 2005). En este sentido existen antecedentes en roedores que muestran que Fasudil no altera la actividad locomotora en el test de campo abierto (Yoshimi et al., 2010), indicando que los resultados acá expuestos no corresponderían a este tipo de falsos positivos.

9.1.2 Prueba de condicionamiento por evitación activa

La prueba de condicionamiento por evitación activa mide la capacidad del animal para relacionar un estímulo sonoro que precede a una descarga eléctrica y de esta manera, evitar un evento aversivo (respuesta condicionada). Es por esto que provee una forma de evaluar el aprendizaje asociativo y la memoria (Mora and Díaz-Véliz, 1993). Para evaluar si Sertralina o Fasudil previenen alteraciones cognitivas se realizó la prueba de condicionamiento por evitación activa. En este modelo, la respuesta condicionada 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 Figura suplementaria 2 (A y B) se observa que los animales sometidos a restricción de movimiento presentan una disminución significativa en la capacidad para adquirir

respuesta condicionada en comparación con los animales controles. Los animales estresados sólo logran 10% de la ARC en comparación con aproximadamente el 30% en los animales controles. Estos resultados indican que la restricción de movimiento provoca un deterioro en la capacidad asociativa y por ende en la capacidad cognitiva de los animales. Este efecto fue prevenido por Sertralina ($p < 0,05$; E-SAL vs E-SERT) y Fasudil ($p < 0,001$; E-SAL vs E-FAS) indicando que ambos son capaces de prevenir las alteraciones en el aprendizaje asociativo producidas por el estrés crónico. La Sertralina por sí sola también gatilló una disminución significativa ($p < 0,001$) en la capacidad de adquirir respuesta condicionada, respecto de los animales controles (Fig. Sup. A). A diferencia de Fasudil, que no produce modificación en el ARC de animales controles (Fig. Sup. 2 B).

La prueba de condicionamiento por evitación activa también entrega información respecto al porcentaje de fallas en el escape (FE) que puede ser interpretada como un reflejo de la condición de desesperanza aprendida.

Los animales con restricción de movimiento fracasan en un alto porcentaje (aproximadamente un 25%) al momento de escapar del shock eléctrico, posterior al tono audible. 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. Bajo esta condición de estrés, la administración de Sertralina ($p < 0,001$; E-SAL vs E-SERT) y Fasudil ($p < 0,01$; E-SAL vs E-FAS) previnieron las fallas en el escape, mejorando la capacidad de evitar el choque eléctrico (Fig. Sup. 2 C y D). Lo que podría ser interpretado como una prevención de la condición de desesperanza.

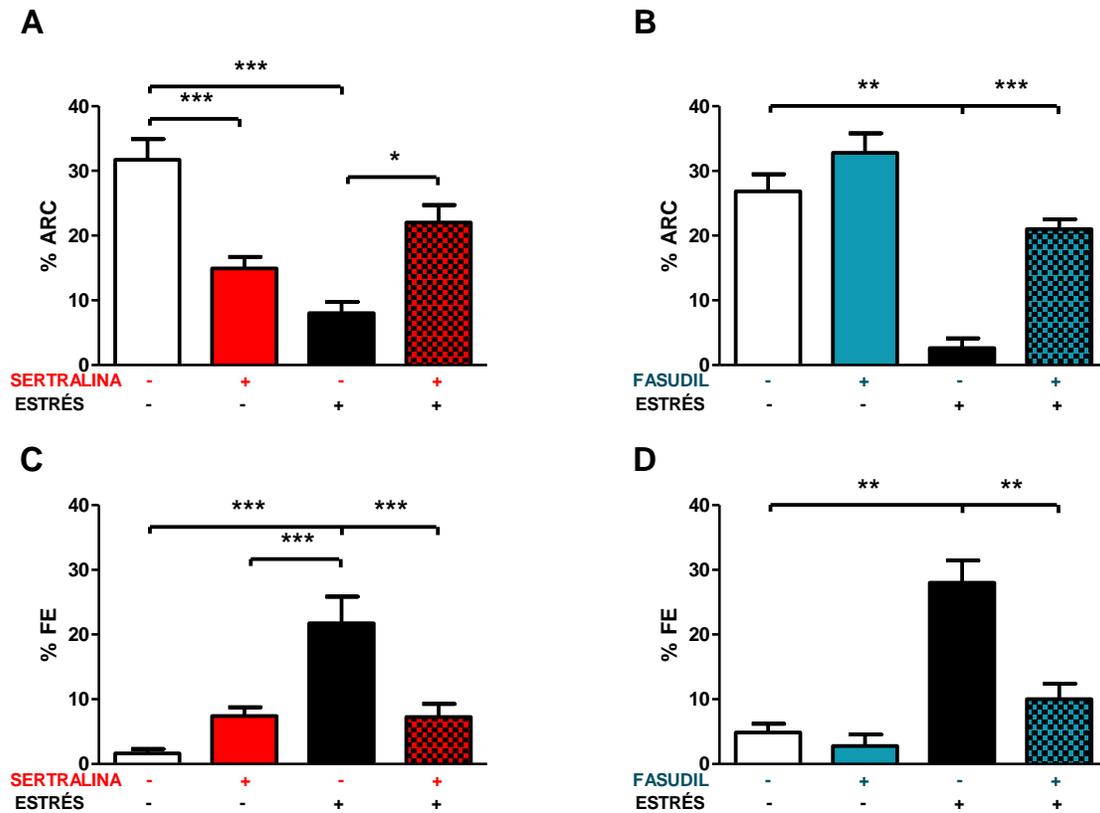


Figura suplementaria 2. Efecto de Sertralina y Fasudil en la prueba de condicionamiento por evitación activa. A/B) Las barras corresponden a la adquisición de respuesta condicionada (ARC) expresada como porcentaje del total (promedio \pm E.E.M.). El ARC se definió como el cruce a la plataforma opuesta de la jaula, antes de 5 s desde el tono audible, con lo que el animal fue capaz de prevenir el shock eléctrico. C/D) Las barras corresponden a las fallas en el escape expresado como porcentaje del total (promedio \pm E.E.M.). Esta conducta correspondió a la permanencia en la plataforma por lo menos 10 s desde el tono audible, con lo que el shock eléctrico incidió en el animal. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del post test de Bonferroni. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Tamaño muestral en figura A: C-SAL, $n = 13$; C-SERT, $n = 14$; E-SAL, $n = 8$; E-SERT, $n = 7$. Tamaño muestral en figura B. C-SAL, $n = 7$; C-FAS, $n = 5$; E-SAL, $n = 7$; E-FAS, $n = 6$.

9.2 ANEXO 2: Determinación de la secuencia del adaptador universal empleado en la evaluación de los niveles de miRNAs

Para la evaluación de los niveles de miRNAs se realizó una transcripción inversa de los miRNAs. Este proceso involucra una Poliadenilación, que precede a la unión de un adaptador universal para extender su tamaño. Esta extensión permite la unión del partidor específico (para el miRNA) y un partidor universal que es capaz de unirse a la secuencia del adaptador mencionado (Figura suplementaria 3). Con la finalidad de conocer la secuencia específica del adaptador universal empleado en esta metodología se realizó una clonación del producto de PCR de los miRNAs 16 y 138 en el vector plasmidial pGemT-easy. Luego, el vector conteniendo el producto de PCR indicado, fue insertado en bacterias *E. Coli* (DH5 α) mediante la técnica de transformación por quimiocompetencia. De esta forma, el producto de PCR fue aislado, purificado y posteriormente secuenciado (Unidad de secuenciación automática, Facultad de ciencias biológicas Universidad Católica de Chile). La Figura suplementaria 3 muestra la secuencia del adaptador universal y la secuencia del miR-16 unido a ésta. Cabe destacar, que el producto de PCR de miR-138 entregó exactamente la misma secuencia para el adaptador, confirmando de esta forma el resultado obtenido y la presencia de este fragmento en productos de PCR de miRNAs diferentes. Todo esto demuestra que la metodología empleada en la evaluación de los niveles de miRNA permite determinar de forma específica los niveles de estas moléculas, a pesar de su reducida longitud.

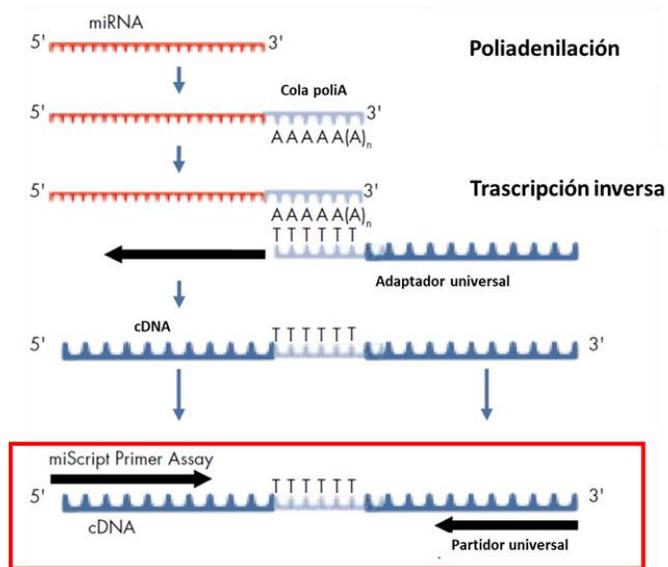
A**B**

Figura suplementaria 3. Metodología utilizada en la evaluación de niveles de miRNAs y secuencia del adaptador universal. A) El esquema muestra los pasos conducentes a la evaluación de los niveles de miRNAs, a través del kit miScript Primer Assay (QIAGEN, California, EE.UU.). Se adiciona una cola de poliA en el extremo 3' del miRNA, posteriormente se adiciona un adaptador universal y se efectúa la transcripción inversa, que da como resultado una hebra de cDNA con la longitud suficiente para que los partidores (específico del miRNA y universal) puedan unirse por complementariedad de bases. B) La imagen corresponde a la secuencia del adaptador universal unido a la secuencia correspondiente al cDNA del miR-16. Además, se muestran las regiones en las que se unen los partidores (del miR-16 y universal).

9.3 ANEXO 3: Evaluación de las proteínas de adhesión celular NCAM, N-CADHERINA y β -CATENINA

Los circuitos sinápticos están formados por conexiones entre grupos de neuronas que permiten el establecimiento de redes de comunicación (Sandi, 2004). El crecimiento de dendritas, filopodios y espinas ocurre no solo por fuerzas protrusivas de polimerización de actina, sino que además contribuyen las interacciones relacionadas con procesos de adhesión celular (Luo, 2002). En relación a esto, se ha descrito que la proteína de adhesión NCAM (del inglés *neural cell adhesion molecule*) está involucrada en procesos de plasticidad sináptica, neurogénesis y migración celular (Sairanen et al., 2007). Además, NCAM aumenta sus niveles en el hipocampo de ratas tratadas crónicamente con el antidepresivo Imipramina (Sairanen et al., 2007) y se encuentra disminuido en pacientes depresivos (Varea et al., 2012). En estudios donde se utilizaron *knock-outs* de NCAM se determinó que esta proteína es fundamental en la formación de nuevas espinas dendríticas y en el fortalecimiento de las mismas (Dityatev et al., 2000). Antecedentes que refuerzan su rol en el remodelamiento de espinas dendríticas.

La proteína N-CADHERINA pertenece a una familia de glicoproteínas de transmembrana enriquecida en los elementos pre y postsinápticos de sinapsis excitatorias en variadas regiones del cerebro (Hirano and Takeichi, 2012). N-CADHERINA es capaz de regular la morfología de espinas dendríticas (Bozdagi et al., 2010). El bloqueo de la función de la N-CADHERINA en cultivos neuronales hipocampales produce un incremento en el número de filopodios, sugiriendo un rol en la estabilidad de espinas (Togashi et al., 2002). La proteína β -CATENINA también ha sido asociada al remodelamiento de los árboles dendríticos mediante su participación en los contactos sinápticos (Cline, 2001). Se ha reportado que β -CATENINA puede actuar como factor transcripcional de genes que controlan la morfología celular, antecedente que da cuenta de la diversidad de funciones de esta proteína (Novak and Dedhar, 1999). La sobre-expresión de β -CATENINA aumenta la arborización dendrítica, mientras que la delección de su gen, desestabiliza espinas maduras e incrementa el número de filopodios (Okuda et al., 2007). Más interesante aún resulta la interacción entre N-CADHERINA y β -CATENINA, la cual estabiliza el citoesqueleto de actina y es capaz de regular diversas vías de señalización, incluyendo las que controlan las

GTPasas de la familia Rho (Huntley et al., 2002). Estos antecedentes posicionan a estas proteínas como actores importantes en el proceso de remodelamiento de espinas dendríticas, por lo que se evaluaron sus niveles proteicos sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

Las siguientes figuras corresponden a los resultados obtenidos en la evaluación de proteínas de adhesión celular.

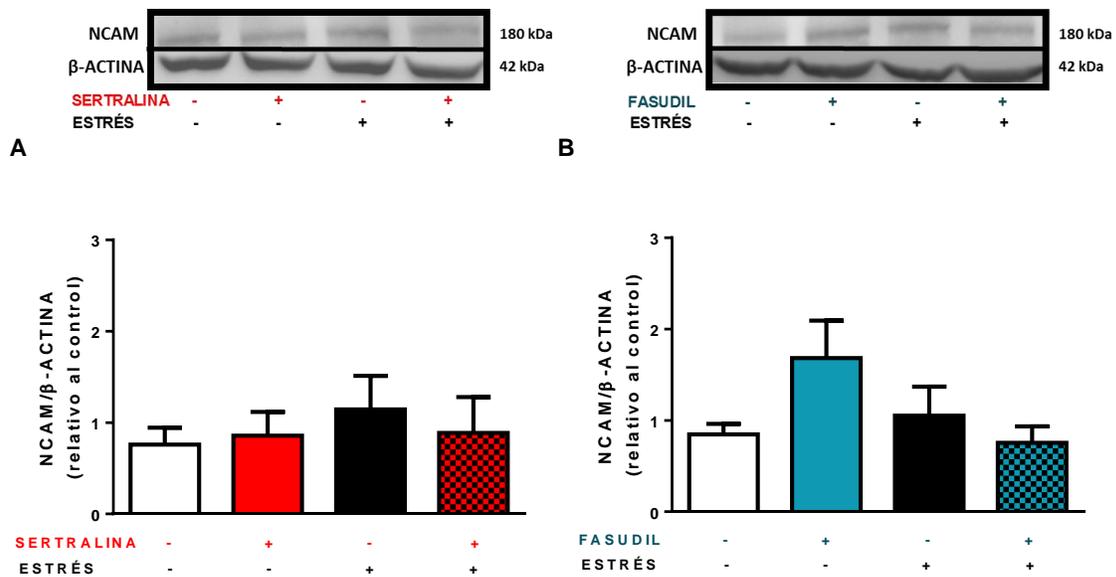


Figura suplementaria 4. Determinación de los niveles de NCAM. La parte superior de la figura muestra los *Immunoblots* representativos de las proteínas evaluadas. A/B) Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. del análisis densitométrico de los niveles de la proteína NCAM normalizado por β -ACTINA. Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney, sin encontrar diferencias significativas. N=5 para todas las condiciones experimentales.

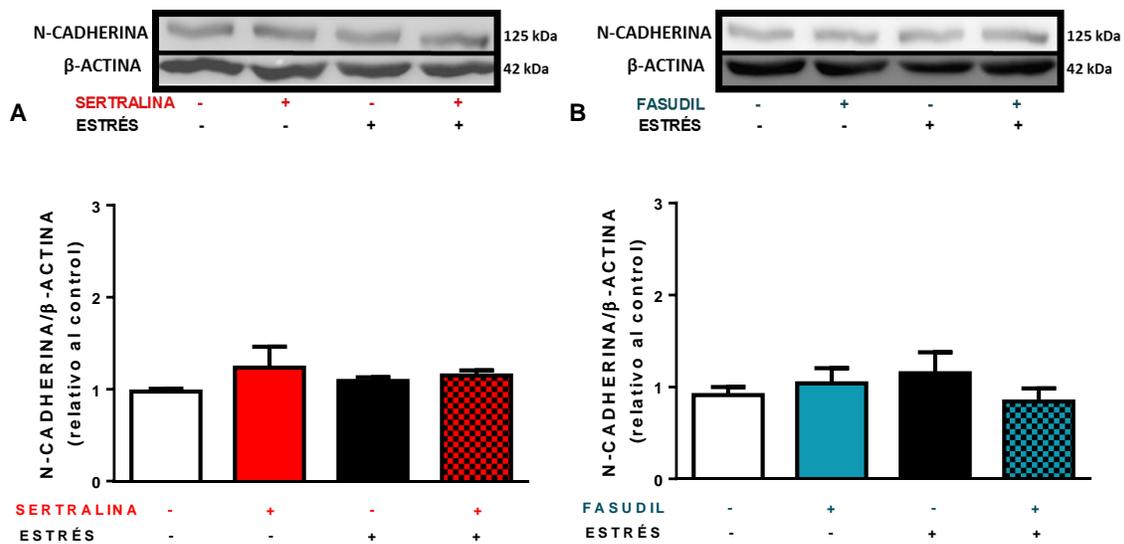


Figura suplementaria 5. Determinación de los niveles de N-CADHERINA. La parte superior de la figura muestra los *Inmunoblots* representativos de las proteínas evaluadas. A/B) Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. del análisis densitométrico de los niveles de la proteína N-CADHERINA normalizado por β -ACTINA. Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney, sin encontrar diferencias significativas. N=5 para todas las condiciones experimentales.

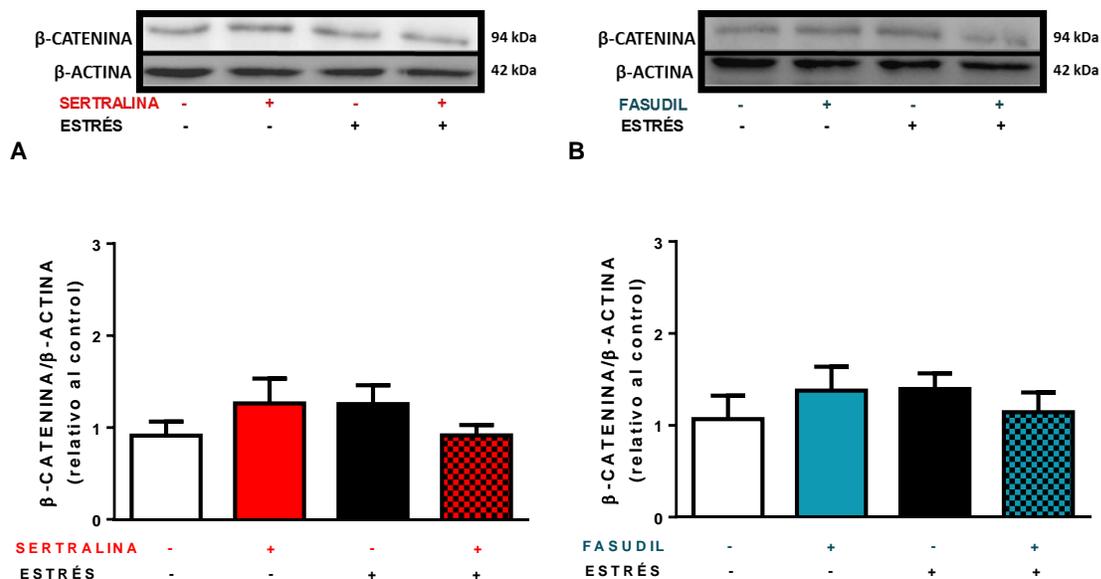


Figura suplementaria 6. Determinación de los niveles de β -CATENINA. La parte superior de la figura muestra los *Inmunoblots* representativos de las proteínas evaluadas. A/B) Los gráficos de barras corresponden al promedio \pm E.E.M. del análisis densitométrico de los niveles de la proteína β -CATENINA normalizado por β -ACTINA. Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney, sin encontrar diferencias significativas. N=5 para todas las condiciones experimentales.

10) BIBLIOGRAFÍA

- Abdel Salam OME (2004) Fluoxetine and sertraline stimulate gastric acid secretion via a vagal pathway in anaesthetised rats. *Pharmacol Res* 50:309-316.
- Afzal A (2015) Fluoxetine causes decrease in intestinal motility. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology* 1.
- Alario P, Gamallo A, Beato MJ, Tranco G (1987) Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. *Physiol Behav* 40:29-32.
- Altar CA (1999) Neurotrophins and depression. *Trends in pharmacological sciences* 20:59-61.
- American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Washington, DC.
- Arroll B, Elley CR, Fishman T, Goodyear-Smith FA, Kenealy T, Blashki G, Kerse N, Macgillivray S (2009) Antidepressants versus placebo for depression in primary care. *Cochrane Database Syst Rev* Cd007954.
- Bamburg JR (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* 15:185-230.
- Bateup HS, Denefrio CL, Johnson CA, Saulnier JL, Sabatini BL (2013) Temporal dynamics of a homeostatic pathway controlling neural network activity. *Frontiers in molecular neuroscience* 6:28.
- Baudry A, Mouillet-Richard S, Schneider B, Launay JM, Kellermann O (2010) miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science* 329:1537-1541.
- Bedrosian TA, Fonken LK, Walton JC, Haim A, Nelson RJ (2011) Dim light at night provokes depression-like behaviors and reduces CA1 dendritic spine density in female hamsters. *Psychoneuroendocrinology* 36:1062-1069.
- Bianchi M, Shah AJ, Fone KC, Atkins AR, Dawson LA, Heidbreder CA, Hows ME, Hagan JJ, Marsden CA (2009) Fluoxetine administration modulates the cytoskeletal microtubular system in the rat hippocampus. *Synapse* 63:359-364.
- Bicker S, Lackinger M, Weiß K, Schrott G (2014) MicroRNA-132, -134, and -138: a microRNA troika rules in neuronal dendrites. *Cell Mol Life Sci* 71:3987-4005.
- Blendy JA (2006) The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biological psychiatry* 59:1144-1150.
- Bourne JN, Harris KM (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual review of neuroscience* 31:47-67.
- Bozdagi O, Wang XB, Nikitczuk JS, Anderson TR, Bloss EB, Radice GL, Zhou Q, Benson DL, Huntley GW (2010) Persistence of coordinated long-term potentiation and dendritic spine enlargement at mature hippocampal CA1 synapses requires N-cadherin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:9984-9989.
- Bravo JA, Diaz-Veliz G, Mora S, Ulloa JL, Berthoud VM, Morales P, Arancibia S, Fiedler JL (2009) Desipramine prevents stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal markers of neuroprotection. *Behavioural pharmacology* 20:273-285.
- Buscà R, Pouysségur J, Lenormand P (2016) ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4.

- Calabrese B, Wilson MS, Halpain S (2006) Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology* 21:38-47.
- Castaneda P, Munoz M, Garcia-Rojo G, Ulloa JL, Bravo JA, Marquez R, Garcia-Perez MA, Arancibia D, Araneda K, Rojas PS, Mondaca-Ruff D, Diaz-Veliz G, Mora S, Aliaga E, Fiedler JL (2015) Association of N-cadherin levels and downstream effectors of Rho GTPases with dendritic spine loss induced by chronic stress in rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research* 93:1476-1491.
- Castren E (2004) Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr Opin Pharmacol* 4:58-64.
- Castren E, Rantamaki T (2010) The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Developmental neurobiology* 70:289-297.
- Cipriani A, La Ferla T, Furukawa TA, Signoretti A, Nakagawa A, Churchill R, McGuire H, Barbui C (2010) Sertraline versus other antidepressive agents for depression. *Cochrane Database Syst Rev* CD006117.
- Cline HT (2001) Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Current opinion in neurobiology* 11:118-126.
- Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA (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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:3262-3268.
- Cook SC, Wellman CL (2004) Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Journal of neurobiology* 60:236-248.
- Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, Bhattacharjee A, Kaminski N, Benos PV (2009) Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS one* 4:e5279.
- Croci T, Landi M, Bianchetti A, Manara L (1995) Drug-induced defaecation in rats: role of central 5-HT_{1A} receptors. *British journal of pharmacology* 115:203-209.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I (2005) Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29:547-569.
- Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM (1987) Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236:799-806.
- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E (2001) Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:12796-12801.
- Chen AC, Shirayama Y, Shin KH, Neve RL, Duman RS (2001a) Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect. *Biological psychiatry* 49:753-762.
- Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (2001b) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological psychiatry* 50:260-265.
- Chen F, du Jardin KG, Waller JA, Sanchez C, Nyengaard JR, Wegener G (2016) Vortioxetine promotes early changes in dendritic morphology compared to fluoxetine in rat

- hippocampus. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 26:234-245.
- Chen F, Madsen TM, Wegener G, Nyengaard JR (2009) Repeated electroconvulsive seizures increase the total number of synapses in adult male rat hippocampus. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 19:329-338.
- Chen F, Madsen TM, Wegener G, Nyengaard JR (2010) Imipramine treatment increases the number of hippocampal synapses and neurons in a genetic animal model of depression. *Hippocampus* 20:1376-1384.
- Chen Y, Kramar EA, Chen LY, Babayan AH, Andres AL, Gall CM, Lynch G, Baram TZ (2013) Impairment of synaptic plasticity by the stress mediator CRH involves selective destruction of thin dendritic spines via RhoA signaling. *Molecular psychiatry* 18:485-496.
- Choi J, Ko J, Racz B, Burette A, Lee JR, Kim S, Na M, Lee HW, Kim K, Weinberg RJ, Kim E (2005) Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:869-879.
- Chourbaji S, Hellweg R, Brandis D, Zorner B, Zacher C, Lang UE, Henn FA, Hortnagl H, Gass P (2004) Mice with reduced brain-derived neurotrophic factor expression show decreased choline acetyltransferase activity, but regular brain monoamine levels and unaltered emotional behavior. *Brain research Molecular brain research* 121:28-36.
- Chuang HH, Yang CH, Tsay YG, Hsu CY, Tseng LM, Chang ZF, Lee HH (2012) ROCKII Ser1366 phosphorylation reflects the activation status. *The Biochemical journal* 443:145-151.
- D'Sa C, Duman RS (2002) Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar disorders* 4:183-194.
- Dale E, Pehrson AL, Jeyarajah T, Li Y, Leiser SC, Smagin G, Olsen CK, Sanchez C (2016) Effects of serotonin in the hippocampus: how SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. *CNS spectrums* 21:143-161.
- Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *The EMBO journal* 17:4426-4441.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 121:66-72.
- DeVane CL (1999) Metabolism and pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Cellular and molecular neurobiology* 19:443-466.
- Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL (1997) Adaptation to prolonged or repeated stress-- comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology* 65:360-368.
- Di Benedetto B, Radecke J, Schmidt MV, Rupprecht R (2013) Acute antidepressant treatment differentially modulates ERK/MAPK activation in neurons and astrocytes of the adult mouse prefrontal cortex. *Neuroscience* 232:161-168.
- Dityatev A, Dityateva G, Schachner M (2000) Synaptic strength as a function of post- versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron* 26:207-217.
- Duman CH (2010) Models of Depression. 82:1-21.
- Duman CH, Duman RS (2015) Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. *Neuroscience letters* 601:20-29.
- Duman RS (2004) Depression: a case of neuronal life and death? *Biological psychiatry* 56:140-145.

- Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C (2000) Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biological psychiatry* 48:732-739.
- Eilam-Stock T, Serrano P, Frankfurt M, Luine V (2012) Bisphenol-A impairs memory and reduces dendritic spine density in adult male rats. *Behavioral neuroscience* 126:175-185.
- Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, Manji HK, Chen G (2003) The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:7311-7316.
- Errico M, Crozier RA, Plummer MR, Cowen DS (2001) 5-HT(7) receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 102:361-367.
- Ethell IM, Pasquale EB (2005) Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Progress in neurobiology* 75:161-205.
- Fava M, Kendler KS (2000) Major depressive disorder. *Neuron* 28:335-341.
- Ferguson JM (2001) SSRI Antidepressant Medications: Adverse Effects and Tolerability. *Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry* 3:22-27.
- Finkbeiner S (2000) CREB Couples Neurotrophin Signals to Survival Messages. *Neuron* 25:11-14.
- Fiore R, Khudayberdiev S, Christensen M, Siegel G, Flavell SW, Kim TK, Greenberg ME, Schrott G (2009) Mef2-mediated transcription of the miR379–410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *The EMBO journal* 28:697-710.
- Frazer A (1997) Pharmacology of antidepressants. *Journal of clinical psychopharmacology* 17 Suppl 1:2s-18s.
- Gao J, Wang WY, Mao YW, Graff J, Guan JS, Pan L, Mak G, Kim D, Su SC, Tsai LH (2010) A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 466:1105-1109.
- Garcia-Rojo G, Fresno C, Vilches N, Diaz-Veliz G, Mora S, Aguayo F, Pacheco A, Parra-Fiedler N, Parra CS, Rojas PS, Tejos M, Aliaga E, Fiedler JL (2017) The ROCK Inhibitor Fasudil Prevents Chronic Restraint Stress-Induced Depressive-Like Behaviors and Dendritic Spine Loss in Rat Hippocampus. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*.
- Gardier AM, Malagie I, Trillat AC, Jacquot C, Artigas F (1996) Role of 5-HT1A autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundamental & clinical pharmacology* 10:16-27.
- Gershon M (2003) Plasticity in serotonin control mechanisms in the gut. *Current Opinion in Pharmacology* 3:600-607.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & development* 19:1-49.
- Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE (2005) Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav Brain Res* 156:105-114.
- Groves JO (2007) Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Molecular psychiatry* 12:1079-1088.
- Guan L, Jia N, Zhao X, Zhang X, Tang G, Yang L, Sun H, Wang D, Su Q, Song Q, Cai D, Cai Q, Li H, Zhu Z (2013) The involvement of ERK/CREB/Bcl-2 in depression-like behavior in prenatally stressed offspring rats. *Brain Res Bull* 99:1-8.

- Hajszan T, Dow A, Warner-Schmidt JL, Szigeti-Buck K, Sallam NL, Parducz A, Leranath C, Duman RS (2009) Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. *Biological psychiatry* 65:392-400.
- Hajszan T, MacLusky NJ, Leranath C (2005) Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 21:1299-1303.
- Hasegawa S, Hasegawa Y, Miura M (2016) Current Therapeutic Drugs Against Cerebral Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage: A Comprehensive Review of Basic and Clinical Studies. *Current drug delivery*.
- Heinrichs SC, Cole BJ, Pich EM, Menzaghi F, Koob GF, Hauger RL (1992) Endogenous corticotropin-releasing factor modulates feeding induced by neuro peptide Y or a tail-pinch stressor. *Peptides* 13:879-884.
- Hirano S, Takeichi M (2012) Cadherins in brain morphogenesis and wiring. *Physiol Rev* 92:597-634.
- Huang P, Li C, Fu T, Zhao D, Yi Z, Lu Q, Guo L, Xu X (2015) Flupirtine attenuates chronic restraint stress-induced cognitive deficits and hippocampal apoptosis in male mice. *Behav Brain Res* 288:1-10.
- Huntley GW, Gil O, Bozdagi O (2002) The cadherin family of cell adhesion molecules: multiple roles in synaptic plasticity. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 8:221-233.
- Hyllin MJ, Orsi SA, Moore AN, Dash PK (2013) Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* 20:267-273.
- Imaki T, Shibasaki T, Chikada N, Harada S, Naruse M, Demura H (1996) Different expression of immediate-early genes in the rat paraventricular nucleus induced by stress: relation to corticotropin-releasing factor gene transcription. *Endocrine journal* 43:629-638.
- Impey S, Davare M, Lesiak A, Lasiek A, Fortin D, Ando H, Varlamova O, Obrietan K, Soderling TR, Goodman RH, Wayman GA (2010) An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Molecular and cellular neurosciences* 43:146-156.
- Inan SY, Soner BC, Sahin AS (2015) Infralimbic cortex Rho-kinase inhibition causes antidepressant-like activity in rats. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 57:36-43.
- Jeong JY, Lee DH, Kang SS (2013) Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinology and metabolism* 28:288-296.
- Jiang L, Liu X, Kolokythas A, Yu J, Wang A, Heidbreder CE, Shi F, Zhou X (2010) Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma. *International journal of cancer* 127:505-512.
- Johnson SA, Fournier NM, Kalynchuk LE (2006) Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behav Brain Res* 168:280-288.
- Jorgensen OS (1995) Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodeling. *Neurochemical research* 20:533-547.
- Kang J, Park H, Kim E (2016) IRSp53/BAIAP2 in dendritic spine development, NMDA receptor regulation, and psychiatric disorders. *Neuropharmacology* 100:27-39.

- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H (2003) Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in neurosciences* 26:360-368.
- Kaufman J, Plotsky PM, Nemeroff CB, Charney DS (2000) Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biological psychiatry* 48:778-790.
- Kim J, Cho IS, Hong JS, Choi YK, Kim H, Lee YS (2008) Identification and characterization of new microRNAs from pig. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 19:570-580.
- Konopka W, Kiryk A, Novak M, Herwerth M, Parkitna JR, Wawrzyniak M, Kowarsch A, Michaluk P, Dzwonek J, Arnsperger T, Wilczynski G, Merckenschlager M, Theis FJ, Köhr G, Kaczmarek L, Schütz G (2010) MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:14835-14842.
- Kosten TA, Galloway MP, Duman RS, Russell DS, D'Sa C (2008) Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33:1545-1558.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894-902.
- Kubik S, Miyashita T, Guzowski JF (2007) Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* 14:758-770.
- Kurt M, Arik AC, Celik S (2000) The effects of sertraline and fluoxetine on anxiety in the elevated plus-maze test in mice. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology* 11:173-180.
- Lai KO, Ip NY (2013) Structural plasticity of dendritic spines: the underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders. *Biochimica et biophysica acta* 1832:2257-2263.
- Launay JM, Mouillet-Richard S, Baudry A, Pietri M, Kellermann O (2011) Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16. *Translational psychiatry* 1:e56.
- Le Poul E, Laaris N, Doucet E, Laporte AM, Hamon M, Lanfumey L (1995) Early desensitization of somato-dendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 352:141-148.
- Leonard BE (1995) SSRI differentiation: Pharmacology and pharmacokinetics. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 10:S149-S158.
- Leuner B, Falduo J, Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:659-665.
- Levy AD, Omar MH, Koleske AJ (2014) Extracellular matrix control of dendritic spine and synapse structure and plasticity in adulthood. *Frontiers in Neuroanatomy* 8.
- Li N, Liu RJ, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (2011) Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biological psychiatry* 69:754-761.
- Licznerski P, Duman RS (2013) Remodeling of axo-spinous synapses in the pathophysiology and treatment of depression. *Neuroscience* 251:33-50.
- Lippman J, Dunaevsky A (2005) Dendritic spine morphogenesis and plasticity. *Journal of neurobiology* 64:47-57.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron* 35:605-623.
- Lu Z, Xu S (2006) ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB life* 58:621-631.

- Lucassen PJ, Muller MB, Holsboer F, Bauer J, Holtrop A, Wouda J, Hoogendijk WJ, De Kloet ER, Swaab DF (2001) Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *The American journal of pathology* 158:453-468.
- Lucki I (1997) The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behavioural pharmacology* 8:523-532.
- Lugli G, Larson J, Martone ME, Jones Y, Smalheiser NR (2005) Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *Journal of neurochemistry* 94:896-905.
- Luo L (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annual review of cell and developmental biology* 18:601-635.
- MacQueen GM, Ramakrishnan K, Croll SD, Siuciak JA, Yu G, Young LT, Fahnstock M (2001) Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression. *Behavioral neuroscience* 115:1145-1153.
- Magarinos AM, McEwen BS (1995) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience* 69:83-88.
- Magariños AM, Deslandes A, McEwen BS (1999) Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol* 371:113-122.
- Magariños AM, McEwen BS (1995) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 69:89-98.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:9104-9110.
- Malt UF, Robak OH, Madsbu HP, Bakke O, Loeb M (1999) The Norwegian naturalistic treatment study of depression in general practice (NORDEP)-I: randomised double blind study. *BMJ (Clinical research ed)* 318:1180-1184.
- Marin MT, Cruz FC, Planeta CS (2007) Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav* 90:29-35.
- Martin KC, Zukin RS (2006) RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:7131-7134.
- Martinez-Tellez RI, Hernandez-Torres E, Gamboa C, Flores G (2009) Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring. *Synapse* 63:794-804.
- Martino A, Ettore M, Musilli M, Lorenzetto E, Buffelli M, Diana G (2013) Rho GTPase-dependent plasticity of dendritic spines in the adult brain. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:62.
- McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873-904.
- Meerson A, Cacheaux L, Goosens KA, Sapolsky RM, Soreq H, Kaufer D (2010) Changes in brain MicroRNAs contribute to cholinergic stress reactions. *Journal of molecular neuroscience : MN* 40:47-55.
- Meziane H, Khelifaoui M, Morello N, Hiba B, Calcagno E, Reibel-Foisset S, Selloum M, Chelly J, Humeau Y, Riet F, Zanni G, Herault Y, Bienvenu T, Giustetto M, Billuart P (2016) Fasudil

- treatment in adult reverses behavioural changes and brain ventricular enlargement in Oligophrenin-1 mouse model of intellectual disability. *Human molecular genetics* 25:2314-2323.
- Michan S, Li Y, Chou MM, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W, Mervis RF, Chen J, Guerin KI, Smith LE, McBurney MW, Sinclair DA, Baudry M, de Cabo R, Longo VD (2010) SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:9695-9707.
- Ministerio de Salud (2011) Informe Encuesta Nacional de Salud, ENS 2009-2011. Santiago, Chile.
- Ministerio de Salud (2013) Guía Clínica Depresión en personas de 15 años y más. Santiago, Chile.
- Mitchell PJ, Redfern PH (2005) Animal models of depressive illness: the importance of chronic drug treatment. *Current pharmaceutical design* 11:171-203.
- Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S (2005) Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:9371-9376.
- Miyata K, Ito H, Fukudo S (1998) Involvement of the 5-HT₃ receptor in CRH-induced defecation in rats. *The American journal of physiology* 274:G827-831.
- Molendijk ML, de Kloet ER (2015) Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology* 62:389-391.
- Monti B, Berteotti C, Contestabile A (2006) Subchronic rolipram delivery activates hippocampal CREB and arc, enhances retention and slows down extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31:278-286.
- Montminy M (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annual review of biochemistry* 66:807-822.
- Moore RY, Halaris AE (1975) Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat. *The Journal of comparative neurology* 164:171-183.
- Mora S, Díaz-Véliz G (1993) Intracerebral administration of neuropeptides: an assessment of behavioral change. In: *Paradigms for the study of behavior Methods in neurosciences*, vol. 14, pp 180-193 M. Conn. San Diego, CA: Academic Press.
- Moser MB, Moser EI (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608-619.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine reviews* 5:25-44.
- Murray F, Hutson PH (2007) Hippocampal Bcl-2 expression is selectively increased following chronic but not acute treatment with antidepressants, 5-HT_{1A} or 5-HT_{2C/2B} receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 569:41-47.
- Nagumo H, Sasaki Y, Ono Y, Okamoto H, Seto M, Takuwa Y (2000) Rho kinase inhibitor HA-1077 prevents Rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology* 278:C57-65.
- Nakade Y, Fukuda H, Iwa M, Tsukamoto K, Yanagi H, Yamamura T, Mantyh C, Pappas TN, Takahashi T (2007) Restraint stress stimulates colonic motility via central corticotropin-releasing factor and peripheral 5-HT₃ receptors in conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1037-1044.
- Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ, Duman RS (2002) Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response

- element-binding protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:3673-3682.
- Nakayama AY, Luo L (2000) Intracellular signaling pathways that regulate dendritic spine morphogenesis. *Hippocampus* 10:582-586.
- Narducci F, Snape WJ, Jr., Battle WM, London RL, Cohen S (1985) Increased colonic motility during exposure to a stressful situation. *Digestive diseases and sciences* 30:40-44.
- Neal KB, Bornstein JC (2006) Serotonergic receptors in therapeutic approaches to gastrointestinal disorders. *Curr Opin Pharmacol* 6:547-552.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- Nestler EJ, Hyman SE (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience* 13:1161-1169.
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS (1996) Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:2365-2372.
- Noorafshan A, Abdollahifar M-A, Karbalay-Doust S, Asadi-Golshan R, Rashidian-Rashidabadi A (2015) Sertraline and curcumin prevent stress-induced morphological changes of dendrites and neurons in the medial prefrontal cortex of rats. *Folia Neuropathologica* 1:69-79.
- Norrholm SD, Ouimet CC (2001) Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment. *Synapse* 42:151-163.
- Novak A, Dedhar S (1999) Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci* 56:523-537.
- O'Connor RM, Grenham S, Dinan TG, Cryan JF (2013) microRNAs as novel antidepressant targets: converging effects of ketamine and electroconvulsive shock therapy in the rat hippocampus. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 16:1885-1892.
- Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, Martinez J (2006) Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *Rna* 12:1161-1167.
- Okabe T, Nakamura T, Nishimura YN, Kohu K, Ohwada S, Morishita Y, Akiyama T (2003) RICS, a novel GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1, is involved in the beta-catenin-N-cadherin and N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 278:9920-9927.
- Okuda T, Yu LM, Cingolani LA, Kemler R, Goda Y (2007) beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:13479-13484.
- Overstreet DH (2012) Modeling depression in animal models. *Methods Mol Biol* 829:125-144.
- Overstreet DH, Keeney A, Hogg S (2004) Antidepressant effects of citalopram and CRF receptor antagonist CP-154,526 in a rat model of depression. *Eur J Pharmacol* 492:195-201.
- Paxinos G CW (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates*: Academic press.
- Pelizzari M TD, Mallei A (2012) Analysis of miRNome expression profiles in hippocampus of rats treated with antidepressants. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 22:S101-102
- Peng Q, Masuda N, Jiang M, Li Q, Zhao M, Ross CA, Duan W (2008) The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increases BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model. *Experimental neurology* 210:154-163.

- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience* 14:285-293.
- Pinto V, Costa JC, Morgado P, Mota C, Miranda A, Bravo FV, Oliveira TG, Cerqueira JJ, Sousa N (2015) Differential impact of chronic stress along the hippocampal dorsal-ventral axis. *Brain structure & function* 220:1205-1212.
- Pittenger C, Duman RS (2008) Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33:88-109.
- Qi X, Lin W, Li J, Li H, Wang W, Wang D, Sun M (2008) Fluoxetine increases the activity of the ERK-CREB signal system and alleviates the depressive-like behavior in rats exposed to chronic forced swim stress. *Neurobiology of disease* 31:278-285.
- Qiao H, An SC, Ren W, Ma XM (2014) Progressive alterations of hippocampal CA3-CA1 synapses in an animal model of depression. *Behav Brain Res* 275:191-200.
- Qiao H, Li MX, Xu C, Chen HB, An SC, Ma XM (2016) Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural plasticity* 2016:8056370.
- Remenyi J, Hunter CJ, Cole C, Ando H, Impey S, Monk CE, Martin KJ, Barton GJ, Hutvagner G, Arthur JSC (2010) Regulation of the miR-212/132 locus by MSK1 and CREB in response to neurotrophins. *The Biochemical journal* 428:281-291.
- Richards D (2011) Prevalence and clinical course of depression: a review. *Clinical psychology review* 31:1117-1125.
- Rojas PS, Fritsch R, Rojas RA, Jara P, Fiedler JL (2011) Serum brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoid receptor levels in lymphocytes as markers of antidepressant response in major depressive patients: a pilot study. *Psychiatry research* 189:239-245.
- Rubio FJ, Ampuero E, Sandoval R, Toledo J, Pancetti F, Wyneken U (2013) Long-term fluoxetine treatment induces input-specific LTP and LTD impairment and structural plasticity in the CA1 hippocampal subfield. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:66.
- Sahay A, Hen R (2007) Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature neuroscience* 10:1110-1115.
- Sairanen M, O'Leary OF, Knuutila JE, Castren E (2007) Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience* 144:368-374.
- Sandi C (2004) Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nature reviews Neuroscience* 5:917-930.
- Sapolsky RM (2001) Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:12320-12322.
- Satoh S, Utsunomiya T, Tsurui K, Kobayashi T, Ikegaki I, Sasaki Y, Asano T (2001) Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life sciences* 69:1441-1453.
- Schaaf MJ, Duurland R, de Kloet ER, Vreugdenhil E (2000) Circadian variation in BDNF mRNA expression in the rat hippocampus. *Brain research Molecular brain research* 75:342-344.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439:283-289.
- Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC (2003) Untreated depression and hippocampal volume loss. *The American journal of psychiatry* 160:1516-1518.

- Shibuya M, Hirai S, Seto M, Satoh S, Ohtomo E (2005) Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *Journal of the neurological sciences* 238:31-39.
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:3251-3261.
- Shruti K, Shrey K, Vibha R (2011) Micro RNAs: tiny sequences with enormous potential. *Biochemical and biophysical research communications* 407:445-449.
- Shyu AB, Belasco JG, Greenberg ME (1991) Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes & development* 5:221-231.
- Siegel G, Obernosterer G, Fiore R, Oehmen M, Bicker S, Christensen M, Khudayberdiev S, Leuschner PF, Busch CJL, Kane C, Hübel K, Dekker F, Hedberg C, Rengarajan B, Drepper C, Waldmann H, Kauppinen S, Greenberg ME, Draguhn A, Rehmsmeier M, Martinez J, Schratz GM (2009) A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nature cell biology* 11:705-716.
- Siegel G, Saba R, Schratz G (2011) microRNAs in neurons: manifold regulatory roles at the synapse. *Current opinion in genetics & development* 21:491-497.
- Simansky KJ, Vaidya AH (1990) Behavioral mechanisms for the anorectic action of the serotonin (5-HT) uptake inhibitor sertraline in rats: comparison with directly acting 5-HT agonists. *Brain Res Bull* 25:953-960.
- Slattery DA, Cryan JF (2012) Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature protocols* 7:1009-1014.
- Slattery DA, Hudson AL, Nutt DJ (2004) Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. *Fundamental & clinical pharmacology* 18:1-21.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (1995) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:1768-1777.
- Song Y, Chen X, Wang LY, Gao W, Zhu MJ (2013) Rho kinase inhibitor fasudil protects against beta-amyloid-induced hippocampal neurodegeneration in rats. *CNS neuroscience & therapeutics* 19:603-610.
- Sossin WS, Lacaille JC (2010) Mechanisms of translational regulation in synaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology* 20:450-456.
- Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Uylings HB, Friedman L, Rajkowska G (2004) Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biological psychiatry* 56:640-650.
- Swanger SA, Mattheyses AL, Gentry EG, Herskowitz JH (2015) ROCK1 and ROCK2 inhibition alters dendritic spine morphology in hippocampal neurons. *Cellular logistics* 5:e1133266.
- Tache Y, Million M (2015) Role of Corticotropin-releasing Factor Signaling in Stress-related Alterations of Colonic Motility and Hyperalgesia. *Journal of neurogastroenterology and motility* 21:8-24.
- Tafet GE, Bernardini R (2003) Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 27:893-903.

- Takahashi M, Terwilliger R, Lane C, Mezes PS, Conti M, Duman RS (1999) Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP-specific phosphodiesterase 4A and 4B isoforms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:610-618.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208.
- Tamashiro KL, Nguyen MM, Ostrander MM, Gardner SR, Ma LY, Woods SC, Sakai RR (2007) Social stress and recovery: implications for body weight and body composition. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 293:R1864-1874.
- Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S (2004) Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Frontiers in neuroendocrinology* 25:77-107.
- Tardito D, Mallei A, Popoli M (2013) Lost in translation. New unexplored avenues for neuropsychopharmacology: epigenetics and microRNAs. *Expert opinion on investigational drugs* 22:217-233.
- Tatro ET, Risbrough V, Soontornniyomkij B, Young J, Shumaker-Armstrong S, Jeste DV, Achim CL (2013) Short-term recognition memory correlates with regional CNS expression of microRNA-138 in mice. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 21:461-473.
- Tiraboschi E, Tardito D, Kasahara J, Moraschi S, Pruner P, Gennarelli M, Racagni G, Popoli M (2004) Selective phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaM kinase IV and MAP kinase cascades. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29:1831-1840.
- Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M (2002) Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 35:77-89.
- Tonegawa S, McHugh TJ (2008) The ins and outs of hippocampal circuits. *Neuron* 57:175-177.
- Touma C, Palme R, Sachser N (2004) Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and behavior* 45:10-22.
- Touyarot K, Sandi C (2002) Chronic restraint stress induces an isoform-specific regulation on the neural cell adhesion molecule in the hippocampus. *Neural plasticity* 9:147-159.
- Troca-Marín JA, Alves-Sampaio A, Tejedor FJ, Montesinos ML (2010) Local translation of dendritic RhoA revealed by an improved synaptoneurosomes preparation. *Molecular and cellular neurosciences* 43:308-314.
- Tzingounis AV, Nicoll RA (2006) Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron* 52:403-407.
- Ulloa JL, Castaneda P, Berrios C, Diaz-Veliz G, Mora S, Bravo JA, Araneda K, Menares C, Morales P, Fiedler JL (2010) Comparison of the antidepressant sertraline on differential depression-like behaviors elicited by restraint stress and repeated corticosterone administration. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 97:213-221.
- Varea E, Guirado R, Gilabert-Juan J, Martí U, Castillo-Gomez E, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Nacher J (2012) Expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the amygdala of psychiatric disorder patients. *Journal of psychiatric research* 46:189-197.
- Venero C, Tilling T, Hermans-Borgmeyer I, Schmidt R, Schachner M, Sandi C (2002) Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the cell adhesion molecules NCAM and L1. *Neuroscience* 115:1211-1219.

- Vilches N (2011) La inhibición farmacológica de ROCK previene los cambios conductuales y morfológicos promovidos por el estrés crónico en un modelo animal. Memoria de título para optar al título de Químico Farmacéutico Universidad de Chile.
- Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, Impey S (2005) A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:16426-16431.
- Waldinger MD, Olivier B (1998) Selective serotonin reuptake inhibitor-induced sexual dysfunction: clinical and research considerations. *International clinical psychopharmacology* 13 Suppl 6:S27-33.
- Wang G, Cheng Y, Gong M, Liang B, Zhang M, Chen Y, Zhang C, Yuan X, Xu J (2013) Systematic correlation between spine plasticity and the anxiety/depression-like phenotype induced by corticosterone in mice. *Neuroreport* 24:682-687.
- Wilson BE, Mochon E, Boxer LM (1996) Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Molecular and cellular biology* 16:5546-5556.
- Willner P (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 134:319-329.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Jr., Schwartz MW (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280:1378-1383.
- Wu J, Li J, Hu H, Liu P, Fang Y, Wu D (2012) Rho-kinase inhibitor, fasudil, prevents neuronal apoptosis via the Akt activation and PTEN inactivation in the ischemic penumbra of rat brain. *Cellular and molecular neurobiology* 32:1187-1197.
- Wu J, Xie X (2006) Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome biology* 7:R85.
- Xu H, Steven Richardson J, Li XM (2003) Dose-related effects of chronic antidepressants on neuroprotective proteins BDNF, Bcl-2 and Cu/Zn-SOD in rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28:53-62.
- Yang C, Shirayama Y, Zhang JC, Ren Q, Yao W, Ma M, Dong C, Hashimoto K (2015) R-ketamine: a rapid-onset and sustained antidepressant without psychotomimetic side effects. *Translational psychiatry* 5:e632.
- Yin L, Morishige K, Takahashi T, Hashimoto K, Ogata S, Tsutsumi S, Takata K, Ohta T, Kawagoe J, Takahashi K, Kurachi H (2007) Fasudil inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 6:1517-1525.
- Ying H, Biroc SL, Li WW, Alicke B, Xuan JA, Pagila R, Ohashi Y, Okada T, Kamata Y, Dinter H (2006) The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Molecular cancer therapeutics* 5:2158-2164.
- Yoshikawa T, Wu J, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Shibata C, Takata A, Han F, Kang YJ, Chen CY, Shyu AB, Han J, Koike K (2015) ROCK inhibition enhances microRNA function by promoting deadenylation of targeted mRNAs via increasing PAIP2 expression. *Nucleic acids research* 43:7577-7589.
- Yoshimi E, Kumakura F, Hatori C, Hamachi E, Iwashita A, Ishii N, Terasawa T, Shimizu Y, Takeshita N (2010) Antinociceptive effects of AS1892802, a novel Rho kinase inhibitor, in rat models of inflammatory and noninflammatory arthritis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 334:955-963.

- Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47-59.
- Yu J-Y, Chung K-H, Deo M, Thompson RC, Turner DL (2008) MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Experimental cell research* 314:2618-2633.
- Zhang Y, Raap DK, Garcia F, Serres F, Ma Q, Battaglia G, Van de Kar LD (2000) Long-term fluoxetine produces behavioral anxiolytic effects without inhibiting neuroendocrine responses to conditioned stress in rats. *Brain research* 855:58-66.
- Ziv NE (2010) Hebb and the art of spine remodeling. *F1000 biology reports* 2:69.