



Universidad de  
**los Andes**

**Título**

**“Efectos de Fluoxetina sobre las sinapsis excitadoras telencefálicas  
y sobre modelos de depresión inducida por estrés”.**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al  
Grado Académico de Doctor en Farmacología.**

**Por:**

**Estíbaliz Mariela Ampuero Llanos**

**Directora de Tesis**

**Inge Ursula Wyneken Hempel**

**2012**

**Lugar de Desarrollo de Tesis:**

**Laboratorio de Neurociencias**

**Facultad de Medicina**

**Universidad de Los Andes**

## **Capítulo 1**

---

### **Generalidades**

### **Financiamiento**

#### **Becas o Premios:**

1.- Beca Conicyt para estudios de Doctorado 2007-2010

Beca Conicyt para asistencia a congreso "I Latinamerican Congress of Neuroscience" Buzios, Brazil, 2008

2.- Beca MBF para asistencia a "Course in Confocal Microscopy and Stereology". MBF Bioscience. Agosto 2010, Chicago, EEUU

3.- Beca de Chilean Chapter Society for Neuroscience. para asistencia a la reunión anual de la Society for Neuroscience. Noviembre, San Diego, EEUU, 2010

#### **Financiamiento por Proyectos:**

Conicyt: Proyecto Anillo "Centro para el estudio del estrés y antidepresivos: desde mecanismos celulares a la clínica". ACT09-2006. 2006-2010.

Universidad de los Andes: "Función de la corteza retrosplenial (RSC) en la regulación de síntomas depresivos (ansiedad y desesperanza aprendida) y en la efectividad terapéutica del tratamiento crónico con fluoxetina ". FAI MED 001-009. 2009-2010.

## **Presentaciones a Congresos**

### **Nacionales:**

Rubio F.J., Ampuero E., Sandoval R., Toledo J, Stehberg J., Pancetti F., Wyneken U. Long-term fluoxetine treatment induces dendritic spine growth in CA1 hippocampal pyramidal neurons, but impairs LTP, LTD and consolidation of memory in rats. Sociedad Chilena de Neurociencias VII Reunión Anual Santa Cruz, 27-29 Sept. 2011.

Toledo J., Santibáñez M., Ampuero E., Wyneken U. Activation of cerebrocortical regions in two rat models of stress-induced depression that respond differentially to antidepressant drugs. VII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Neurociencia. Santa Cruz, 27-29 Sept. 2011.

Ampuero E., Santibáñez, M., Rubio, J., Diaz-Veliz G., Forray M. and Wyneken U. Involvement of different brain areas in two repetitive stress models in adult rats. VI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Neurociencia. Valdivia, 29 Sept -1 Oct. 2010.

Ampuero E., Rubio FJ. Earle N. and Wyneken U. El tratamiento crónico fluoxetina induce plasticidad estructural en áreas corticales límbicas. Fluoxetine-induce structural plasticity in limbic cortices. V Reunión Sociedad Chilena de Neurociencia. Coquimbo 23-25 Sept, 2009.

Ampuero E., Toledo J., Diaz-Velliz G., Forray, M.I. and Wyneken U. Fluoxetine and Reboxetine differentially reverts depressive-like behavior in two stress models in the rat. XXXI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Concepción, 22 - 25 Oct, 2009.

**Internacionales:**

Ampuero E., Rubio F.J., Diaz-Veliz G., Santibañez M., Forray, M.I, Wyneken U. Fluoxetine and reboxetine differentially revert depressive-like behavior in two stress models in the rat. 40th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, USA. 13-17 Nov, 2010.

Ampuero E. Rubio F.J., Sandoval M., Dagnino-Subiabre A. and Wyneken U. Long-term fluoxetine administration induces structural plasticity of excitatory cortical synapses associated to a selective enrichment of glutamate receptor subunits. 39th Annual Meeting Society for Neuroscience, Chicago, USA. 17-21 Oct, 2009.

Ampuero E., Diaz-Velliz G., Fiedler J. y Wyneken U. Fluoxetina revierte diferencialmente las conductas de desesperanza aprendida y ansiedad inducidas por dos modelos de estrés crónico en ratas. Ier Congreso Ibro/Larc De Neurociencias de América Latina, Caribe y Península Ibérica. Buzios, Brasil. 1-4 Sept, 2008.

Falcon R., Ampuero E., Smalla, K.H., Sandoval, M., Earle, N., Orrego, F., y Wyneken U. Chronic Fluoxetine induces a reorganization of central glutamatergic synapses. Ier Congreso Ibro/Larc De Neurociencias de América Latina, Caribe y Península Ibérica. Buzios, Brasil. 1-4 Sept, 2008.

## **Publicaciones**

### **Manuscritos publicados:**

Ampuero E., Rubio FJ., Falcon R., Sandoval M., Diaz-Veliz G., Gonzalez RE, Earle N., Dagnino-Subiabre A., Aboitiz F, Orrego F, Wyneken U. (2010). Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex. *Neuroscience*. 11; 169(1): 98-108.

### **Manuscritos enviados a publicación:**

1.- Rubio F.J., Ampuero E.\*, Sandoval R., Toledo J., Pancetti F. y Wyneken U. Maturation of dendritic spines in the CA1 hippocampal subfield promoted by chronic fluoxetine treatment is accompanied by impaired LTP and LTD. Enviado *Neuroscience*, Agosto 2012.

2.- Ampuero E., Diaz-Veliz G., Wyneken U. y Rubio F.J. Long-term fluoxetine treatment induces detrimental effects on long-term memory in rats. Enviado *Neuroscience*, Agosto 2012.

### **Manuscritos en redacción**

Ampuero E., Santibañez M, Diaz-Véliz G, Toledo J, Gomez, Rubio, J., Fuenzalida, Y., Cavada, G. and Wyneken U. "Aldolase C: a differential biomarker for antidepressant drug responsiveness in restraint and immobilization stress".

## **Agradecimientos**

Agradecer a todas las personas que contribuyeron al desarrollo de esta tesis doctoral es una tarea no menor, debo decir que después de varios años hay muchas personas a las que les debo mas que una simple palabra “gracias”.

Es en este momento, al final, en donde la memoria siempre frágil nos entrega aquellos recuerdos que marcan la diferencia en el día a día y que hacen que frente a la adversidad uno saque fuerzas para seguir en esto. Es por esto que agradecer a mi Gran Familia es un acto de magnificencia, ellos son y serán el pilar de mi vida.

Gracias a mis Padres y hermanos. En especial a mi Padres, es justo que ellos sean una de las primeras personas a las que debo agradecer todo su eterno compromiso con mi desarrollo profesional. Siempre me han ayudado, escuchado e incentivado en todo lo que hago.

Gracias a Mi Marido quién además de darme una hermosa familia, me entrega cariño y comprensión ilimitada. El es y será siempre la mayor felicidad de mi vida.

Gracias a mis hijos, Catalina, Matías y Laura por el cariño, una sonrisa de ellos al final de un día de trabajo es motivo suficiente como para hacerme inmensamente feliz.

Gracias a mi Tutora, la Dra Ursula Wyneken quién con mucha sabiduría ha sabido inculcar en mi el gusto por el trabajo bien hecho, la dedicación, etc. Ella es un gran ejemplo para mi, siempre interesada en las nuevas ideas, llana a compartir su experiencia y conocimientos con sus pupilos.

Gracias a la Dra. Gabriel Diaz-Veliz de la Universidad de Chile por abrirme las puertas de su laboratorio y por compartir conmigo su experiencia. Ella fue muy importante durante esta tesis, especialmente para los experimentos conductuales.

Gracias al Dr. Gabriel Cavada de la Universidad de los Andes, por todos su apoyo en el análisis estadístico.

Gracias a mis amigos del laboratorio, los viejos y los nuevos y los de siempre. Soledad, Javier, Mauricio, Marcos, Rodrigos, Ariel, Alejandro, Cristóbal, Verónica y Bárbara. Todos ellos hacen de este trabajo un espacio de enriquecimiento personal muy fructífero. En especial gracias a Soledad y Javier por su apoyo y preocupación, juntos hacen que este laboratorio sea una gran familia.

Por sobre todo, le doy gracias a Dios por permitirme aportar humildemente un poco de conocimiento a la neurociencia.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. P. O.' or similar, located at the bottom center of the page.

## Índice de contenidos

<b>Título .....</b>	<b>1</b>
<b>“Efectos de Fluoxetina sobre las sinapsis excitadoras telencefálicas y sobre modelos de depresión inducida por estrés” .....</b>	<b>1</b>
<b><u>Capítulo 1</u> .....</b>	<b>2</b>
<b>Generalidades .....</b>	<b>2</b>
<b>Financiamiento .....</b>	<b>2</b>
BECAS O PREMIOS:.....	2
FINANCIAMIENTO POR PROYECTOS: .....	2
<b>Presentaciones a Congresos.....</b>	<b>3</b>
NACIONALES: .....	3
INTERNACIONALES: .....	4
<b>Publicaciones.....</b>	<b>5</b>
MANUSCRITOS PUBLICADOS:.....	5
MANUSCRITOS ENVIADOS A PUBLICACIÓN: .....	5
MANUSCRITOS EN REDACCIÓN.....	5
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>6</b>
<b>Índice de contenidos.....</b>	<b>8</b>
<b><u>Capítulo 2</u> .....</b>	<b>21</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>21</b>
GENERALIDADES DE LA DEPRESIÓN.....	21
SINAPSIS GLUTAMATÉRGICAS. ....	23
SINAPSIS GLUTAMATÉRGICA Y DEPRESIÓN. ....	25
ESTRUCTURAS CEREBRALES ALTERADAS EN DEPRESIÓN.....	26
MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA DEPRESIÓN.....	29
USO DE FLUOXETINA EN OTRAS PATOLOGÍAS. ....	32
<b><u>Capítulo 3</u> .....</b>	<b>33</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>33</b>
<b>Objetivo General.....</b>	<b>33</b>
<b>Objetivos Específicos. ....</b>	<b>33</b>
<b><u>Capítulo 4</u>.....</b>	<b>36</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>36</b>

ANIMALES Y FÁRMACOS.....	36
MODELOS DE ESTRÉS REPETIDO.....	37
PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE ESTRÉS Y TRATAMIENTO ANTIDEPRESIVO.....	38
PRUEBAS CONDUCTUALES.....	39
1.-PRUEBAS CONDUCTUALES PARA MEDIR ANSIEDAD.....	39
A) PRUEBA INHIBICIÓN A LA INGESTA DE ALIMENTOS INDUCIDA POR NOVEDAD. ....	39
B) PRUEBA DEL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO. ....	40
2.- PRUEBAS CONDUCTUALES PARA MEDIR DESESPERANZA APRENDIDA. ....	40
A) PRUEBA DE SUSPENSIÓN DE LA COLA. ....	41
B) PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.....	41
3.- PRUEBA DE ACTIVIDAD MOTORA. ....	42
4.- PRUEBA DE LABERINTO DE MORRIS.....	43
5.- PRUEBA DE CONDICIONAMIENTO PASIVO. ....	43
6.- PRUEBA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO NOVEDOSO.....	45
PROTOCOLO DE FIJACIÓN (PARA INMUNOHISTOQUÍMICA Y TINCIÓN DE GOLGI).....	47
PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	47
TINCIÓN DE GOLGI.....	49
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	50
TINCIÓN DE COBALTO. ....	51
ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	52
A) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS PRUEBAS CONDUCTUALES QUE MIDEN ANSIEDAD Y DESESPERANZA APRENDIDA. ....	52
B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS PRUEBAS DE ACTIVIDAD MOTORA ESPONTÁNEA.....	53
C) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRUEBA DEL LABERINTO DE MORRIS. ....	53
D) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRUEBA DE CONDICIONAMIENTO PASIVO. ....	53
E) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRUEBA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO NOVEDOSO. ....	54
F) ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS EXPERIMENTOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA, TINCIÓN DE COBALTO Y DE TINCIÓN DE GOLGI.....	54
<b>Capítulo 5:</b> .....	<b>55</b>
<b>Resultados Experimentales</b> .....	<b>55</b>
1. ESTABLECER UN MODELO CONDUCTUAL DE DEPRESIÓN INDUCIDA POR ESTRÉS REPETIDO EN RATAS Y DETERMINAR LA DOSIS EFECTIVA PARA REVERTIR LOS SÍNTOMAS DEPRESIVOS POR FLX Y RBX.....	55
1.1. EVALUAR PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y CONDUCTUALES EN DOS MODELOS DE ESTRÉS REPETIDO EN QUE SE APLICA RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO O INMOVILIZACIÓN. ....	55

1.1.1. EFECTO DE 10 DÍAS ESTRÉS REPETIDO SOBRE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS.....	55
1.1.2. EFECTO DE 10 DÍAS DE ESTRÉS REPETIDO SOBRE PARÁMETROS CONDUCTUALES.....	56
1.2. EVALUAR EL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE FLX O RBX SOBRE LAS CONDUCTAS DEPRESIVAS INDUCIDAS POR ESTRÉS REPETIDO.....	59
1.3. DETERMINAR LA DOSIS EFECTIVA PARA CADA UNO DE LOS FADs UTILIZADOS.....	62
2.- DETERMINAR CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE NEURONAS PIRAMIDALES INDUCIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN PROLONGADA DE FLX.....	64
2.1.- CAMBIOS EN EL ÁRBOL DENDRÍTICO.....	64
2.2.- CAMBIOS EN LA DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS.....	68
3.-DETERMINAR SI LA ADMINISTRACIÓN PROLONGADA DE FLX REGULA LOS NIVELES DE SUBUNIDADES DEL R-NMDA (GLUN1, GLUN2A Y GLUN2B) Y DEL R-AMPA (GLUA1 Y GLUA2). ....	76
3.1.- CAMBIOS EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL RNMDA Y DEL R-AMPA..	76
3.2.- CAMBIOS FUNCIONALES DE LAS SUBUNIDADES DEL R-AMPA.....	78
4.- DETERMINAR SI LA ADMINISTRACIÓN PROLONGADA DE FLX INDUCE ALTERACIONES EN PROCESOS DE MEMORIA/APRENDIZAJE.....	81
4.1.- PRUEBA WATER MORRIS.....	81
4.2.- PRUEBA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO NOVEDOSO.....	82
4.3.- PRUEBA DE EVITACIÓN PASIVA.....	86
<b>Capítulo 6</b> .....	<b>87</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>87</b>
1.-MODELOS ANIMALES DE DEPRESIÓN.....	87
2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE FLUOXETINA Y REBOXETINA SOBRE LAS CONDUCTAS DEPRESIVAS.....	89
2.1.-EFECTO EN ANIMALES NAÏVE.....	89
2.2.- EFECTO DE FADs EN MODELOS ANIMALES DE ESTRÉS.....	90
2.3.- FLUOXETINA Y REBOXETINA REVIERTEN DIFERENCIALMENTE LOS SÍNTOMAS DEPRESIVOS INDUCIDOS POR RESTRICCIÓN E INMOVILIZACIÓN, RESPECTIVAMENTE.....	91
2.4.- IMPLICANCIAS DE LA REVERSIÓN DIFERENCIAL DE LOS FADs Y SU RELACIÓN CON LOS SUBTIPOS DE DEPRESIÓN.....	94
3.- FLUOXETINA INDUCE PLASTICIDAD ESTRUCTURAL EN LAS SINAPSIS GLUTAMATÉRGICAS TELENCEFÁLICAS.....	96
4.- FLX PRODUCE UN DETERIORO EN LA MEMORIA REMOTA.....	101
<b>Conclusiones</b> .....	<b>106</b>
<b>Capítulo 7</b> .....	<b>107</b>

<b>Apéndices</b> .....	<b>107</b>
APÉNDICE I: EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE C-FOS EN RESTRICCIÓN E INMOVILIZACIÓN:.....	107
APÉNDICE II: SUBUNIDADES R-AMPA EN HIPOCAMPO.....	109
APÉNDICE III: ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	110
ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	110
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRUEBA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO. ....	112
<b>Capítulo 8</b> .....	<b>114</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>114</b>

## **Listado de Figuras y Tabla**

- Figura 1. Esquema de los circuitos neuronales que participarían en depresión.
- Figura 2. Estructura química de los FADs .
- Figura 3. Esquema Diseño experimental General.
- Figura 4. Imágenes de los aparatos de estrés utilizados.
- Figura 5. Diseño experimental de la Prueba de Condicionamiento Pasivo.
- Figura 6. Diseño experimental de la Prueba de Reconocimiento Objeto.
- Figura 7. Determinación de parámetros fisiológicos después de 10 días de estrés repetido.
- Figura 8. El Análisis de Componentes Principales revela que 10 días de estrés repetido induce conductas depresivas.
- Figura 9. Efecto de 10 días de estrés repetido sobre parámetros conductuales en ratas naïve
- Figura 10. La administración prolongada de fármacos antidepresivos modula la ansiedad y desesperanza aprendida.
- Figura 11. Bajas dosis de fluoxetina y reboxetina son efectivas en revertir las conductas depresivas inducidas por restricción e inmovilización, respectivamente.
- Figura 12. Fluoxetina disminuye el largo dendrítico en neuronas piramidales de la capa V de la corteza RSGb y PrL.
- Figura 13. Fluoxetina disminuye el largo dendrítico en neuronas piramidales de la capa II-III de las cortezas PrL y M2.
- Figura 14. El número de ramificaciones en neuronas piramidales de distintas áreas corticales cambia después de tratamiento con fluoxetina.
- Figura 15. Fluoxetina aumenta la densidad de espinas en dendritas primarias y secundarias de neuronas piramidales de distintas áreas corticales.
- Figura 16. Microfotografía de un segmento de una dendrita apical de una neurona piramidal de la corteza.
- Figura 17. Fluoxetina aumenta el porcentaje de espinas dendríticas maduras/grandes.
- Figura 18. Fluoxetina disminuye la densidad de espinas y el porcentaje de espinas maduras en la corteza PrL II-III.

Figura 19. Microfotografía representativa de una neurona piramidal de área CA1 del hipocampo.

Figura 20. Fluoxetina aumenta la densidad y el porcentaje de espinas dendríticas maduras/grandes en dendritas de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.

Figura 21. Fluoxetina modula la expresión de las subunidades del R-NMDA y del R-AMPA en la corteza cerebral.

Figura 22. Fluoxetina aumenta la presencia de R-AMPA conteniendo la subunidad GluA2.

Figura 23. Fluoxetina induce un déficit en la memoria espacial remota.

Figura 24. Efecto de fluoxetina sobre la memoria de reconocimiento de objetos.

Figura 25. Fluoxetina disminuye el tiempo de exploración del objeto novedoso. Razón de discriminación.

Figura 26. Fluoxetina disminuye el tiempo de exploración del objeto novedoso. Curva de Kaplan-Meir.

Figura 27. Fluoxetina no modifica la latencia al escape en la prueba de evitación pasiva.

Figura 28. Modelo del efecto de la administración prolongada de fluoxetina sobre las sinapsis glutamatérgicas telencefálicas.

Figura 29. Estrés aumenta diferencialmente el número de células inmunopositivas para c-Fos en distintas áreas telencefálicas en restricción e inmovilización.

Figura 30. Fluoxetina aumenta la expresión de la subunidad GluA2 del R-AMPA en el área CA1 del hipocampo.

Tabla 1. Resumen del análisis estadístico a los residuos obtenidos en el análisis de componentes principales, efecto del protocolo de estrés

## Abreviaturas

ANOVA	: Análisis de la Varianza
BDNF	: Factor neurotrópico derivado de cerebro (por Brain Derived Neurotrophic Factor)
BSA	: Albúmina Sérica de Bovino
CA1	: Área Cuerno de Amón 1 del hipocampo
CA3	: Área Cuerno de Amón 3 del hipocampo
CNQX	: 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-diona
E.E.	: Error Estándar de la Media
Ent	: Entrenamiento
EPM	: Prueba del Laberinto en cruz elevado (por Elevated Plus Maze)
FADs	: Fármacos antidepresivos
flx	: fluoxetina
FST	: Prueba de Natación Forzado (por Forced Swim Test)
GD	: Giro Dentado
Hab	: Habituaación
i.p.	: Inyección intraperitoneal
Inmov	: Inmovilización
M2	: Motora Secundaria
n.s.	: No significativo
NSF	: Prueba de Supresión de la ingesta de alimento por exposición a ambiente novedoso (por Novelty Supressed Feeding)
PBS	: Tampón Fosfato Salino
PrL	: Prelímbica
QA	: Ácido Quiscuálico
R-AMPA	:Receptor para glutamato tipo a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropianato
R-NMDA	: Receptor para glutamato tipo N-Metil D-Aspartato

rbx : reboxetina  
Rest : Restricción de movimiento  
RSGb : Retroesplénica Granular b  
sal : salino  
stratum : capa  
TST : Prueba de Suspensión por la cola (por Tail Suspension Test)

## Resumen

En la depresión mayor, la remisión de los síntomas depresivos mediante el uso de fármacos antidepresivos (FADs) requiere de la administración prolongada de éstos. El retardo necesario para observar el efecto terapéutico sugiere que necesariamente deben inducirse procesos neuroadaptativos de curso temporal lento. Diversos antecedentes muestran que en pacientes deprimidos y en modelos animales de esta enfermedad, que se basan en la exposición repetitiva a estrés, se alteran las neuronas y sinapsis glutamatérgicas. Estos cambios deberían ser revertidos por FADs como fluoxetina (flx), un inhibidor específico de la recaptación de serotonina, o reboxetina (rbx), un inhibidor específico de la recaptación de noradrenalina. Por ello, la hipótesis de esta tesis fue que *“La administración prolongada de FADs en ratas sometidas a estrés repetido revierte los síntomas depresivos e induce cambios morfológicos y moleculares en neuronas y sinapsis glutamatérgicas del telencéfalo”*. Para evaluar esta hipótesis, se indujo estrés por reducción de movimiento empleando dos protocolos semejantes, la restricción en pequeñas cajas o la inmovilización en bolsas durante dos horas diarias por 10 días. En ambos casos, se observaron conductas tipo depresivas. Luego, se administró durante 4 semanas dos diferentes dosis de flx o rbx, continuando el protocolo de estrés durante este período. Las conductas depresivas evaluadas fueron ansiedad y desesperanza aprendida. A pesar de que ambos protocolos de estrés indujeron un aumento de los síntomas, éstos fueron revertidos diferencialmente: flx revierte preferencialmente los síntomas depresivos inducidos por restricción, mientras rbx revierte los síntomas depresivos inducidos por inmovilización. Interesantemente, este efecto se observó sólo a las concentraciones menores utilizadas de

ambos fármacos. Adicionalmente, se observó que la administración de flx a ratas naïve indujo una disminución de la desesperanza. Para estudiar los cambios plásticos inducidos por flx que podrían dar cuenta de este efecto antidepresivo, estudiamos las sinapsis glutamatérgicas en ratas naïve tratadas con flx 0,7 mg/kg por 4 semanas. Se evaluó mediante tinción de Golgi la morfología de las dendritas, la densidad y la forma de las espinas dendríticas, y mediante inmunohistoquímica el número de células positivas para las subunidades de receptores glutamatérgicos: GluA1 y GluA2 del R-AMPA y GluN1, GluN2A y GluN2B del R-NMDA en las siguientes áreas telencefálicas: la corteza retrosplenial (RSGb), corteza Prelímbica (PrL) y la corteza motora secundaria (M2) y el hipocampo. Flx indujo retracción del árbol dendrítico y aumento de la densidad y del porcentaje de espinas más grandes. Una de las áreas más afectadas por flx fue la corteza retrosplenial, un área cortical implicada en memoria espacial. A través de las mediciones de permeabilidad al calcio a través del R-AMPA en el hipocampo observamos que flx aumentó la presencia de R-AMPA impermeables al catión, constituidos por la subunidad GluA2. Estos hallazgos reflejan que flx favorece la presencia de contactos sinápticos más maduros que deberían limitar la plasticidad de los circuitos corticales afectados.

Para evaluar las consecuencias funcionales de los cambios plásticos en las sinapsis glutamatérgicas inducidos por flx, realizamos pruebas de memoria dependiente del hipocampo (Prueba del Laberinto de Morris) y parcialmente dependiente de esta estructura (Prueba de Reconocimiento de Objetos). En ambas pruebas, flx indujo un deterioro significativo en la consolidación de la memoria, no así en la adquisición. Sin

embargo, no se encontró alteración en memorias que dependen de otras estructuras, como la amígdala.

Los resultados mostrados en esta tesis nos permiten concluir que los mecanismos neurobiológicos que se inducen por diferentes modelos de estrés repetido son particulares y por lo tanto, son diferencialmente sensibles a FADs que pertenecen a diferentes familias de fármacos. Esto sugiere que pacientes con sub-tipos de depresión podrían responder diferencialmente a FADs serotoninérgicos o noradrenérgicos. Por otra parte, en ratas naïve tratadas con flx, los circuitos glutamatérgicos presentan signos de mayor madurez y menor plasticidad frente a un estímulo posterior. Esta menor plasticidad se acompaña por un deterioro en la consolidación o almacenamiento de la memoria. Esta tesis significa un avance importante para el conocimiento de sub-tipos de depresión, los efectos de la administración prolongada de flx sobre sinapsis glutamatérgicas y sus posibles efectos negativos sobre la memoria en sujetos sanos. Estos estudios permitirán plantear, en el futuro, el uso de biomarcadores para el diagnóstico objetivo de subtipos de depresión e intervenciones terapéuticas para su tratamiento.

## **Summary**

The remission of depressive symptoms in major depression needs long-term antidepressant drugs (ADDs) administration. The delay required to obtain the therapeutic effect suggests that neuroadaptive processes, occurring with a slow time course, are necessary. Several reports show that in depressed patients and animal models of the disease, based on repeated exposure to stress, glutamatergic neurons and synapses are modified. These changes should be reverted by ADDs such as fluoxetine (flx), a specific serotonin re-uptake inhibitor, or reboxetine (rbx), a specific noradrenaline re-uptake inhibitor. Therefore, the hypothesis of the present thesis work is: Long-term administration of ADDs (flx or rbx) to rats subjected to repetitive stress revert depressive symptoms and morphological and molecular changes in glutamatergic neurons of forebrain areas. To test this hypothesis, stress was induced by restraint stress in wire mesh cages or by immobilization in plastic bags for 10 days to observe depressive symptoms. Then, flx or rbx were administered at two different doses daily for 28 days during which the stress protocol was continued. Depressive-like symptoms such as learned helplessness and anxiety were assessed by behavioral tests. Both stress models induced depressive symptoms such as increased anxiety and learned helplessness, which were differentially reversed: flx preferentially reversed depressive symptoms induced by restriction, while rbx reversed depressive symptoms induced by immobilization. To study plastic changes induced at glutamatergic synapses, naïve rats were treated with 0.7 mg/kg of flx for 28 days. The

dendritic length, spine density and morphology were studied by the Golgi silver staining method whereas levels of AMPA-R subunits (GluA1 and GluA2) and NMDA-R subunits (GluN1, GluN2A and GluN2B) were assessed by immunohistochemistry in the following forebrain areas: Prelimbic cortex (PrL), Retrosplenial cortex (RSGb) and Secondary Motor cortex (M2) and in the hippocampus. Flx induced dendritic retraction and increases in dendritic spine density and in large spines. The most affected area was RSGb, a cortical area involved in spatial memory. Through the measurements of calcium permeability through AMPA-Rs in hippocampal slices, we observed that flx increased the levels of GluA2-lacking AMPA-R. These findings indicate that flx induced a maturation or potentiation of synaptic contacts that should limit the plasticity of the affected cortical circuits.

To evaluate plasticity, we performed tests of hippocampal memory (Morris Water Maze) as well as of partially hippocampus-dependent memory (novel object recognition test). In both, flx induced a significant impairment in memory consolidation, but not in acquisition. Our findings show that the neurobiological mechanisms that are induced by repeated stress models are unique to the used stress protocol and interestingly, they are differentially sensitive to ADDs belonging to different drug families. This suggests that sub-types of depression in human subjects should respond preferentially to serotonergic or noradrenergic ADDs. Moreover, naïve glutamatergic synapses are characterized by more mature and less plastic synaptic contacts. Their putative lower plasticity is associated with impairment in memory consolidation or storage. This thesis represents a significant advance in understanding of sub-types of depression and the deleterious effects of long-term flx treatment in healthy subjects. Moreover, the molecular adaptations at

glutamatergic synapses described in this work allow the proposal of new therapeutic strategies for the treatment of depression.

## **Capítulo 2**

---

### **Introducción**

#### **Generalidades de la depresión.**

La depresión mayor es un trastorno del ánimo que se caracteriza por un descenso prolongado del ánimo y anhedonia (Nestler y cols., 2002; Egan y cols., 2003; Tanti y Belzung, 2010); y Guía para el manejo de la depresión de la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM-IV-TR: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* IV Edition, 2000). Estos síntomas pueden estar acompañados por otros como ansiedad, irritabilidad, exagerados sentimientos de culpa, desesperanza y/o abandono, o déficit cognitivos. También pueden presentarse síntomas neurovegetativos, como alteraciones del apetito, del sueño y disminución de la energía. Según la guía chilena para el manejo de la depresión, la manifestación de al menos 5 de estos síntomas por más de 2 semanas conlleva a un diagnóstico de depresión (Vicente y cols., 2002).

El principal tratamiento de la depresión consiste en la utilización de fármacos antidepresivos (FADs). Los FADs aumentan de manera aguda la neurotransmisión monoaminérgica: noradrenérgica y/o serotoninérgica en el sistema nervioso central mediante el bloqueo del transportador presináptico para estos neurotransmisores, o bien disminuyendo su degradación enzimática. Los inhibidores de la recaptación para

monoaminas actualmente en uso bloquean selectivamente la recaptación de serotonina (por ejemplo: fluoxetina (flx)) o la recaptación de noradrenalina (por ejemplo: reboxetina (rbx)). También existen los inhibidores duales, que actúan tanto sobre el transporte de serotonina como de noradrenalina. Otra familia de FADs, son los inhibidores de la enzima Monoamino Oxidasa responsable de la degradación de las monoaminas (Baldessarini, 1996). En base al mecanismo de acción agudo de estos fármacos nace la teoría monoaminérgica de la depresión, que postula que la depresión mayor se produce por un déficit en la neurotransmisión monoaminérgica. Sin embargo, esta hipótesis simple presenta inconsistencias como las siguientes: 1) todos los FADs deben ser usados por semanas para lograr la remisión de los síntomas depresivos, a pesar de elevar la disponibilidad de monoaminas en el sistema nervioso pocas horas después de la primera administración, 2) algunos FADs utilizados en la actualidad no aumentan los niveles de las monoaminas, 3) existe un alto porcentaje de pacientes que no responde al tratamiento farmacológico disponible (30%) o que responde sólo parcialmente a ellos (Berton y Nestler, 2006; Nemeroff, 2007). De este modo, la remisión completa se logra sólo en el 30 - 40% de los pacientes.

Como alternativa que explicaría el retardo que requieren los FADs para lograr el efecto terapéutico, se postuló la teoría neurotrófica, que postula que la mejoría clínica se debe a cambios plásticos cerebrales inducidos por factores tróficos. En esta teoría adquirió especial relevancia la neurotrofina BDNF (por Brain-Derived Neurotrophin Factor), que está disminuida en el hipocampo de modelos animales de depresión y es capaz de inducir efectos antidepresivos (Siuciak y cols., 1998; Castren y cols., 2007). Estudios de nuestro laboratorio y la literatura muestran que la administración repetida de flx induce un

aumento en los niveles y actividad de la neurotrofina BDNF o su receptor TrkB (Saarelainen y cols., 2003; Wyneken y cols., 2006; Castren y cols., 2007). Posteriormente, se ha establecido que factores tróficos adicionales tales como: IGF-1, FGF y VEGF, también tienen efectos antidepresivos (Schmidt y cols., 2008). Estos factores revertirían las alteraciones morfológicas y sinápticas que afectan las sinapsis glutamatérgicas, como ha sido descrito en pacientes y modelos animales de depresión (Schmidt y cols., 2008). Por lo tanto, uno de los blancos del tratamiento antidepresivo, sean éstos FADs o la terapia electroconvulsiva, son las sinapsis glutamatérgicas (Machado-Vieira y cols., 2009; Sanacora y cols., 2012).

### **Sinapsis glutamatérgicas.**

Las sinapsis glutamatérgicas participan en la fisiopatología de la depresión y del estrés crónico y son uno de los blancos del mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos. Las neuronas piramidales de la corteza cerebral o del hipocampo son glutamatérgicas y a su vez reciben aferencias glutamatérgicas en su árbol dendrítico. El compartimiento post-sináptico de éstas contienen las espinas dendríticas, que decoran sus dendritas. Así, las sinapsis ocurren entre terminaciones presinápticas y espinas dendríticas. Estas proyecciones dendríticas son de morfología variable. Así, una espina nace como filopodio, y en su proceso de maduración o en el establecimiento de un contacto sináptico cambia desde una forma delgada o botón a una forma tipo callampa o ramificada. Estas últimas son las más maduras y funcionalmente más estables. En el aprendizaje de una tarea o en modelos celulares de aprendizaje como la potenciación de larga duración (LTP) se inducen cambios morfológicos en las espinas, las que cambian desde morfologías más

inmaduras e inestables (delgada o botón) hacia morfologías más estables (callampa o ramificada) (Sheng y Hoogenraad, 2007; Hoogenraad y Akhmanova, 2010). Las espinas dendríticas contienen la densidad postsináptica y citoesqueleto, principalmente de actina (Alvarez y Sabatini, 2007). El L-glutamato interactúa con receptores ionotrópicos y metabotrópicos anclados a la densidad postsináptica (Hering y Sheng, 2001; Madden, 2002). Los receptores ionotrópicos se clasifican, de acuerdo a su selectividad por diferentes agonistas en: tipo N-Metil-D-Aspartato (R-NMDA), tipo kainato y tipo  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropanato (R-AMPA). El R-NMDA es un canal iónico permeable a calcio que se organiza como un heterotetrámero compuesto por 2 subunidades GluN1 y 2 subunidades GluN2. Las subunidades GluN2 pueden provenir de 4 genes diferentes (A, B, C y D) (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004). En cambio, el R-AMPA es un canal iónico que puede ser tanto hetero- como homotetrámero compuesto por las subunidades GluA 1, 2, 3 y/o 4. En este receptor, la subunidad GluA2 determina la permeabilidad a calcio del canal, por lo que el R-AMPA conteniendo la subunidad GluA2 es impermeable a este catión permitiendo sólo el flujo de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . En el telencéfalo de un animal adulto, las subunidades más abundantes son GluA1 y GluA2/3, por lo que R-AMPA con la configuración GluA1/GluA2 son impermeables a calcio, y de esta manera el influjo dependiente de actividad de este catión está determinado por la presencia en la sinapsis del R-NMDA. Adicionalmente, la composición de subunidades de los receptores glutamatérgicos determina no sólo sus características biofísicas, sino también su interacción con proteínas sinápticas y por tanto, la transducción de la señal. Más aún, la presencia de estas en la sinapsis también determina las características morfológicas de la neurona, la complejidad y largo de arborización dendrítica y la morfología de la espina dendrítica. Así, la presencia de R-NMDA con la

subunidad GluN2B se asocia a neuronas con procesos más largos y complejos (Sepulveda y cols., 2010) y mientras espinas más grandes se asocian con mayor respuesta a glutamato y a espinas menos dinámicas (Kasai y cols., 2003; Kopec y Malinow, 2006). A su vez, espinas grandes contienen predominantemente subunidades GluN2A en sus R-NMDA (Alvarez y Sabatini, 2007; Kobayashi y cols., 2007) y subunidades GluA2 en sus R-AMPA (Saglietti y cols., 2007; Chen y cols., 2008; Medvedev y cols., 2008; Chen y cols., 2009). Estos cambios en las subunidades se asocian a otros cambios moleculares como la presencia de proteínas andamio específicamente asociadas a cada subunidad. Así, los R-NMDA que contiene GluN2B unen preferentemente a SAP102, mientras los R-NMDA que contienen GluN2A unen preferentemente a PSD95 (van Zundert y cols., 2004).

### **Sinapsis glutamatérgica y depresión.**

Diversos antecedentes muestran una alteración en la neurotransmisión glutamatérgica en depresión y/o estrés. Un aumento en el contenido de glutamato ha sido observado en sujetos sanos con antecedentes familiares de depresión (Taylor y cols., 2011), en estudios post-mortem de cerebros de pacientes con depresión y en modelos animales de la enfermedad (Hashimoto y cols., 2007). Una consecuencia de los cambios moleculares que ocurren en las sinapsis glutamatérgicas son la atrofia dendrítica y la disminución del volumen de ciertas estructuras cerebrales que se observa tanto en pacientes deprimidos (Arango y cols., 1997; Cotter y cols., 2001; Drevets, 2003; Sheline, 2003; Frodl y cols., 2006) como en modelos animales de la enfermedad (Magarinos y cols., 1996; Vyas y cols., 2002; Silva-Gomez y cols., 2003; Cook y Wellman, 2004; Brown y cols., 2005; Donohue y cols.,

2006; Liston y cols., 2006; Cerqueira y cols., 2007; McLaughlin y cols., 2007). Además, al analizar la densidad y morfología de las espinas, se han descrito claras alteraciones en modelos de estrés repetido (Pittenger y Duman, 2008; Musazzi y cols., 2011). Es más, en un modelo de depresión por administración de corticoides sintéticos disminuye la densidad de espinas dendríticas en la corteza prefrontal (Cerqueira y cols., 2007). La disminución de densidad de espinas es revertida por la administración de fármacos antidepresivos como amitriptilina (Norrholm y Ouimet, 2001) o desipramina (Hajszan y cols., 2009).

Diversos antecedentes muestran que una gran cantidad de estructuras cerebrales se afectan en depresión. La gran mayoría de ellas se conectan mediante proyecciones glutamatérgicas. Por ello, estudiar cómo se organizan estas sinapsis y entender los cambios que ocurren en modelos animales de esta patología es fundamental en el estudio de la depresión y del mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos.

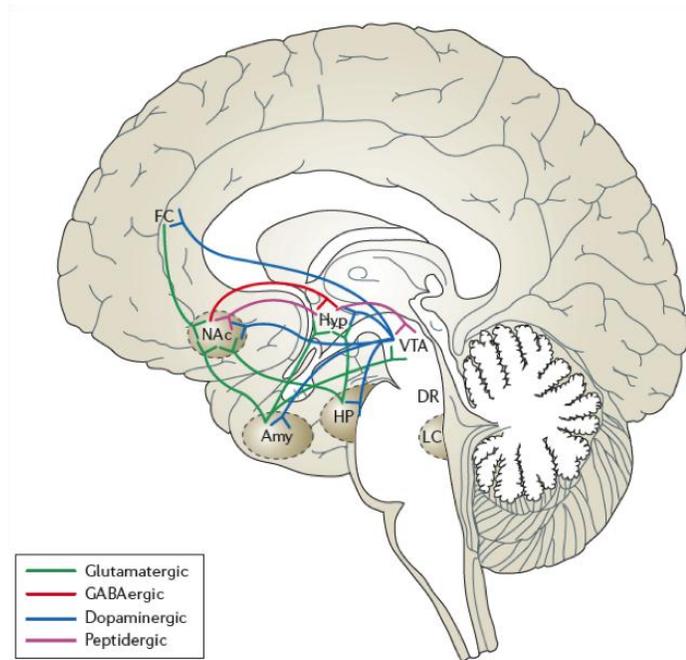
### **Estructuras cerebrales alteradas en depresión.**

La visión clásica de las estructuras cerebrales implicadas en depresión tiene relación con los síntomas de la patología (**Figura 1**). Entre ellas se encuentra la amígdala, el hipotálamo y núcleo accumbens, además de estructuras telencefálicas como la corteza prefrontal, la corteza cingulada y el hipocampo.

La participación de otras zonas telencefálicas ha sido menos estudiada. La neocorteza cerebral se organiza en capas o láminas morfológicas que contienen distintos tipos neuronales y se conectan diferencialmente con otras áreas corticales o con el tálamo. . Así, desde la superficie pial hasta el cuerpo calloso en la parte más profunda, la corteza

cerebral contiene las capas I, II-III, IV, V y VI. Así por ejemplo, la capa IV contiene neuronas granulares y aferencias talámicas, mientras la capa V contiene neuronas piramidales de gran tamaño que proyectan hacia estructuras sub-corticales, principalmente. El hipocampo es una estructura telencefálica que se localiza en el lóbulo temporal de ambos hemisferios cerebrales, y que participa en procesos de memoria y aprendizaje. Éste se organiza en áreas: las áreas CA por cuerno de Amón, llamada así por la forma de cuerno de carnero (y que a su vez se subdivide en CA1, CA2, CA3 y CA4-5), el giro dentado (GD) y el subículo. En cada una de las áreas CA se pueden distinguir diferentes estratos: el *stratum oriens* que contiene las dendritas basales de las neuronas piramidales, el *stratum pyramidale* con los somas de las neuronas piramidales, el *stratum radiatum* contiene las dendritas apicales de las neuronas piramidales y el *stratum lacunosum-moleculare*, las dendritas distales de las neuronas piramidales y fibras de proyección. El *stratum radiatum* de CA1, recibe aferencias desde las neuronas piramidales de CA3 sobre las dendritas proximales a través de las fibras colaterales de Schaeffer, mientras que las dendritas más distales reciben las aferencias desde la corteza entorhinal (Steward, 1976). La morfología neuronal y procesos como la neurogénesis han sido muy estudiadas en el hipocampo pues podrían dar cuenta de los déficit en memoria y aprendizaje observados en sujetos deprimidos (Santarelli y cols., 2003). La amígdala es una estructura subcortical que participa en el control de emociones como el miedo, por lo que alteraciones en ella podrían dar cuenta de exageradas respuestas emocionales observadas en pacientes deprimidos. Por otra parte, es probable que cambios a nivel del hipotálamo estén relacionadas con las alteraciones neurovegetativas presentes en algunos tipos de depresión (Berton y Nestler, 2006). Todas estas estructuras son moduladas por proyecciones monoaminérgicas ascendentes del tronco encefálico, como el

locus coeruleus, el núcleo del raphe, y por aferencias dopaminérgicas desde área ventral tegmental, entre otras.



**Figura 1. Esquema de los circuitos neuronales y estructuras que participarían en los síntomas de la depresión.** Se indica en colores la naturaleza neuroquímica de los distintos circuitos: glutamatérgica (verde); GABAérgica (rojo); Dopaminérgica (azul); Peptidérgica (morado). Amy: amígdala; HP: Hipocampo; DR: Rafe dorsal; NAc: núcleo accumbens; Hyp: hipotálamo; FC: corteza frontal; VTA: área ventral tegmental; LC: locus coeruleus. Esquema tomado desde (Berton y Nestler, 2006)

En las estructuras telencefálicas antes mencionadas se han descrito alteraciones anatómicas y morfológicas en pacientes deprimidos y en modelos animales de la enfermedad. Por ejemplo, existe una directa relación entre el volumen hipocampal y el número de episodios depresivos. Mientras más episodios depresivos presenta el paciente,

menor es el volumen hipocampal (Frodl y cols., 2006). La alteración morfológica más frecuentemente descrita es atrofia dendrítica, es decir, reducción del árbol dendrítico de neuronas piramidales glutamatérgicas, lo que ha sido observado en hipocampo y corteza orbitofrontal de pacientes deprimidos (Rajkowska y cols., 1999; Sheline, 2003). Efectos similares se describen en modelos animales de depresión inducida por estrés (Silva-Gomez y cols., 2003; Brown y cols., 2005; Cerqueira y cols., 2007; McLaughlin y cols., 2007). Estos cambios en la morfología dendrítica afectan negativamente el volumen de estas estructuras y son revertidos por la acción de FADs o una vez finalizado el estímulo estresante (Conrad y cols., 1999; Radley y cols., 2005).

Para el estudio de la depresión y del mecanismo de acción de los FADs se han utilizado ampliamente modelos animales de esta patología. Ellos reproducen algunos de sus síntomas esenciales, pero evidentemente presentan la limitante que no permiten el estudio del componente psicológico de la enfermedad. Obtener un buen modelo de depresión es una necesidad actualmente ya que se han descrito algunas inconsistencias en los estudios que serán abordadas más adelante.

### **Modelos animales para el estudio de la depresión.**

Uno de los grandes desafíos que enfrenta el estudio de la depresión y de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, es la dificultad para encontrar modelos animales que sean capaces de reproducir completamente los síntomas de la patología (Cryan y cols., 2002). El estrés repetido es un factor precipitante de la depresión (Kessler, 1997; Newport y Nemeroff, 2000; Berton y Nestler, 2006; Krishnan y Nestler, 2008) y es capaz de inducir

síntomas esenciales de esta patología (es decir, presenta validez de semejanza), como la anhedonia, el déficit cognitivo, la ansiedad y la desesperanza. En estos modelos de estrés repetido el tratamiento farmacológico permite revertir estos síntomas (es decir, presenta validez de predicción) (Mitchell y Redfern, 2005; Castagne y cols., 2009; Castagne y cols., 2009; Ampuero y cols., 2010). Más aún, las alteraciones neurobiológicas que se inducen después de un protocolo de estrés repetido son semejantes a las que originan o precipitan la enfermedad (es decir, presenta validez de construcción) (Drevets, 2003). Con estos antecedentes, el estrés repetido ha sido utilizado para inducir síntomas depresivos en modelos animales. En éstos, el estresor puede ser de naturaleza física (reducción de movimiento, (McLaughlin y cols., 2007)) o psicológica (la exposición a un depredador (Magarinos y cols., 1996; Czeh y cols., 2007)) o la combinación de distintos tipos de estímulos estresantes en secuencias variables y no predecibles durante los días consecutivos (estrés crónico variable moderado, (Bessa y cols., 2009)). En todos estos modelos, la aplicación repetida de un estímulo estresante conlleva a la inducción de una respuesta neurobiológica que simula muchas de las alteraciones presentes en la depresión. Uno de los estresores más utilizados es la reducción de movimiento. Distintas versiones de este método van desde la inmovilización completa en bolsas plásticas (Vyas y cols., 2002) hasta la restricción parcial de movimiento en tubos de acrílico perforado o en rejillas de alambre (McLaughlin y cols., 2007)). Las ventajas de estos modelos es su alta reproducibilidad entre distintos laboratorios y la facilidad en la obtención de los aparatos de estrés (económico y de fácil diseño). A pesar de los diversos estudios que utilizan estos procedimientos, no se sabe si son equivalentes en cuanto a su fisiopatología y respuesta a tratamientos antidepressivos. En este sentido, se han descrito algunas inconsistencias como

por ejemplo, que la liberación de corticoesterona no aumenta en el modelo de la restricción de movimientos (Bravo J., 2007), mientras que en la inmovilización sí aumenta (Vyas y cols, 2002). Nosotros utilizamos los modelos de restricción de movimientos y de inmovilización para determinar similitudes o diferencias en las conductas depresivas y en la eficacia con que los FADs actúan sobre ellos.

Las conductas tipo depresivas que se pueden evaluar en estos modelos animales son anhedonia, interacción social, ansiedad y desesperanza aprendida. La ansiedad es un estado fisiológico y psicológico caracterizado por la presencia de sentimientos de miedo y preocupación y presenta alteraciones somáticas, cognitivas y conductuales. En esta tesis, se analizó la ansiedad mediante la prueba que mide la inhibición en la ingesta de alimento por la exposición a un ambiente novedoso (NSF por Novelty Suppressed Feeding) y la prueba de laberinto en cruz elevado (EPM por Elevated Plus Maze). En ambas pruebas conductuales el animal se somete a un conflicto entre explorar o protegerse de un ambiente aversivo (espacio abierto). Así, un animal con alta ansiedad preferirá no explorar y permanecerá en zonas más protegidas. También se analizó la desesperanza aprendida mediante las pruebas de suspensión por la cola (TST por Tail Suspension Test) y de natación forzada (FST por Forced Swimming Test). La desesperanza aprendida es un concepto acuñado por Overmier y Seligman, y se refiere a un estado que se induce cuando un animal es sometido a una condición inescapable limitando la generación de conductas activas tendientes a lograr la supervivencia o el escape (Overmier y Seligman, 1967). Así, un animal al que se le indujo síntomas tipo depresivos se presentará inmóvil frente a una condición de estrés. La desesperanza aprendida hace una analogía con la pasividad ante problemas observado en personas con depresión (Porsolt y cols., 1978). La anhedonia o

incapacidad para sentir placer se implementó fuera del marco de esta tesis en nuestros modelos animales mediante la prueba de preferencia de sacarosa. En ella, se mide diariamente la preferencia del animal por consumir agua azucarada (sacarosa 1%). En un animal normal aumenta el consumo conforme van pasando los días de la prueba, mientras en una animal crónicamente estresado disminuye (Rygula y cols., 2005) y el tratamiento antidepresivo lo revierte (Monleon y cols., 1995).

### **Uso de Fluoxetina en otras patologías.**

A pesar de que la flx es uno de los fármacos más prescritos para el tratamiento de la depresión, aún no se conoce a cabalidad los efectos de este FAD sobre el cerebro. En la actualidad, la flx es utilizada además para el tratamiento de otras patologías como el trastorno bipolar, el trastorno obsesivo compulsivo, la bulimia nerviosa, los trastornos de pánico e incluso para el tratamiento profiláctico de la migraña o del alcoholismo, y por otra parte, en pacientes deprimidos es utilizada de manera preventiva incluso después de la remisión de los síntomas clínicos. Otro antecedente importante a considerar son los efectos que tendría la administración prolongada de flx en sujetos sanos. El trabajo de Serretti y cols. describe que flx induce alteraciones en el patrón de sueño y en la conducta de sujetos no deprimidos (Serretti y cols., 2010). Es por estas razones que estudiar los efectos de este antidepresivo sobre neurotransmisión glutamatérgica cobra especial relevancia ya que como se mencionó anteriormente, las sinapsis glutamatérgicas, sus receptores y sus proteínas asociadas serían uno de los blancos de acción de los fármacos antidepresivos (Pittenger y Duman, 2008). A su vez, estos efectos pueden ser examinados a nivel funcional

y conductual mediante pruebas de aprendizaje y memoria que dependen de la indemnidad de circuitos glutamatérgicos hipocampales.

### **Capítulo 3**

---

#### **Hipótesis**

*La administración prolongada de FADs (flx o rbx) en ratas sometidas a estrés repetido revierte los síntomas depresivos e induce cambios morfológicos y moleculares en neuronas glutamatérgicas del telencéfalo.*

#### **Objetivo General.**

Evaluar si la administración prolongada de flx o rbx revierte los síntomas depresivos inducidos por estrés repetido.

Evaluar si la administración prolongada de flx modula el aprendizaje y la memoria e induce cambios morfológicos y moleculares en neuronas piramidales telencefálicas.

#### **Objetivos Específicos.**

**1. Establecer un modelo conductual de depresión inducida por estrés repetido en ratas y determinar la dosis efectiva para revertir los síntomas depresivos por flx y rbx.**

*1.1.- Evaluar parámetros fisiológicos y conductuales en dos modelos de estrés repetido en que se aplica restricción de movimiento o inmovilización.*

*1.2.- Evaluar el efecto de la administración prolongada de flx o rbx sobre las conductas depresivas inducidas por ambos tipos de estrés repetido.*

*1.3.- Determinar la dosis efectiva para cada uno de los FADs utilizados.*

**2.- Determinar cambios en la morfología dendrítica de neuronas piramidales inducidos por la administración prolongada de flx.**

*2.1.- Evaluar si la administración prolongada de flx induce cambios en el árbol dendrítico de neuronas piramidales en áreas telencefálicas específicas.*

*2.2.- Evaluar si la administración prolongada de flx induce cambios en la densidad y en la morfología de las espinas dendríticas de neuronas piramidales en áreas telencefálicas específicas.*

**3.- Determinar si la administración prolongada de flx regula los niveles de subunidades del R-NMDA (GluN1, GluN2A y GluN2B) y del R-AMPA (GluA1 y GluA2).**

*3.1.- Evaluar si la administración prolongada de flx modifica los niveles de expresión de las subunidades del R-NMDA: GluN1, GluN2A y GluN2B y del R-AMPA: GluA1 y GluA2 en áreas telencefálicas específicas.*

*3.2.- Evaluar funcionalmente la expresión de las subunidades del R-AMPA.*

**4.- Determinar si la administración prolongada de flx induce alteraciones en procesos de memoria/aprendizaje.**

*4.1.- Evaluar si la administración prolongada de flx modifica la respuesta conductual en la Prueba de laberinto de Morris.*

*4.2.- Evaluar si la administración prolongada de flx modifica la respuesta conductual en la Prueba de Reconocimiento de Objeto Novedoso.*

*4.3.- Evaluar si la administración prolongada de flx modifica la respuesta conductual en la Prueba de Condicionamiento Pasivo.*

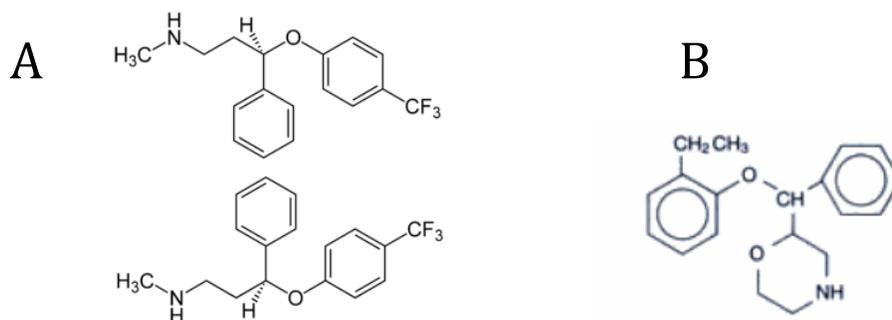
## Capítulo 4

---

### Metodología

#### Animales y Fármacos.

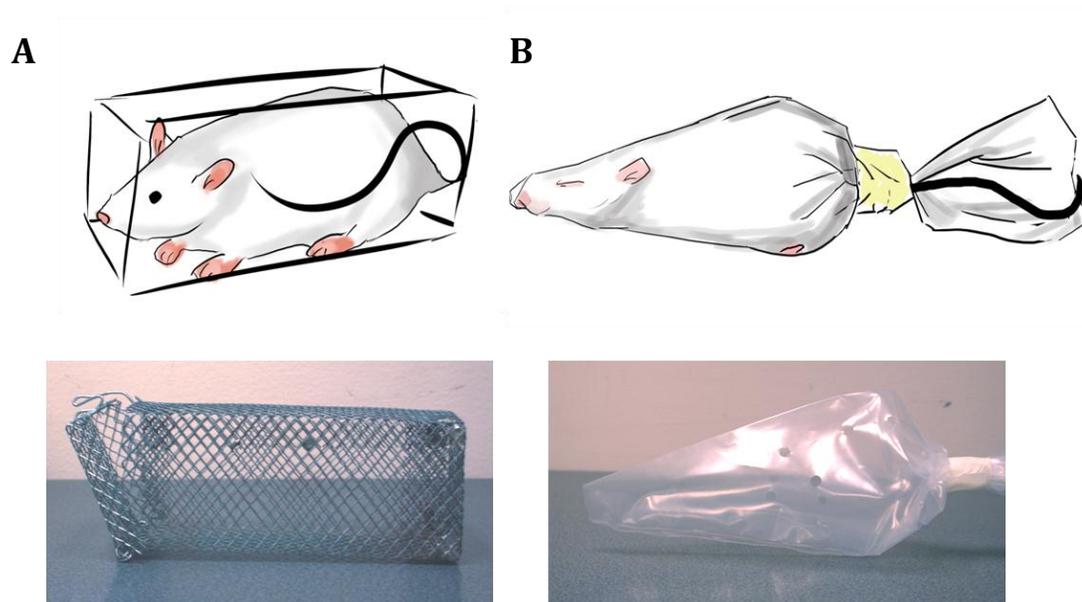
Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley con un peso aproximado de 250 g de procedencia del Vivero de la Pontificia Universidad Católica y mantenidas en el Bioterio de la Universidad de los Andes. Éstas son alojadas en grupos de 5 ratas 7 días antes del comienzo de los experimentos para habituarse al bioterio y al grupo de animales. Las ratas siempre tienen acceso libre a agua y comida excepto cuando las condiciones experimentales lo requieren. Los animales se mantienen en piezas aisladas con un ciclo luz/oscuridad 12:12 (luz 8:00 a 20:00 hrs.) y a temperatura ambiente controlada a  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ . El manejo de los animales y la administración de flx o rbx se realizaron entre las 9:00-11:00 hrs. con el fin de reducir alteraciones en el ciclo de actividad diaria de las ratas. Se administró a través de una inyección intraperitoneal (i.p.): flx (Prozac, Eli Lilly) 0,7 mg/kg o 3,5 mg/kg; rbx (Prolift, Pfizer) 0,13 mg/kg o 0,65 mg/kg o solución salina (ver **Figura 2**). Se controló el peso de las ratas diariamente.



**Figura 2. Estructura química de los FADs** A) fluoxetina y B) reboxetina.

### Modelos de estrés repetido.

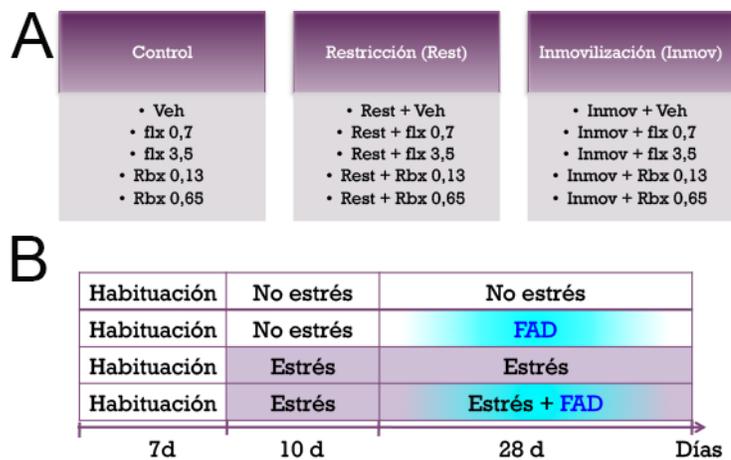
Se utilizaron 2 modelos de estrés repetido a) **Restricción de movimiento** en cajas de alambre e b) **Inmovilización en bolsas plásticas** (Ver **Figura 3**). Para el estrés por restricción las ratas fueron colocadas en cajas de las siguientes dimensiones: 18 cm de largo, 6 cm de ancho y 6 cm de alto, lo cual limita la capacidad de movimiento del animal (McLaughlin y cols., 2007). Mientras, para el estrés por inmovilización las ratas se colocan en una bolsa de plástico en forma de cono ajustada al tamaño del animal, la cual impide cualquier movimiento, y que tiene una perforación en la zona de la nariz para permitir la respiración del animal (Vyas y cols., 2002). Ambos tipos de estrés se aplican durante 2 horas diarias (9:00-11:00 hrs.). El protocolo completo de estrés tiene una duración de 38 días.



**Figura 3. Imágenes de los aparatos utilizados para inducir estrés. A) Estrés por restricción en caja de alambre y B) Estrés por inmovilización en bolsa plástica.**

**Protocolo experimental de estrés y tratamiento antidepressivo.**

Se utilizó el diseño experimental planteado en Czéh B (Czeh y cols., 2007). Antes de comenzar el protocolo, los animales son mantenidos en un período de habituación de 1 semana. El protocolo de estrés se realiza entre los días 1 y 10, después de los cuales se evalúa si se indujeron síntomas depresivos. Entre el día 11 y 38 se administran los FADs (flx y rbx) o solución salina (vehículo) según corresponda. Durante los períodos de administración de FADs, los animales son inyectados 30 min. antes de la sesión diaria de estrés (ver **Figura 4**). Se realizaron 15 grupos experimentales los que se agruparon en 3 categorías: Categoría Control: Vehículo; flx 0,7; flx 3,5; rbx 0,14; rbx 0,7. Categoría restricción de movimiento (Rest): Rest + vehículo, Rest + flx 0,7; Rest + flx 3,5; Rest + rbx 0,14; Rest + rbx 0,7. Categoría Inmovilización (Inmov): Inmov + vehículo, Inmov + flx0,7; Inmov + flx 3,5; Inmov + rbx 0,14; Inmov + rbx 0,7.



**Figura 4. Esquema Diseño experimental.** A) Grupos experimentales, categorías: Control, Restricción e Inmovilización. B) Protocolo experimental mostrando los días de duración de cada etapa.

### **Pruebas Conductuales.**

Una hora después de la última dosis de FAD se realizaron las pruebas conductuales. Éstas se realizaron en una secuencia ordenada desde menor a mayor aversión de la prueba. Según esto la secuencia de realización de las pruebas conductuales es: Prueba de la inhibición a la ingesta de alimento inducida por novedad, Prueba de la actividad motora espontánea, Prueba del laberinto en cruz elevado, Prueba de la suspensión por la cola, Prueba de la natación forzada. Otros grupos independientes de ratas fueron sometidas a: Pruebas de Laberinto de Morris, Prueba de Reconocimiento de Objeto Novedoso y Prueba de Condicionamiento Pasivo. Todas las pruebas conductuales se realizaron a la misma hora.

#### **1.-Pruebas conductuales para medir ansiedad.**

##### ***a) Prueba inhibición a la ingesta de alimentos inducida por novedad.***

En la Prueba de inhibición en la ingesta de alimento inducida por novedad (*NSF: Novelty Suppressed Feeding*), el animal se priva de alimento durante 24 hrs. El aparato de prueba consiste en una caja de acrílico de 80x70x40 cm de paredes oscuras y cubierta con viruta de madera en el piso. Se introduce en el centro de la caja un pellet de alimento sobre un papel filtro blanco (10 cm diámetro) iluminando con luz suave (iluminación de: esquinas 0,2 lux.; centro:15 lux). Se ubica el animal en una esquina de la caja y se registra la latencia o el tiempo que demora en tener una conducta activa de alimentación con un máximo de 15 minutos (Bodnoff y cols., 1988); (Dulawa y Hen, 2005). Se retira el animal una vez que

muerde el alimento. Posteriormente, se registra el consumo de alimento durante 5 min. cuando está de regreso en su propia caja de almacenamiento.

***b) Prueba del Laberinto en cruz elevado.***

En la Prueba del laberinto en cruz elevado (*EPM: Elevated Plus Maze*) el aparato consiste en una estructura en forma de cruz de acrílico negro que se ubica a 83 cm del piso. Posee 2 brazos abiertos (50x10 cm), dos brazos cerrados (50x10x40 cm) y una plataforma central (10x10 cm). El laberinto se ubica en una pieza en penumbra (1 lux). Cada rata se coloca en este laberinto inmediatamente después de realizada la prueba de actividad motora espontánea ubicándola en el centro del laberinto mirando hacia uno de los brazos abiertos. Se registra el número de entradas y el tiempo de permanencia en cada uno de los brazos durante 5 minutos. Se define una entrada cuando el animal se ubica con las 4 patas en alguno de los brazos (File y cols., 2004). El tiempo total que el animal explora el brazo abierto se considera una medida de ansiedad, ya que las ratas buscan los espacios protegidos por sobre los espacios abiertos. Más aún la administración aguda de fármacos ansiolíticos como las benzodiazepinas (diazepam) aumenta significativamente el tiempo de exploración de los brazos abiertos.

**2.- Pruebas conductuales para medir desesperanza aprendida.**

La desesperanza es uno de los síntomas de la depresión que puede ser evaluada en roedores. Seligman definió el concepto de desesperanza aprendida, como una condición

que se induce cuando un animal es sometido a situaciones de estrés incontrolable generando una disminución de la capacidad de respuesta frente a un estímulo nocivo (Overmier y Seligman, 1967)

La desesperanza aprendida se evalúa mediante dos maneras: 1.- La Prueba de suspensión de la cola (TST; Tail Suspension Test). y 2.-La Prueba de natación forzada, (FST: Forced Swimming Test). El TST y FST son considerados los principales paradigmas para investigación preclínica de antidepresivos. Al someter a un animal a una situación de estrés inescapable, una menor actitud activa por escapar o luchar tiene correlación con un aumento en la desesperanza (Porsolt y cols., 1978; Castagne y cols., 2009).

***a) Prueba de suspensión de la cola.***

Las ratas son individualmente suspendidas de la cola mediante una pinza ubicada a 5 cm desde el inicio de ésta, manteniendo una distancia de 40 cm desde la pinza al nivel de mesa. Se registra durante 6 minutos el tiempo de en el que el animal permanece en una postura de completa inmovilidad (Ampuero y cols., 2010).

***b) Prueba de natación forzada.***

Esta prueba se desarrolló de acuerdo a la modificación sugerida por Lucki (Lucki, 1997) al método original descrito por Porsolt (Porsolt y cols., 1978). El aparato consiste en un cilindro de acrílico transparente de 50 cm de alto x 20 cm de diámetro con agua temperada. La altura de la columna de agua es de aproximadamente de 30 cm. evitando que

la cola del animal toque el fondo del cilindro. Las ratas son expuestas durante 15 minutos el día 39 (pre-prueba), al día siguiente la rata es sometida nuevamente a la prueba de natación por 5 minutos (prueba). Se registran tres respuestas conductuales: inmovilidad (tiempo en que la rata sólo realiza movimientos necesarios mantener la nariz sobre el agua), nado (tiempo en que la rata nada dentro del cilindro cruzando de un cuadrante a otro) y el escape (tiempo en que la rata realiza acciones para tratar de escapar o escalar por las paredes del cilindro). El tiempo de inmovilidad es considerado un índice de desesperanza ya que el animal disminuye o pierde la capacidad de lucha o supervivencia.

### **3.- Prueba de Actividad Motora.**

Las ratas son individualmente introducidas en una caja de acrílico transparente de dimensiones 30x30x35 cm de alto localizada dentro de una cámara insonorizada. El piso de la caja tiene un contador de actividad (Lafayette Instrument Co, Lafayette, IN) conectado a un contador electromecánico. Se registra durante 30 min. la actividad motora espontánea, las veces que se levanta en dos patas (*levantadas*) y el tiempo total gastado en limpieza (*acicalamiento*). La iluminación al interior de la caja se mantuvo constante durante la prueba a 90 lux. Los animales son registrados mediante la observación de una cámara digital Sony conectada a un computador (Diaz-Veliz y cols., 2004).

#### **4.- Prueba de Laberinto de Morris.**

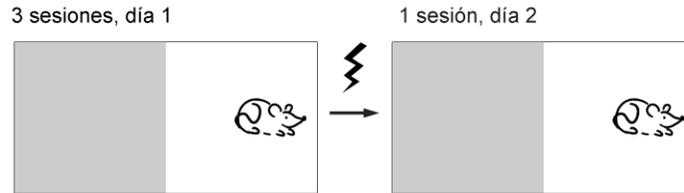
El protocolo utilizado es una modificación del método descrito por Morris (Morris, 1984). Es una prueba ampliamente usada para evaluar memoria espacial en roedores. El aparato consiste en una piscina circular (200 cm diámetro, 50 cm profundidad) llena con agua temperada (22°C ) hasta 30 cm desde el fondo. La piscina se divide en 4 cuadrantes de áreas iguales, cada área es arbitrariamente nombrada Norte, Sur, Este y Oeste. Una plataforma de (17 cm diámetro) se ubica bajo la superficie del agua en la mitad del cuadrante norte. Esta plataforma tiene el mismo color que la piscina, de tal manera de impedir que el animal la detecte. La sala de procedimiento contiene claves visuales sobre la pared y los observadores siempre se ubican en la misma posición dentro de la sala. Las ratas son sometidas a 5 sesiones diarias de nado separadas por 1 hora, durante 5 días. Para esto, las ratas son introducidas al agua mirando las paredes de la piscina desde cada uno de los cuadrantes elegidos en forma aleatoria. Se registra el tiempo que demora en encontrar la plataforma sumergida (latencia), con un tiempo máximo de 120 s. Una vez alcanzada la plataforma se permite que la rata permanezca en ella por 30 s. Se registra la latencia o el tiempo que demora en encontrar la plataforma sumergida. 17 días después de terminado el entrenamiento se realiza una única sesión de nado para medir la memoria remota.

#### **5.- Prueba de Condicionamiento Pasivo.**

Esta prueba requiere que el animal deje de realizar una conducta que previamente fue adquirida. La rata es entrenado para que realice una conducta intuitiva, entrar a un

compartimiento oscuro. Una vez que el animal aprende, recibe un estímulo negativo (shock eléctrico). 24 hrs. después se registra el tiempo que demora el animal en volver a entrar al compartimiento oscuro (latencia al escape). La Prueba de evitación pasiva evalúa memoria no espacial y es dependiente, además del hipocampo, de otras estructuras como la amígdala.

El aparato consiste en una doble cámara de condicionamiento (Lafayette Instrument Co.) compuesto de 2 unidades de prueba de acero inoxidable, cada una equipada con una grilla de 18 barras en el piso, iluminación y generador de tono y shock eléctrico (Mallory Sonalert 2800 Hz, Lafayette Instrument Co.). Una de las cámaras permanece iluminada mientras la otra está oscura y conectada a través de una puerta de guillotina dejando una pequeña rendija entre ambos compartimientos. El día 1 se somete a las ratas a 3 sesiones separadas por 1 hrs. Se introduce el animal en la cámara iluminada en oposición a la puerta de guillotina y se registra el tiempo que el animal demora en entrar a la cámara oscura. Una vez dentro de la cámara se cierra lentamente la guillotina y se esperan 10 s antes de retirar el animal. Si el animal no entra se registra la latencia de 300s y se introduce a través de la rendija a la cámara oscura. En la última sesión del día 1 una vez que la rata entra a la cámara oscura, se aplica un shock eléctrico de 0,2 mA durante 2 s. Inmediatamente después del entrenamiento la rata es removida desde el aparato y llevada de vuelta a su propia caja. El día 2 la rata es introducida en el compartimiento iluminado y se registra la latencia a entrar en el compartimiento oscuro con un máximo de 300s. La latencia de entrada de la rata al compartimiento oscuro, lugar donde recibe el choque eléctrico, se considera un índice de la memoria de retención. (Ver **Figura 5**).

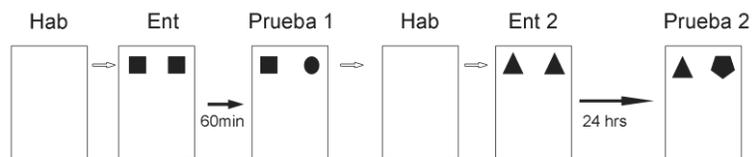


**Figura 5. Diseño experimental de la Prueba de Condicionamiento Pasivo.** Prueba conductual diseñada para evaluar la memoria a un estímulo aversivo. Doble cámara de estimulación con un compartimiento oscuro y otro iluminado separado por una puerta de guillotina.

#### **6.- Prueba de Reconocimiento de Objeto Novedoso.**

La prueba evalúa el tiempo que las ratas, previamente expuestas a dos objetos idénticos, gastan en explorar un objeto novedoso. El animal es inicialmente expuesto a dos objetos idénticos (familiar), mientras una segunda exposición se compara el tiempo que el animal utiliza en reconocer un objeto novedoso, que reemplaza a uno de los objetos familiares. Los roedores son animales curiosos, por lo que una conducta etológica es preferir el reconocimiento del objeto novedoso por sobre el objeto familiar. En la **Figura 6**, se muestra un esquema de la prueba y se indica que se puede realizar la misma prueba secuencialmente con un mismo animal. Para ello, se necesita de dos objetos idénticos (denominados A1 y A2) más uno diferente (B1, para la primera prueba, mientras la segunda prueba utilizará otro par de objetos familiares C1 y C2 y un segundo objeto novedoso D1). El aparato utilizado consiste en un arena de acrílico transparente de 60x40 cm con paredes de 30 cm. Se utilizaron dos pares de objetos, 1<sup>er</sup> par: 1 botella vidrio de 100ml (marca

schott) y un frasco de vidrio de 250 ml (jugo), 2<sup>do</sup> par de objetos: un frasco de plástico marca Falcon de 50 ml y una ampollita de vidrio empavonado. La prueba se realizó de 3 etapas: habituación, entrenamiento y prueba. La conducta de las ratas se registró mediante una cámara de video ubicada sobre el arena. La habituación se realizó en 3 sesiones: 1<sup>era</sup> (día 1 AM), 2<sup>da</sup> (día 2 AM) y 3<sup>era</sup> (día 2 PM), durante las cuales las ratas fueron expuestas al arena sin objetos por 10 minutos. En la etapa de entrenamiento (día 4), la rata fue expuesta durante 10 minutos a dos objetos idénticos en uno de los extremos del arena (A1 y A2: frascos de vidrio de 100 ml). En la etapa de prueba se evalúa la preferencia de la rata por explorar un objeto novedoso. Para evaluar memoria a corto plazo, 60 minutos post entrenamiento a la rata se le permite explorar durante 3 minutos el arena con uno de los objetos nuevo (A3 y B1). EL objeto A3 es idéntico a A1 y A2 por lo tanto le parece familiar mientras B1 es el objeto novedoso. Para evaluar memoria a largo plazo, 24 hrs. post entrenamiento se vuelve a evaluar la preferencia por el objeto novedoso. Para evaluar esta respuesta en el mismo grupo de ratas, el día 5 se vuelve a realizar la habituación en el arena sin objetos. Luego, el día 6 se realiza la segunda sesión de entrenamiento con un nuevo par de objetos idénticos (C1 y C2). La prueba para evaluar memoria a largo plazo se realizó 24 hrs. post entrenamiento. Para esto a la rata se le permitió explorar durante 3 minutos el arena con un nuevo par de objetos (C3 y D1). En todas las pruebas se registraron 3 minutos de exploración. Se cuantificó el tiempo de contacto en cada uno de los objetos. La posición de los objetos fue alternada izquierda/derecha para evitar preferencia de lugar.



**Figura 6. Diseño experimental de la Prueba de Reconocimiento Objetos.** Prueba conductual diseñada para evaluar la memoria de reconocimiento de objeto novedoso. Hab.: habituación, arena sin objetos; Ent.: entrenamiento 1<sup>er</sup> par de objetos ; Prueba1: ORM 60 min. después de entrenamiento1; Ent. 2: entrenamiento 2<sup>do</sup> par de objetos; Prueba 2: ORM 24 hrs. después entrenamiento 2. Objetos: A1 y A2:■; B1:●; C1 y C2:▲; D1:◆.

**Protocolo de Fijación (para Inmunohistoquímica y Tinción de Golgi).**

Las ratas fueron anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de una solución de ketamina (50 mg/kg)/xilasina (5 mg/kg). Se fijó el tejido por perfusión intracardíaca con una solución de fijación que contiene: 4% paraformaldehído; 0,3% ácido pícrico en tampón fosfato salino (PBS: NaCl 0,1M, KCl 0,001M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01M y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,001M ) a 37°C seguido por perfusión a 4°C. Las ratas se decapitaron y se les removió el cerebro, se postfija en la misma solución de fijación por 16 hrs. Luego los cerebros se incubaron con una solución crioprotectora de sacarosa 30% p/v en PBS-azida por 48 hrs.

**Protocolo de Inmunohistoquímica.**

Se realizaron cortes coronales (30 μm] seriados en un crióstato y se realizaron los siguientes tratamiento: lavado con PBS, bloqueo de la peroxidasa endógena con 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

v/v en PBS, lavado, solución de bloqueo (triton 0,4% , azida 0,02%, suero normal de cabra (NGS) 5% y albúmina de suero de bovino (BSA 0,1% en PBS). Luego, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario en la misma solución de bloqueo. Se realizaron curvas de titulación y se probaron distintos tiempos de incubación para los anticuerpos primarios. Posteriormente, los cortes se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario compatible (Jackson Immunoresearch) a una concentración 1:1000 por 2 hrs. en una solución de triton 0,4%, azida 0,02%, NGS 3% y BSA 0,1% Finalmente, los cortes se lavaron y se incubaron con el complejo ABC-avidina-biotina acoplada a la enzima peroxidasa de rabanita (Vectastien ABC Complex, Vector Laboratories) para amplificar la señal colorimétrica. La detección de la señal de color se realizó utilizando como sustrato 3,30-diaminobenzidina (DAB, Sigma) en una solución de revelado (DAB 0.05%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01%, NiCl<sub>2</sub> 0.15 % en tampón Tris (Trizma base 50 mM, NaCl 150 mM , pH 7.6). El producto de la reacción fue un precipitado de color negro. Los cortes fueron montados sobre portaobjetos gelatinizados (gelatina 0,1%, Merck), deshidratados y clarificados con xilol (Merck) para luego ser cubiertos con Entellan (Merck).

Se analizó la inmunorreactividad en secciones coronales de distintas áreas telencefálicas: Corteza RSGb e Hipocampo: desde interaural 5.86 mm/bregma -3.14 mm hasta interaural 4.84 mm/ bregma -4.16 mm. Corteza PrL y M2: desde interaural 13.20 mm/bregma-4.20 mm hasta interaural 11.20/bregma -2.20 mm (Atlas de la rata, Paxinos and Watson, 1998). Se analizaron las neuronas piramidales de la capa V de las cortezas RSGb y PrL y de la capa II-III de las cortezas PrL y M2. Se realizaron las microfotografías utilizando microscopio Axioscope (Zeiss, Germany; 10x magnificación 0.3 apertura numérica) acoplado a una cámara digital Coolpix 995 (Nikon, Japan) con una magnificación

final de 880x. Se cuantificó el número de células inmunopositivas en áreas corticales iguales de 0,0289 mm<sup>2</sup> de al menos 5 imágenes por área, mediante el programa Image J (National Institutes of Health).

### **Tinción de Golgi.**

El cerebro fijado se lavó con agua destilada y se incubó durante 10 días con una mezcla de partes iguales de los reactivos A+B del Kit. *FD Rapid GolgiStain™* (FD Neuro Technologies, Inc., Ellicott city, MD, USA). Se realizaron cortes coronales de 200 µm en un micrótopo. Las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados y se incubaron con una mezcla 1:1:2 (correspondiente a: reactivo D:reactivo E:agua). Las secciones fueron deshidratadas mediante el paso por soluciones alcohólicas seriadas y se limpiaron con xilol para cubrir las con Entellan (Merck). Los portaobjetos fueron codificados para realizar el análisis en doble ciego. Las neuronas fueron seleccionadas utilizando los siguientes criterios: (1) la ausencia de dendritas truncadas, (2) impregnación oscura constante a lo largo del árbol dendrítico y (3) aislamiento relativo desde células gliales vecinas u otras neuronas que se superpongan en el campo visual de análisis. Se dibujaron las neuronas seleccionadas utilizando una cámara lucida acoplada al microscopio (500X, BH-2, Olympus Co., Tokyo, Japan). Posteriormente, las imágenes fueron digitalizadas en un escáner (8-bit, escala de grises, 600 dpi).

### Análisis morfométrico.

El análisis de las imágenes escaneadas se realizó con el programa ScionImage Corporation. Se midió el largo dendrítico de las ramificaciones basales y apicales y el área del soma de neuronas piramidales de la corteza.

Se cuantificó la densidad y morfología de las espinas en neuronas piramidales utilizando una retícula de 10x10.

Corteza cerebral: Se ubicó la retícula al comienzo de una dendrita primaria o de una dendrita secundaria y cuantificaron los primeros 80  $\mu\text{m}$ . Se midieron 1200 espinas desde 18 a 23 neuronas por condición.

CA1, Hipocampo: Se ubicó la retícula al comienzo del proceso y se cuantificaron los primeros 50  $\mu\text{m}$ . Se analizaron dendritas secundarias proximales al soma (<50 *stratum radiatum*) y distales al soma (>100  $\mu\text{m}$ , *stratum lacunosum moleculare*). Se midieron 1000-1200 espinas desde 10 a 11 neuronas por condición.

Las espinas dendríticas fueron clasificadas bajo microscopio a distintos planos focales, por un único observador, en doble ciego según el criterio descrito en Hering (Hering y Sheng, 2001) y utilizado en (Ampuero y cols., 2010). Se determinaron 3 categorías en base al tamaño/diámetro del cuello y cabeza en: Filopodio/Delgadas (D), Callampa/Ramificada (C) y Botón (B). Las espinas delgadas (D) tienen un cuello de mayor longitud que la cabeza y el tamaño de la cabeza no se diferencia del diámetro del cuello. Las espinas botón (B) tienen una longitud similar al diámetro del cuello. Las espinas callampa

(C) tienen un diámetro del cuello más pequeño que el tamaño de la cabeza y las espinas ramificadas tienen más de una cabeza emergiendo desde la base de la dendrita.

### **Tinción de Cobalto.**

Para detectar la presencia diferencial de subunidades del R-AMPA, se realizó la tinción de cobalto. Se utilizó un protocolo modificado desde Borbely y cols. (Borbely y cols., 2009). Las ratas se decapitaron, se les removió el cerebro y se cortaron rebanadas de hipocampo dorsal (6 – 10 rebanadas de 200-250  $\mu\text{m}$  por rata). Éstas se incubaron en tampón libre de Calcio por 5 min (KCl 4,6 mM ,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM, glucosa 10 mM, NaCl 118 mM , Na-HEPES 25 mM, pH 7,4). Posteriormente, se incubaron en tampón de incorporación por 10 min. (KCl 5 mM ,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, glucosa 12 mM , sacarosa 139 mM , NaCl 57,5 mM ,  $\text{CaCl}_2$  0,75 mM,  $\text{NaHCO}_3$  20 mM, pH 7,4) con  $\text{CoCl}_2$  5mM y los siguientes antagonistas: ácido 2-amino-5-phosphonopentanoico (APV) 40  $\mu\text{M}$  , tetrodotoxina (TTX) 1  $\mu\text{M}$  , Nimodipina 2  $\mu\text{M}$ . Los controles negativos se les agregó un antagonista del R-AMPA 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) 20  $\mu\text{M}$ . Luego se incubaron con el agonistas para el R-AMPA ácido quisquálico (QA) por 20 min. a temperatura ambiente. La reacción se terminó incubando las rebanadas durante 5 min. con tampón de incorporación más EDTA 2mM. Finalmente, las rebanadas se incubaron con  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  0,24% v/v en tampón de incorporación formándose un precipitado de cobalto. Las rebanadas fueron lavadas 2 veces con tampón de incorporación, fijadas en glutaraldehído 0,8% v/v por 4 hrs. y deshidratadas en solución de sacarosa 30% por 48 hrs. Para intensificar la reacción las rebanadas fueron lavadas con agua destilada por 5 min. y luego incubadas con una solución que contiene  $\text{AgNO}_3$  0.1% en

sacarosa 292 mM, hidroquinona 15,5 mM y ácido cítrico 42 mM por 1 hrs. a 40°C manteniendo agitación suave. La reacción fue terminada por dilución en 2 volúmenes de agua. Después de este procedimiento las rebanadas fueron montadas en PBS-10% glicerol.

Para la cuantificar la tinción se realizaron fotografías utilizando una cámara Nikon (coolpix 995) acoplada a una lupa de disección. Mediante el programa ImageJ, se cuantificó el área CA1 del hipocampo dorsal, en imagen digital se midió la intensidad promedio en 5 campos de 114,0 x 28,5  $\mu\text{m}$  (3,250  $\mu\text{m}^2$ ) en cada una de las capas de CA1 (*stratum pyramidale*, *stratum radiatum* y *stratum oriens*). Los valores se normalizaron mediante el porcentaje de tinción respecto a la intensidad de tinción en el *stratum pyramidale*.

### **Análisis Estadístico.**

#### ***a) Análisis estadístico de las Pruebas conductuales que miden Ansiedad y Desesperanza aprendida.***

Se utilizó análisis de componentes principales (ACP) para identificar patrones de correlación entre las variables originales (medidas directamente) antes y después del tratamiento. Este método permite reducir las variables originales a 1 ó 2 dimensiones, de tal manera de facilitar la comparación entre grupos experimentales y la determinación de significancia estadística (ver **Apéndice III**). Posterior al ACP se compararon los grupos mediante un Análisis de Varianza (Anova) de una entrada, utilizando la Prueba de Bonferroni a posteriori \*\*.

***b) Análisis estadístico de las pruebas de actividad motora espontánea.***

Se determinó significancia estadística mediante Anova de una entrada, seguido de un post hoc Bonferroni \*\*.

***c) Análisis estadístico de la prueba del Laberinto de Morris.***

Para determinar si las curvas de aprendizaje de las ratas control y las ratas tratadas con flx son estadísticamente diferentes se realizó estadística multivariada. Se desarrolló un modelo mixto para datos con medidas repetidas:

$$t = \beta_0 + \beta_1 \times \text{día} + \beta_2 \times \text{cond} + \beta_3 \times \text{cond} \times \text{día} + \beta_4 \times \text{día}^2 + \beta_5 \times \text{cond} \times \text{día}^2 .$$

Donde **día** corresponde a los 5 primeros días del aprendizaje y **cond** corresponde a la condición de la rata: control o flx.

Se comparó la latencia observada día 15 post aprendizaje en los grupos control y flx mediante una Prueba t de Student.

***d) Análisis estadístico de la Prueba de Condicionamiento Pasivo.***

Se comparó la latencia que la rata demora en cruzar al compartimiento oscuro en los grupos control y flx mediante una Prueba t de Student \*\*.

***e) Análisis estadístico de la Prueba de Reconocimiento de Objeto Novedoso.***

Para comparar los tiempos de exploración totales gastados en el objeto novedoso entre los grupos control y flx se utilizó el método de Kaplan-Meier. Adicionalmente, se normalizaron las respuestas del tiempo en dos variables: razón de diferenciación, que corresponde al tiempo gastado en explorar objeto novedoso menos el tiempo gastado en explorar el objeto familiar, y razón de discriminación, que corresponde al tiempo gastado en explorar el objeto novedoso dividido por el tiempo total de exploración. Después de este análisis, se determinó si significancia estadística mediante la Prueba t de Student \*\*.

***f) Análisis estadístico para los resultados obtenidos de los experimentos de Inmunohistoquímica, Tinción de Cobalto y de Tinción de Golgi***

Se determinó significancia estadística de los resultados para los grupos control y flx mediante la Prueba de Mann-Whitney \*\*.

\*\* Para todas las pruebas se consideró significancia estadística  $p < 0,05$  y se utilizó el programa para análisis estadístico STATA 9.0.

## **Capítulo 5:**

---

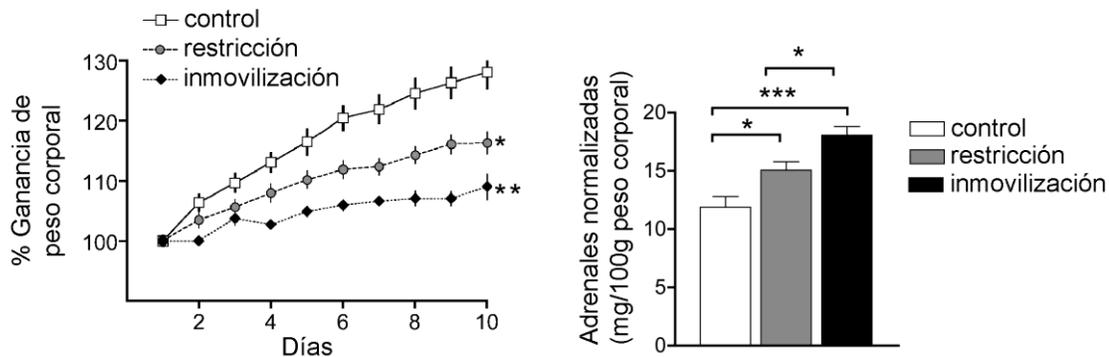
### **Resultados Experimentales**

#### **1. Establecer un modelo conductual de depresión inducida por estrés repetido en ratas y determinar la dosis efectiva para revertir los síntomas depresivos por flx y rbx.**

##### ***1.1. Evaluar parámetros fisiológicos y conductuales en dos modelos de estrés repetido en que se aplica restricción de movimiento o inmovilización.***

###### ***1.1.1. Efecto de 10 días estrés repetido sobre parámetros fisiológicos.***

Se evaluaron dos protocolos ampliamente utilizados para inducir estrés, la **Restricción** de movimiento y la **Inmovilización**. Después de 10 días de estrés repetido se analizó si los dos modelos de estrés empleados inducen cambios significativos en parámetros fisiológicos como la ganancia de peso corporal y peso de las glándulas adrenales, y en parámetros conductuales como ansiedad y desesperanza aprendida. Ambos paradigmas de estrés repetido, restricción e inmovilización, disminuyeron la ganancia de peso corporal (**Figura 7A**). No se encontraron diferencias significativas entre restricción e inmovilización. Además, una vez finalizadas las pruebas conductuales se midió el peso de las glándulas adrenales y se normalizó según el peso al inicio del tratamiento (**Figura 7B**). Se observan aumentos en ambos modelos. En este caso, encontramos que el peso de las glándulas es mayor después de inmovilización cuando se compara con restricción ( $p < 0,05$ ).



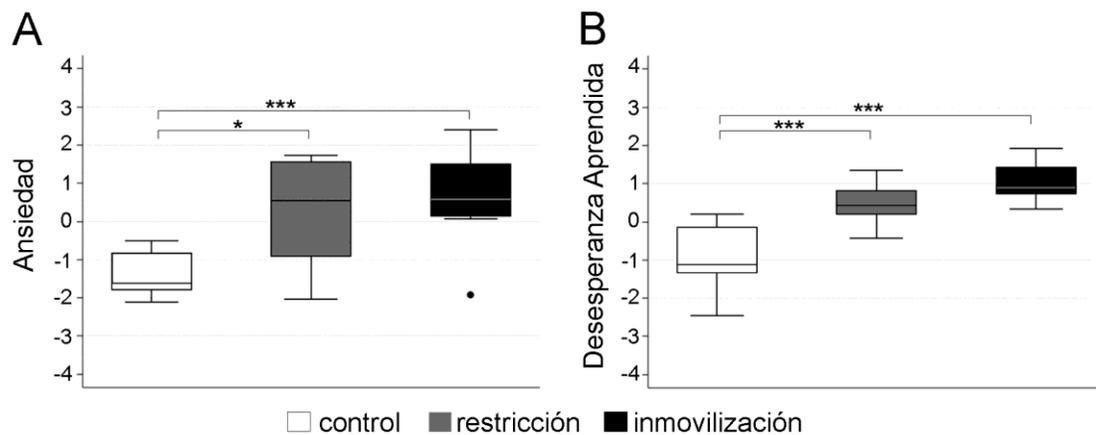
**Figura 7. Determinación de parámetros fisiológicos después de 10 días de estrés repetido.** A) Curso temporal de la ganancia de peso corporal de ganancia de peso corporal durante los primeros 10 días de exposición a estrés ( $F_{(2,28)}=8,472$ ,  $p<0,01$ ). B) Efecto de 10 días de estrés repetido sobre el peso de las glándulas adrenales (mg/100 g de peso corporal) ( $F_{(2,25)}=16,06$   $p<0,0001$ ). Los valores representan el promedio  $\pm$  EE. Controles:  $n=13$ , restricción:  $n= 11$  e inmovilización:  $n=11$ . Análisis estadístico Anova de una entrada seguido de un post-hoc Bonferroni, significancia estadística \* =  $p<0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p <0,001$ .

### 1.1.2. Efecto de 10 días de estrés repetido sobre parámetros conductuales.

Para evaluar la inducción de síntomas depresivos en ambos modelos, se analizó la ansiedad a través de las pruebas de NSF y EPM y la desesperanza aprendida mediante el TST y FST (**Figura 8**).

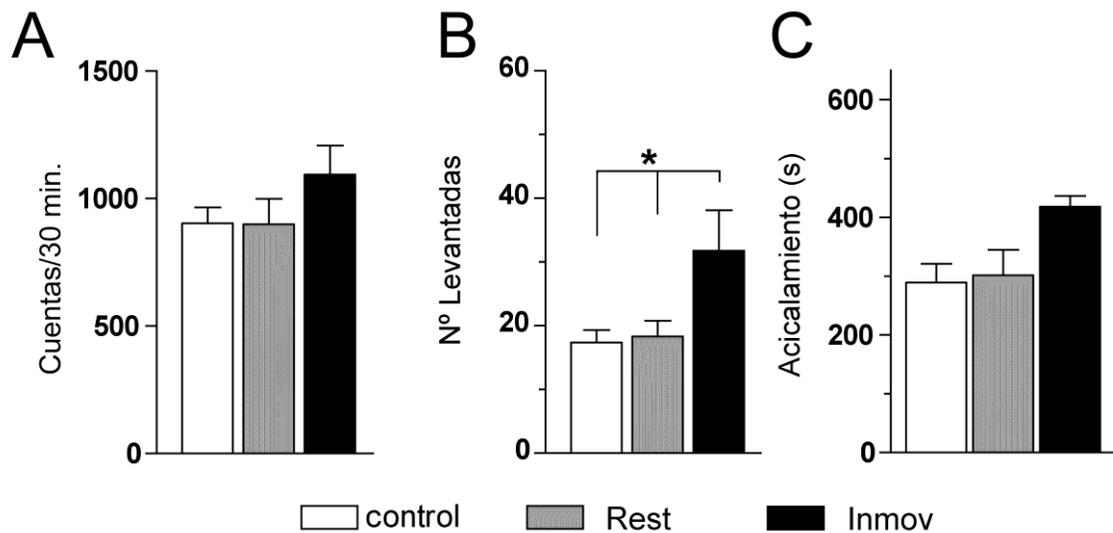
Para comparar los resultados de las variables que miden ansiedad y desesperanza en cada una de las condiciones experimentales se realizó análisis de componentes

principales (ACP) (ver apéndice III). Se obtuvieron 2 factores que fueron designados como *ansiedad* y *desesperanza aprendida*. La ansiedad resume la variación de las variables del NSF y EPM, mientras la desesperanza resume la variación de las variables del TST y FST. En cada una de las columnas del gráfico de cajas (box plot) se observa la media, percentil 75, percentil 25, máximo y mínimo. Los resultados obtenidos no muestran que después de 10 días de estrés repetido ambos modelos de estrés fueron efectivos en aumentar la ansiedad y la desesperanza aprendida.



**Figura 8. El Análisis de Componentes Principales revela que 10 días de estrés repetido inducen conductas depresivas.** Los valores del eje Y representan el valor de los factores ansiedad y desesperanza para cada una de las condiciones experimentales, control, restricción e inmovilidad. A) Ansiedad ( $F_{(2,26)}=11,32$ ,  $p<0,001$ ) y B) Desesperanza Aprendida ( $F_{(2,27)}=1094$ ,  $p<0,001$ ). Gráfico de cajas en donde se muestran los percentiles P25 y P75, la media, los máximos y mínimos. Controles:  $n=15$ , Restricción:  $n=12$  e Inmovilización:  $n=12$ . Análisis estadístico Anova seguido de una entrada seguido de un post hoc Bonferroni, \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$  con respecto al control.

En el NSF se controla el consumo de alimento una vez que el animal es devuelto a su propia caja de almacenamiento. No se observaron diferencias significativas en el consumo debido a estrés repetido (control:  $1,212 \pm 0,1054$ ; Rest:  $0,9323 \pm 0,1669$ ; Inmov:  $0,8647 \pm 0,1460$ ;  $F_{(2,33)}=1,927$  ,  $p=0,1617$ ). Adicionalmente, para comprobar que la diferencias observadas en las pruebas conductuales no se deben a alteraciones motoras de los animales se midió durante 30 minutos la actividad motora espontánea, el tiempo de acicalamiento y el número de levantadas (cuando el animal se levanta en sus patas traseras). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales excepto en el número de levantadas, donde se observaron diferencias entre el control y el grupo de ratas expuestas a estrés por inmovilización (**Figura 9 B, C, D**), lo que está de acuerdo con una mayor nivel de ansiedad (Ampuero y cols., 2010).



**Figura 9. Efecto de 10 días de estrés repetido sobre la actividad motora espontánea. A) Actividad motora espontánea total. B) Nº de levantadas, C) Tiempo de acicalamiento. Valores representan el promedio  $\pm$  EE. controles: n=15, restricción: n= 12 e**

inmovilización: n=12. Análisis estadístico Anova de una entrada seguido de post-hoc Bonferroni. \*= p<0,05 comparado contra control.

Estos resultados indican que 10 días de estrés repetido por restricción o por inmovilización son suficientes para inducir síntomas depresivos.

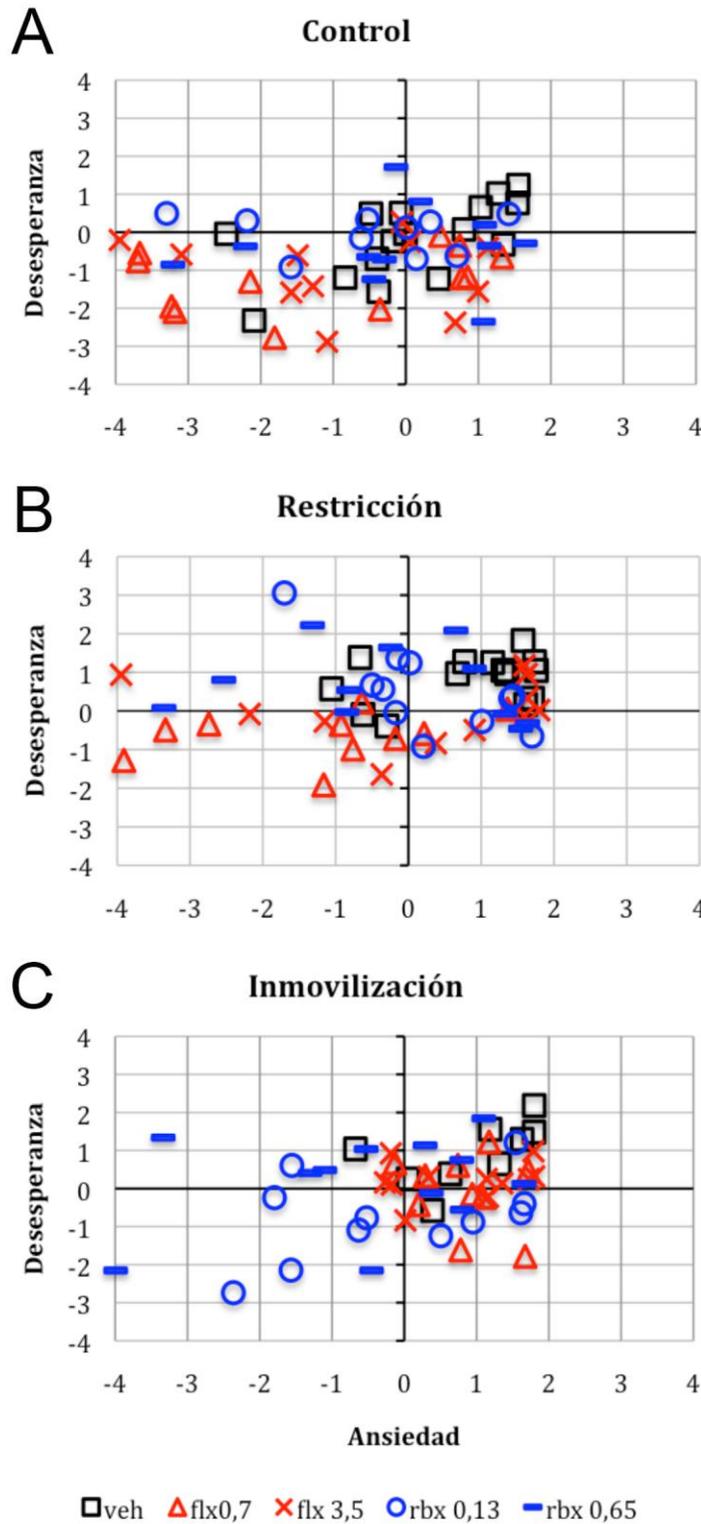
### ***1.2. Evaluar el efecto de la administración de flx o rbx sobre las conductas depresivas inducidas por estrés repetido.***

Para determinar si la administración prolongada de FADs es capaz de revertir los efectos deletéreos del estrés, se administró durante 28 días flx, rbx o solución salina en grupos de ratas estresadas y control (**Figura 3**, diseño experimental). Se realizó Análisis de Componentes Principales (ACP) de los resultados obtenidos en las pruebas conductuales, obteniéndose dos factores: ansiedad y desesperanza aprendida. Se construyó un gráfico de puntos para mostrar la correlación entre los factores ansiedad (abscisa) y desesperanza aprendida (ordenada), separando los animales en tres grupos según el tratamiento farmacológico recibido (**Tabla 1**). Los resultados fueron analizados independientemente del protocolo de estrés al que fueron sometidos: control (**Figura 10A**), restricción (**Figura 10B**) e inmovilización (**Figura 10C**). En cada gráfico, en el cuadrante que corresponde a los valores negativos de desesperanza y ansiedad se ubican todos los animales que presentan menor ansiedad y desesperanza, mientras que el cuadrante que corresponde a los valores positivos, se ubican los animales que presentan mayor ansiedad y desesperanza. En el gráfico del grupo control, se observa que no hay diferencia entre animales tratados con flx o rbx, pues ambos fármacos son efectivos en disminuir los síntomas depresivos (en 13 de 22

ratas tratadas con flx y en 7 de 21 ratas tratadas con rbx (**Figura 10A**). A diferencia de lo anterior, en el grupo de ratas sometidas a estrés por restricción, la reducción de estos síntomas ocurre preferentemente en ratas tratadas con flx (símbolos rojos) (**Figura 10B**). A su vez, en el grupo de Inmovilización, la reducción de los síntomas depresivos sólo ocurre en ratas tratadas con rbx (símbolos azules) (**Figura 10C**). La estadística correspondiente se muestra en la Figura 11 y **Tabla 1**. Ésta última, nos muestra los resultados del análisis estadístico para los factores individuales. Estos resultados muestran una selectividad diferencial de flx y rbx en la reversión de los síntomas depresivos inducidos por restricción e inmovilización, respectivamente.

	<b>Ansiedad</b>	<b>Desesperanza Aprendida</b>
<b>Control</b>	F(2,24)=0,83(p=0,4501)	F(2,66)=12,89(p=0,001)
control vs flx	ns	0,0001
control vs rbx	ns	ns
flx vs rbx	ns	0,013
<b>Rest</b>	F(2,27)=6,71(p=0,0043)	F(2,51)=10,92(p=0,001)
control vs flx	0,007	0,0001
control vs rbx	0,009	ns
flx vs rbx	ns	0,001
<b>Inmov</b>	F(2,34)=4,16(p=0,0243)	F(2,50)=5,48(p=0,007)
control vs flx	ns	ns
control vs rbx	0,031	0,005
flx vs rbx	ns	ns

**Tabla 1. Resumen del análisis estadístico a los factores obtenidos en del análisis de componentes principales.** Análisis estadístico, Anova de una entrada seguido de un post hoc Test Bonferroni.

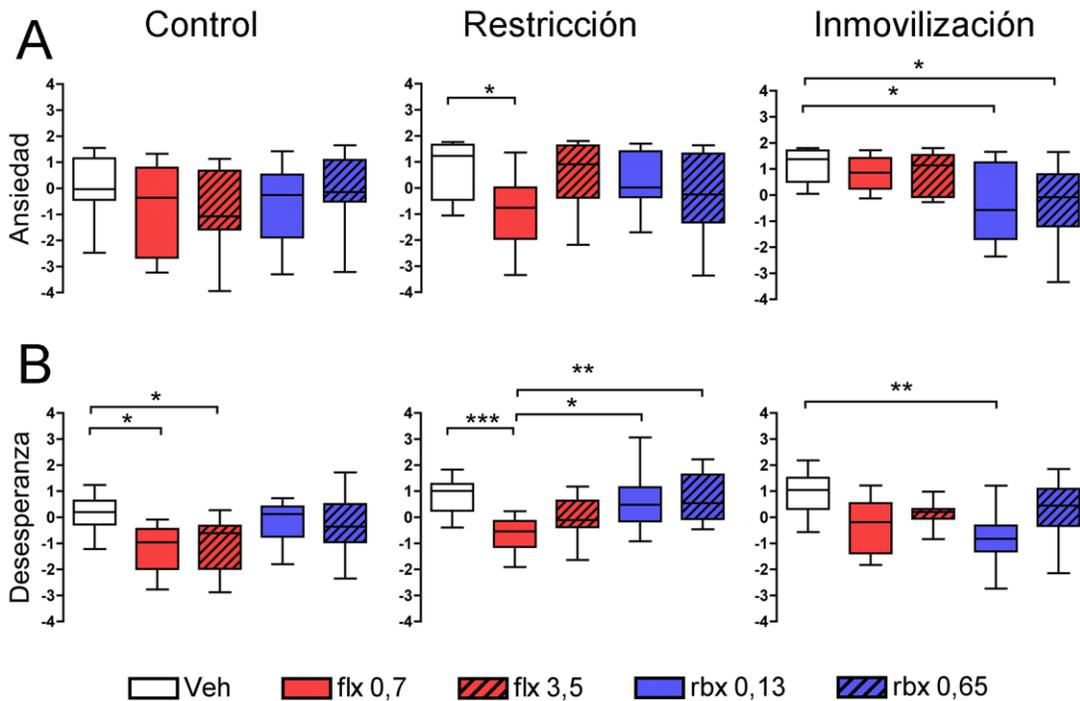


**Figura 10. La administración prolongada de fármacos antidepresivos modula la ansiedad y desesperanza aprendida en ratas sometidas a estrés.**

Diagrama de puntos de los factores ansiedad y desesperanza aprendida después de 28 días de administración de FADs o vehículo en cada uno de los grupos: A) Control; B) Restricción y C) Inmovilización. Los colores representan los fármacos utilizados (rojo: flx; azul: rbx; negro: vehículo) mientras los diferentes símbolos indican las dosis

### ***1.3. Determinar la dosis efectiva para cada uno de los FADs utilizados.***

Con el objetivo de determinar la dependencia de la dosis, se evaluaron dos dosis de cada uno de los fármacos: 0,7 o 3,5 mg/kg para flx, y 0,13 o 0,65 mg/kg para rbx. Antecedentes previos del laboratorio mostraron que tanto la administración de flx 0,7 mg/kg como de rbx 0,13mg/kg durante 28 días fueron efectivas en producir cambios en la señalización mediada por la neurotrofina BDNF y su receptor TrkB (Wyneken y cols., 2006). Otros autores también han mostrado que dosis semejantes son efectivas en inducir cambios neurobiológicos relacionados con el efecto antidepresivo (Stewart y Reid, 2000; Contreras y cols., 2001; Rodriguez-Landa y cols., 2003). Se observó dependencia de la dosis de los fármacos. Así, las dosis bajas de flx y rbx fueron capaces de disminuir las conductas depresivas provocadas por restricción e inmovilización, respectivamente (**Figura 11**). Además, en las ratas expuestas a inmovilización la dosis alta de rbx (0,65 mg/kg) también fue capaz de disminuir la ansiedad. En los animales controles, ninguno de los FAD mostró un efecto ansiolítico, mientras ambas dosis de flx (0,7 y 3,5 mg/kg) mostraron un efecto sobre la desesperanza. En conclusión, los síntomas depresivos inducidos por restricción son revertidos preferentemente por flx mientras que en la inmovilización, son revertidos por rbx. A su vez, flx es capaz de modular la desesperanza en ratas naïve.



**Figura 11. Bajas dosis de flx y rbx son efectivas en revertir las conductas depresivas inducidas por restricción e inmovilización, respectivamente.** A) Ansiedad y B) Desesperanza Aprendida en cada uno de los grupos: control, restricción e inmovilización tratados con dos dosis de cada fármaco. Análisis estadístico Anova de una entrada seguido de un post-hoc Bonferroni, \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$ .

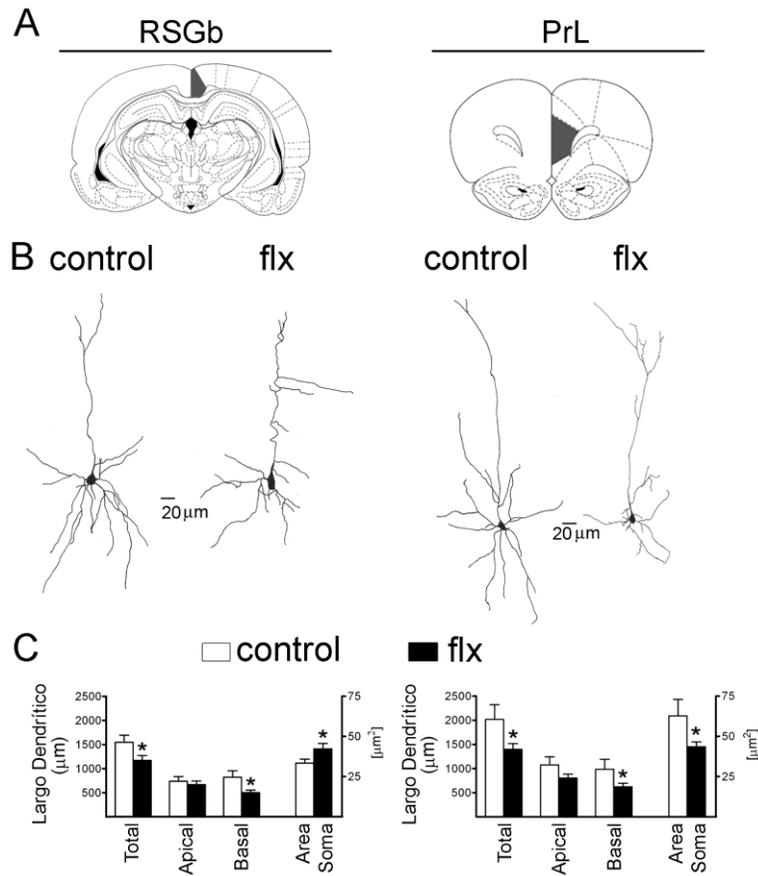
Como se desprende de la **Figura 10A y 11**, flx tiene efectos conductuales en ratas naïve. Para aproximarnos a los cambios morfológicos y moleculares que se inducen en neuronas glutamatérgicas telencefálicas por la administración prolongada de este fármaco, se utilizó la dosis menor, que en animales estresados revierte los síntomas depresivos, por 4 semanas a ratas naïve.

## **2.- Determinar cambios en la morfología dendrítica de neuronas piramidales inducidos por la administración prolongada de flx.**

Para evaluar efectos a nivel morfológico, se analizó el largo del árbol dendrítico, su complejidad, el tamaño del soma neuronal y la morfología de espinas en neuronas piramidales del telencéfalo.

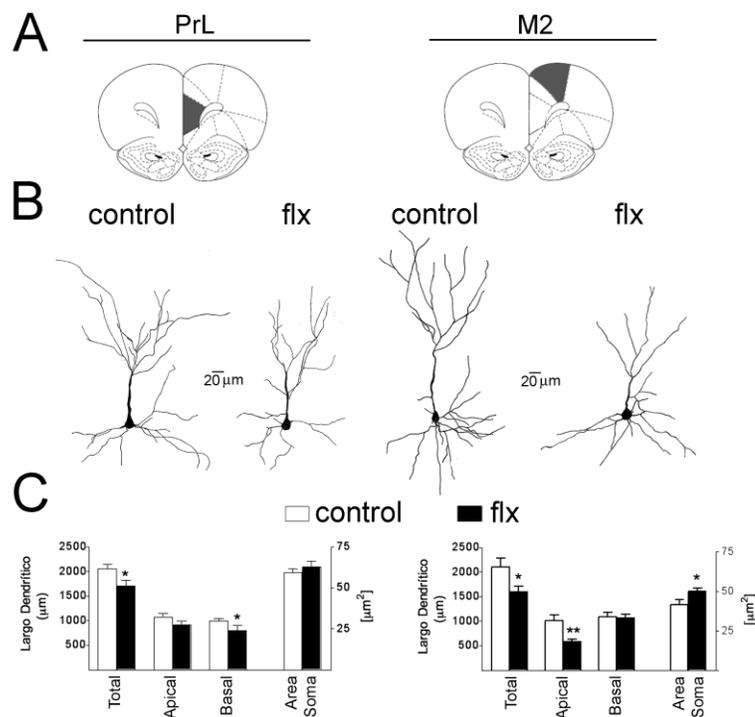
### ***2.1.- Cambios en el árbol dendrítico.***

Se analizó la morfología de las neuronas piramidales de la capa V en áreas corticales tales como la corteza Prelímbica (PrL) y la corteza Retroesplenial Granular b (RSGb). Para evaluar el árbol dendrítico se midió el largo dendrítico apical y basal, y el tamaño del soma (área). Los resultados obtenidos nos indican que en áreas corticales límbicas como la RSGb y PrL, flx induce una retracción dendrítica en neuronas piramidales de la capa V (**Figura 12 B, C**). Este efecto es debido a una reducción del árbol dendrítico basal (**Figura 12C**). Al analizar el tamaño del soma neuronal se observó que flx indujo un aumento del tamaño del soma en la RSGb, mientras en PrL ocurrió lo opuesto (**Figura 12C**). No se observaron diferencias en el número de ramificaciones de las neuronas piramidales estudiadas (**Figura 14**).



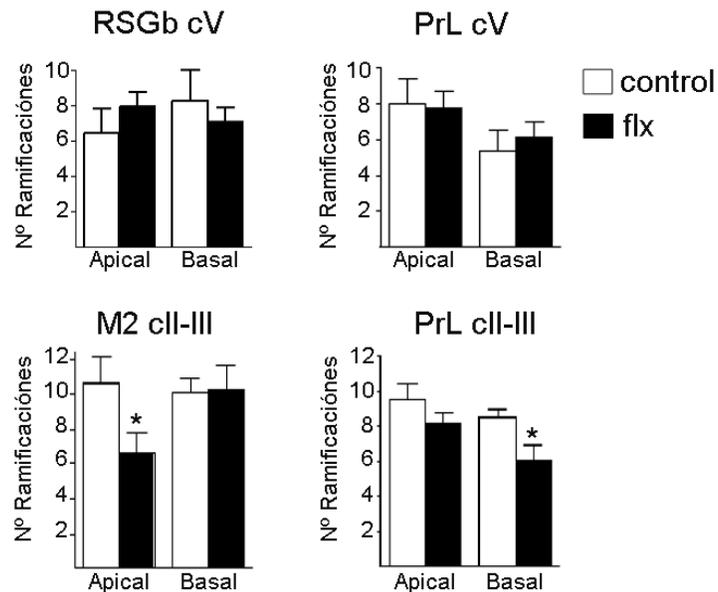
**Figura 12. Fluoxetina disminuye el largo dendrítico en neuronas piramidales de la capa V.** A) Esquema de los niveles seleccionados para el análisis, indicando el área cortical analizada (RSGb y PrL capa V) B) Dibujo de una neurona representativa obtenido mediante cámara lúcida. C) Cuantificación del largo dendrítico y área del soma de neuronas controles y flx en cada una de las áreas analizadas. Los valores representan la media  $\pm$  EE. **control:** n= 9 (RSGb), n=8 (PrL); **flx** n=15 (RSGb), n=23 (PrL). Se utilizó la Prueba de Mann-Whitney para determinar significancia estadística entre los grupos, \*=p <0,05.

También se evaluó si la administración prolongada de flx afecta la morfología de las neuronas piramidales de la capa II-III de la PrL (PrL cII-III) y en a corteza Motora Secundaria (M2 cII-III) (**Figura 13**). Al igual que en la capa V de las cortezas RSGb y PrL, en la capa II-III de las cortezas PrL y M2 flx disminuyó el largo dendrítico total. Esto es debido a una disminución en el largo dendrítico basal en PrL y apical en M2 (**Figura 13C**). Por otra parte, sólo se observó un aumento el tamaño del soma inducido por flx en M2 (**Figura 13C**). A diferencia de lo observado en las neuronas piramidales de la capa V, en las neuronas piramidales de la capa II-III, flx indujo disminución del número de ramificaciones en ambas cortezas analizadas PrL y M2 (**Figura 14**).



**Figura 13. Fluoxetina disminuye el largo dendrítico en neuronas piramidales de la capa II-III de la corteza PrL y M2.** A) Esquema de los niveles seleccionados para el

análisis, indicando el área cortical analizada (PrL y M2 capa II-III) B) Dibujo de una neurona representativa obtenido mediante cámara lúcida. C) Cuantificación del largo dendrítico y área del soma de neuronas controles y flx en cada una de las áreas analizadas. Los valores representan la media  $\pm$  EE. **control**: n=11 (PrL), n= 7 (M2); **flx**: n=12 (PrL), n=8 (M2). Se utilizó la Prueba de Mann-Whitney para determinar significancia estadística entre los grupos, \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ .

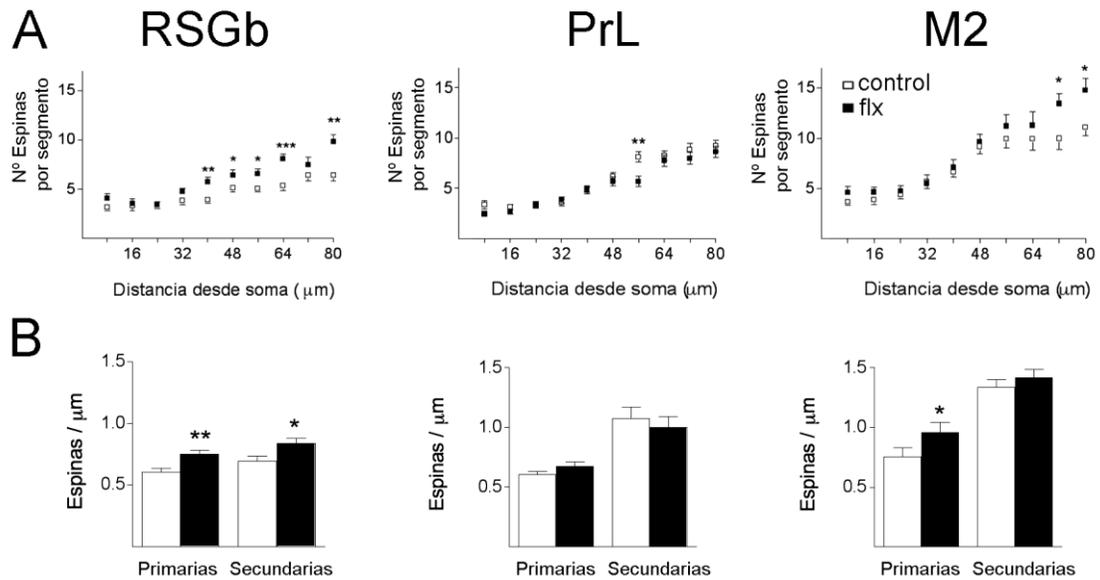


**Figura 14. El número de ramificaciones en neuronas piramidales de distintas áreas corticales cambia después de tratamiento con flx.** Los valores representan la media  $\pm$  EE. **control**: n= 9 (RSGbcV), n=8 (PrLcV), n= 8 (M2 cII-III), n=11 (PrL cII-III); **flx**: n=15 (RSGb cV), n=23 (PrL cV), n=8 (M2 cII-III), n=12 (PrL cII-III). Análisis estadístico Mann-Whitney, \*= $p < 0,05$ .

Como se observó en las **figuras 12 y 13**, la administración durante 4 semanas de flx 0,7 mg/kg indujo robustos cambios en el largo dendrítico de neuronas piramidales de las capas V y II-III en áreas corticales, tales como la corteza RSGb, PrL y M2. Para determinar si la atrofia dendrítica inducida por flx se correlaciona con cambios en las espinas dendríticas, se evaluó su densidad y la morfología.

### ***2.2.- Cambios en la densidad y morfología de las espinas dendríticas.***

Para evaluar los efectos de la administración prolongada de flx sobre las espinas dendríticas se analizó la densidad y la morfología de las espinas a lo largo de un segmento dendrítico de neuronas piramidales de la capa V de las cortezas RSGb y PrL y de neuronas piramidales de la capa II-III de la corteza M2 (**Figura 15**). Los resultados obtenidos indican que flx indujo un aumento en la densidad de espinas en dendritas primarias en RSGb y M2, debido principalmente a un mayor número de espinas en los segmentos más distales del soma (**Figura 15A**), mientras no se observaron cambios en la PrL. En dendritas secundarias, flx sólo aumentó la densidad de espinas en RSGb (**Figura 15B**).



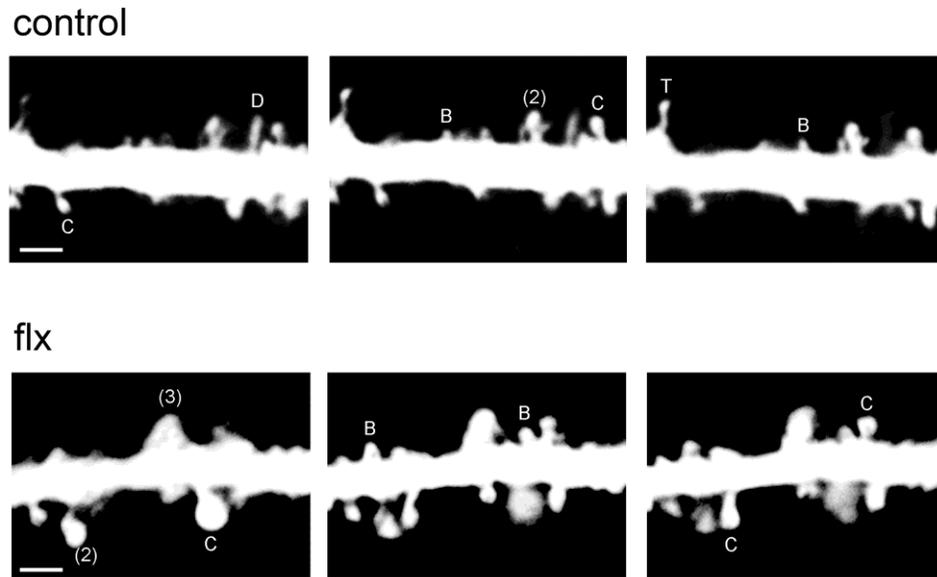
**Figura 15. Fluoxetina aumenta la densidad de espinas en dendritas primarias y secundarias de neuronas de distintas áreas corticales.** A) Cuantificación del numero de espinas a lo largo de la dendrita apical medido cada 8  $\mu\text{m}$  desde el soma. B) Densidad de espinas en dendritas primarias y secundarias para cada una de las áreas corticales analizadas. Los valores representan la media  $\pm$  EE. Número de segmentos analizados en cada uno de las condiciones: **control**: RSGb: primaria n=14, secundaria n=11; PrL: primaria n=16, secundaria n=10, M2: primaria n=13, secundaria n=12. **Flx**: RSGb: primaria n=19, secundaria n=11; ; PrL: primaria n=28; , secundaria n=18. n=11; ; M2: primaria n=12, secundaria: n=14. Se determinó significancia estadística mediante la Prueba de Mann-Whitney, \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ .

Habiendo determinado que flx aumentó la densidad de espinas en la corteza RSGb y M2, pero no en PrL, se analizó si flx indujo cambios en la morfología de las espinas. Para esto, las espinas presentes en dendritas primarias y secundarias de las mismas áreas

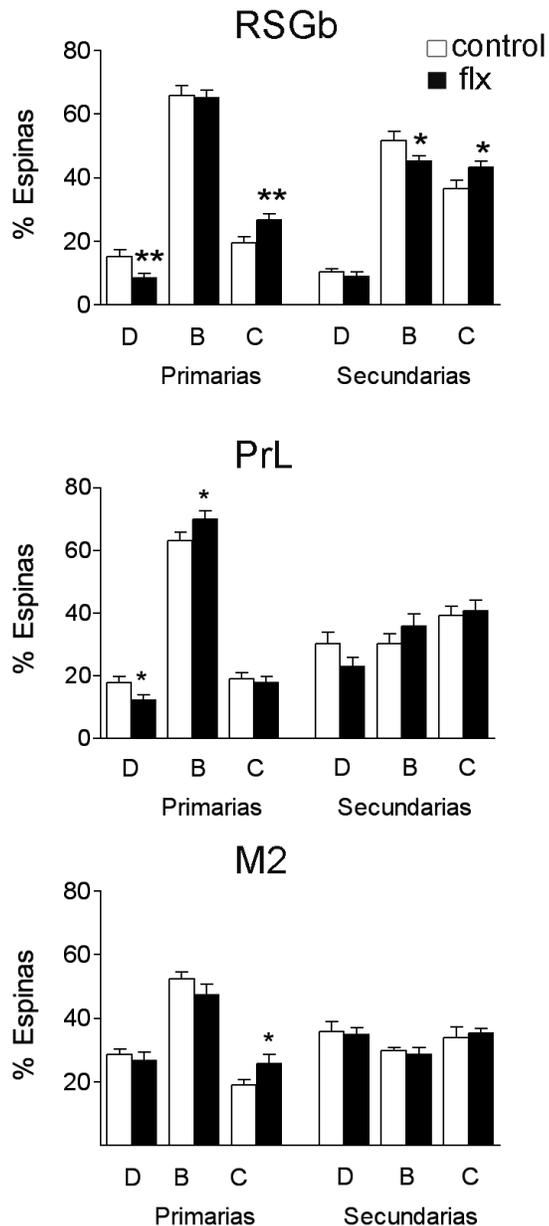
corticales (RSGb, PrL y M2) fueron clasificadas según su morfología en tipo callampa (C), delgada (D) y botón (B) (**Figura 16**). En dendritas primarias de las cortezas RSGb y M2, flx aumentó el porcentaje de espinas tipo callampa (**Figura 17**) mientras disminuyó el porcentaje de espinas delgadas en RSGb y PrL. En dendritas secundarias, flx sólo aumentó significativamente las espinas tipo callampa en RSGb. No se observaron cambios en el porcentaje de espinas en dendritas secundarias en PrL o M2.

También evaluamos si flx induce cambio en la capa II-III de la corteza PrL. Flx disminuyó la densidad de espinas en dendritas secundarias (**Figura 18A**), observándose resultados similares a los obtenidos en la capa V (**Figura 18B**).

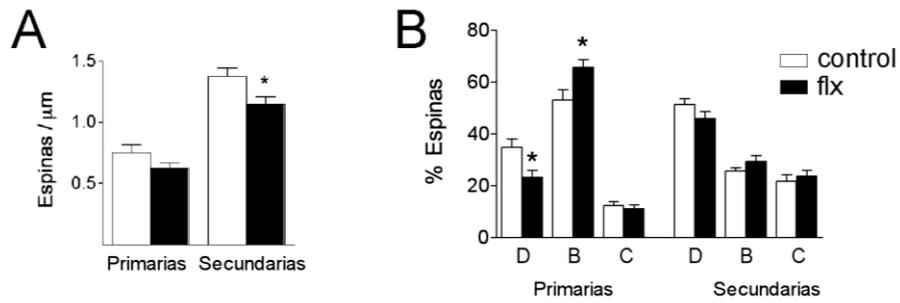
Para determinar si la administración prolongada de flx induce cambios en el estado maduración de las espinas dendríticas en el hipocampo, se midió la densidad y la morfología de las espinas en dendritas apicales en el área CA1. Se seleccionaron segmentos de 50  $\mu\text{m}$  de dendritas localizadas a menos de 50  $\mu\text{m}$  desde el soma (dendritas proximales) y de dendritas a distancias mayores de 100  $\mu\text{m}$  desde el soma (dendritas distales) (**Figura 19**). Flx aumentó la densidad de espinas en dendritas proximales y distales (**Figura 20 A y B**). Sin embargo, sólo se observaron diferencias significativas en la morfología de espinas en los segmentos de dendritas proximales. En éstos, flx aumentó el porcentaje de espinas tipo callampa, mientras disminuyó el porcentaje de espinas tipo delgada y botón (**Figura 20 C**).



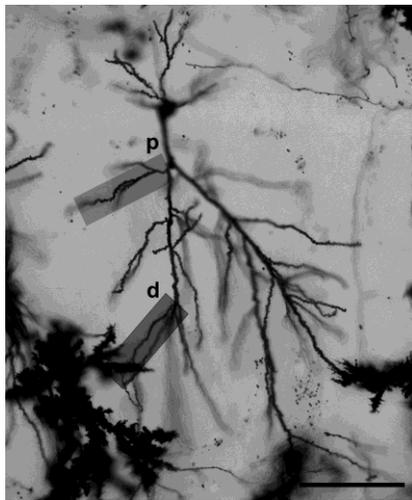
**Figura 16. Microfotografía de segmentos de dendrita apical de neuronas piramidales de la corteza.** Imágenes representativas de un segmento de dendrita apical de neuronas corticales impregnadas mediante el método de Golgi tomadas en 3 planos focales distintos. Se muestran imágenes de segmentos obtenidos desde una neurona cortical de una rata control y tratada con flx. Las espinas fueron clasificadas en 3 categorías: filopodia/delgada (D), botón (B) y callampa (C). Los números entre paréntesis indican espinas superpuestas que fueron resueltas por observación a diferentes planos focales: (2) una delgada y una callampa, (3) una delgada, una botón y una callampa. Barra de longitud 1  $\mu\text{m}$ .



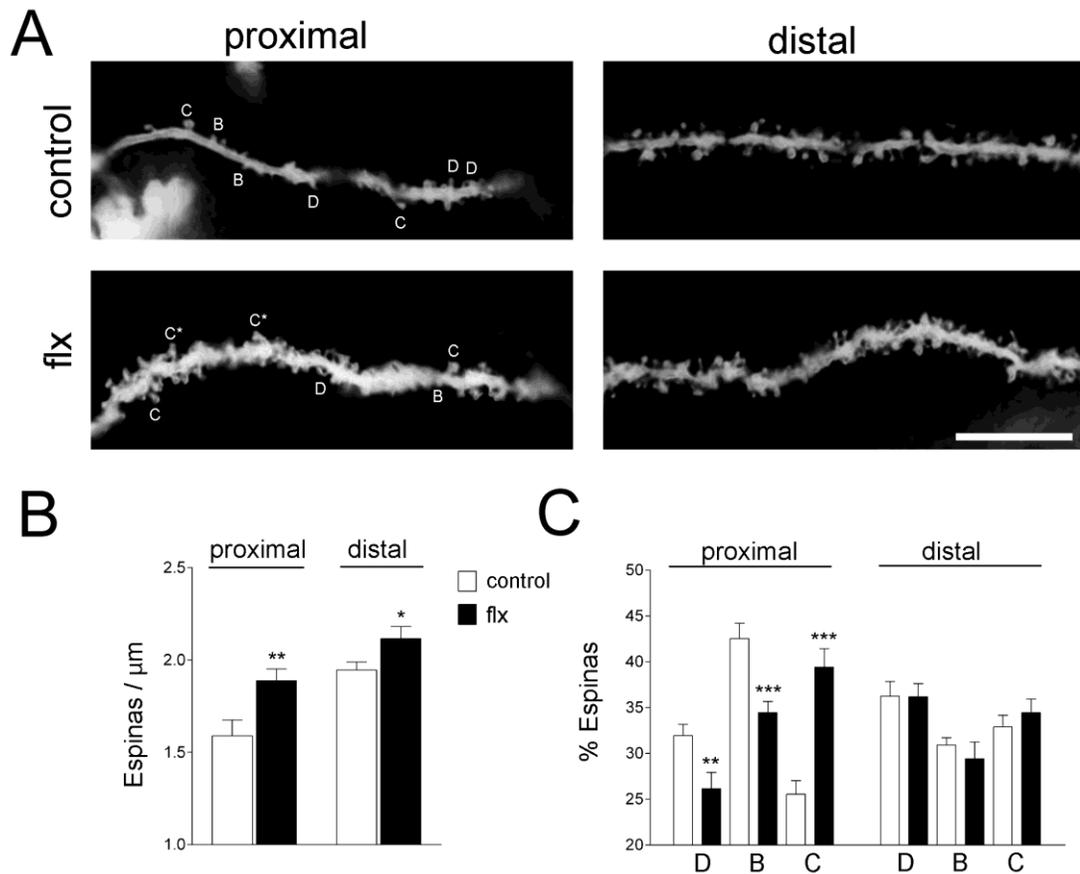
**Figura 17. Fluoxetina aumenta el porcentaje de espinas dendríticas maduras/grandes.** Porcentaje de tipos de espinas dendríticas: D: delgada, B: botón, C: callampa. Los valores representan el media  $\pm$  EE. Número de segmentos analizados por condición: **control**: RSGb: primaria n=14, secundaria n=11; PrL: primaria n=16, secundaria n=10; M2: primaria n=13, secundaria n=12. **Flx**: RSGb: primaria n=19, secundaria n=11; PrL: primaria n=28; , secundaria n=18. n=11; M2: primaria n=12, secundaria: n=14. Se determinó significancia estadística mediante la Prueba de Mann-Whitney, \*=p < 0,05, \*\*=p < 0,01.



**Figura 18. Fluoxetina disminuye la densidad de espinas y el porcentaje de espinas maduras en la corteza PrL II-III.** A) Densidad de espinas en dendritas primarias y secundarias. B) Tipos de espinas dendríticas en dendritas primarias y secundarias. Los valores representan la media  $\pm$  EE. Número de segmentos analizados: **control**: primaria n=18, secundaria n=7 y **flx**: primaria n=19; , secundaria n=12. Se determinó significancia estadística mediante la Prueba de Mann-Whitney, \* $p < 0,05$ .



**Figura 19. Microfotografía representativa de una neurona piramidal de área CA1 del hipocampo.** Se indica la posición relativa de los segmentos seleccionados, proximales ( $< 50 \mu\text{m}$ ) y distales ( $> 100 \mu\text{m}$ ) del soma de la neurona. Barra=  $50 \mu\text{m}$ .



**Figura 20. Fluoxetina aumenta la densidad y el porcentaje de espinas dendríticas maduras/grandes en dendritas de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.** A) Imágenes representativa de un segmento de dendrita secundaria proximal y distal desde el soma neuronal de neuronas de CA1 impregnadas mediante el método de Golgi en ratas control y tratadas con flx. Las espinas fueron clasificadas en 3 categorías: filopodio/delgada (D), botón (B) y callampa (C). Se observan espinas superpuestas C\*: una espina tipo callampa más una espina tipo delgada. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . B) Densidad de espinas en un segmento dendrítico de 50  $\mu\text{m}$  de dendritas proximales y distales al soma. C) Porcentaje del tipo de espinas dendrítica en segmentos proximales y distales del soma. Los

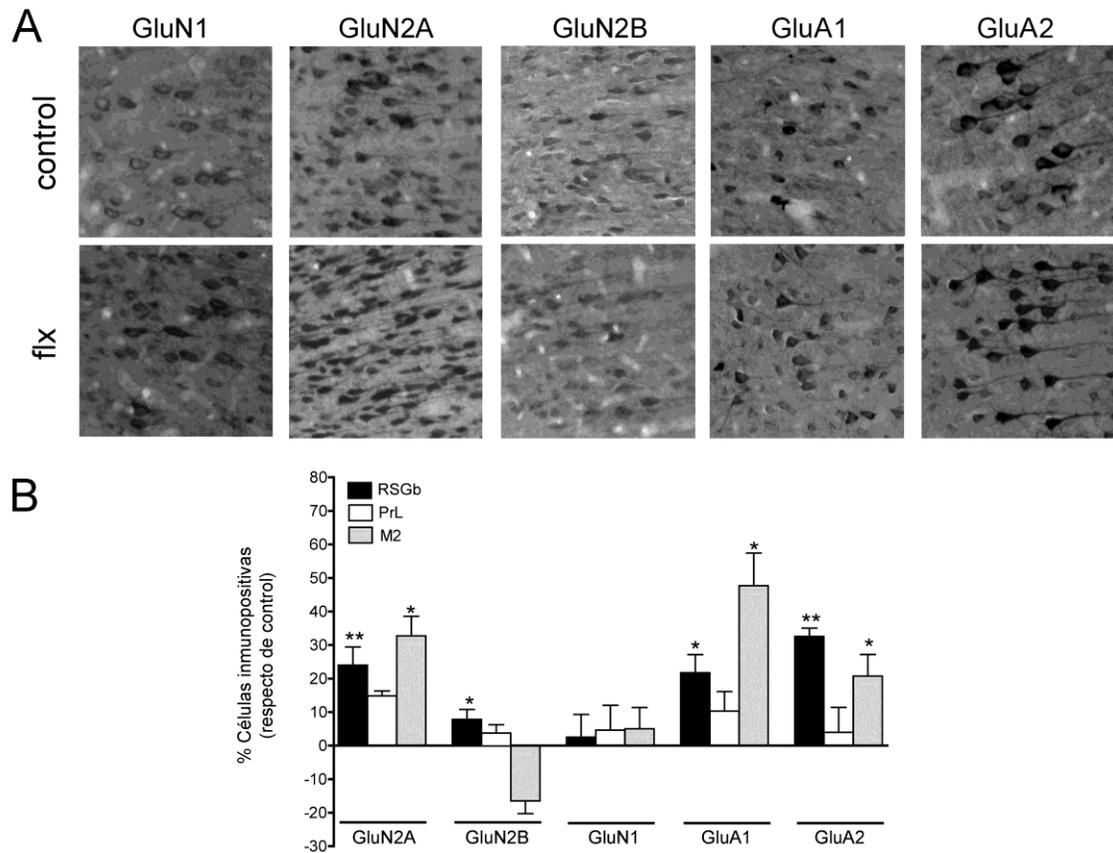
valores representan la media  $\pm$  EE. **control:** Proximal: n=11, distal n=11; **flx:** proximal: n=11; distal: n=10. Se determinó significancia estadística mediante la Prueba de Mann-Whitney, \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ .

Habiendo mostrado que la administración durante 4 semanas de flx 0,7 mg/kg aumentó la densidad de espinas en dendritas primarias y/o secundarias en diversas áreas telencefálicas, efecto que se correlacionó con un aumento en el porcentaje de espinas tipo callampa (RSGb, M2 e Hipocampo) o una disminución de las espinas tipo delgadas (RSGb, PrL capa V y capa II-III e Hipocampo), se confirma la hipótesis que flx induce cambios en la sinapsis glutamatérgicas telencefálicas. Posteriormente, evaluamos si el aumento en la presencia de espinas maduras se correlacionó con cambios en las subunidades de los R-AMPA y R-NMDA en neuronas glutamatérgicas telencefálicas.

**3.-Determinar si la administración prolongada de flx regula los niveles de subunidades del R-NMDA (GluN1, GluN2A y GluN2B) y del R-AMPA (GluA1 y GluA2).**

***3.1.- Cambios en los niveles de expresión de las subunidades del RNMDA y del R-AMPA.***

Se detectaron mediante inmunohistoquímica las subunidades para los R-NMDA (GluN1, GluN2A y GluN2B) y para los R-AMPA (GluA1 y GluA2). Se cuantificó el número de células inmunopositivas para cada una de estas proteínas en la corteza RSGb, PrL y M2 (**Figura 21A**). En el esquema resumen se observa que flx aumentó el número de células inmunopositivas para GluN2A, GluA1 y GluA2 en la capa V de la corteza RSGb y en la capa II-III de la corteza M2 (**Figura 21B**). No se observaron diferencias significativas en el número de células inmunopositivas para ninguna de las subunidades analizadas en la corteza PrL (**Figura 21B**).



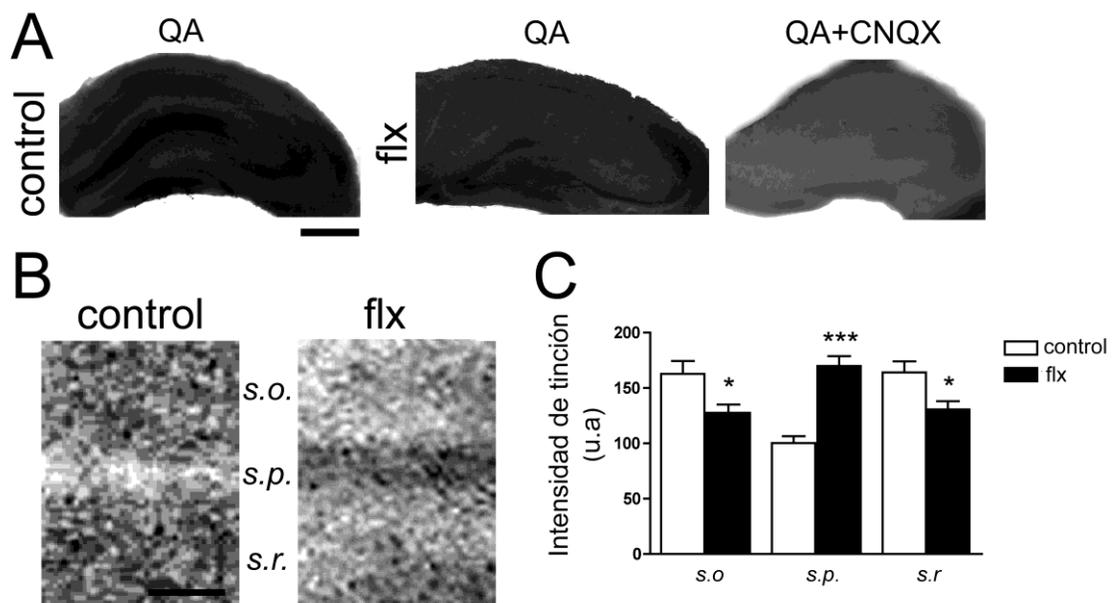
**Figura 21. Fluoxetina modula la expresión de las subunidades del R-NMDA y del R-AMPA en la corteza cerebral.** Determinación del número de células inmunopositivas para las subunidades R-NMDA (GluN2A, GluN2B, GluN1) y R-AMPA (GluA1 y GluA2) A) Microfotografías representativas de secciones coronales de la corteza RSGb para cada una de las subunidades. B) Esquema resumen de los porcentaje de cambio con respecto a control de las distintas subunidades de RNMDA y RAMPA. Se analizaron entre 3-5 secciones por condición. Los valores representan la media  $\pm$  EE. **RSGb**: GluN2A n=5 (control), n=4 (flx); GluN2B n=9 (control), n=6 (flx); GluN1 n=7(control), n=8(flax); GluA1 n=4(control), n=3(flax); GluA2 n=5(control), n=4 (flx). **PrL**: GluN2A n=3 (control), n=3 (flx); GluN2B n=6 (control), n=6 (flx); GluN1 n=4(control), n=4(flax); GluA1 n=4(control), n=3(flax); GluA2

n=5(control), n=4 (flx). **M2:** GluN2A n=4 (control), n=3(flx); GluN2B n=4 (control), n=4(flx); GluN1 n=3(control), n=3(flx); GluA1 n=3(control), n=3(flx); GluA2 n=3 (control), n=3 (flx). Se determinó significancia estadística mediante la Prueba de Mann-Whitney, \*=p <0,05; \*\*= p<0,01.

### **3.2.- Cambios funcionales de las subunidades del R-AMPA.**

Al igual que en distintas áreas corticales analizadas, flx aumentó la expresión de la subunidad GluA2 en el hipocampo (ver **Apéndice II**). Estos cambios en la expresión de las subunidades de los R-NMDA y R-AMPA sugieren que flx modifica el estado de maduración de las sinapsis glutamatérgicas en distintas áreas telencefálicas. Para comprobar si el aumento en el número de células inmunopositivas para GluA2 se correlaciona con la presencia funcional de GluA2 en los R-AMPA de la membrana celular se realizó la tinción de cobalto. Los R-AMPA fueron estimulados con ácido quisquálico, manteniendo todos los otros canales permeables a calcio bloqueados. Los resultados obtenidos de este ensayo funcional muestran que flx disminuyó la intensidad de tinción (del precipitado de cobalto) en los *stratum oriens* (control:  $163 \pm 12$ ; flx:  $127 \pm 7$ ;  $p < 0.05$ ) y *stratum radiatum* (control:  $164 \pm 10$ ; flx:  $131 \pm 8$ ;  $p < 0.05$ ) mientras aumentó en el *stratum pyramidale* (control:  $100 \pm 6$ ; flx:  $170 \pm 9$ ;  $p < 0.001$ ) del área CA1 (**Figura 22B**). Esto sugiere que las dendritas de las neuronas piramidales que se ubican en esta zona contienen R-AMPA con mayor proporción de GluA2, confiriéndole menor permeabilidad al calcio, mientras el soma contiene R-AMPA con mayor proporción de GluA1. Para comprobar la especificidad del influjo de cobalto a

través de R-AMPA, éstos se bloquearon con CNQX, lo que eliminó completamente la tinción, descartando la participación de otros canales iónicos en el efecto observado.



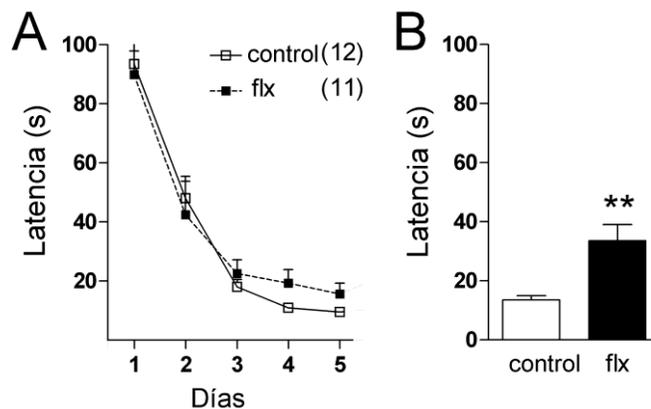
**Figura 22. Fluoxetina aumenta la presencia de R-AMPA conteniendo la subunidad GluA2.** A) Microfotografías representativas de rebanadas de hipocampo incubadas con el agonista para R-AMPA ácido quisqualico (QA). Como control negativo se bloquearon los R-AMPA con CNQX. B) Imágenes representativas de los segmentos analizados indicando la ubicación de los estratos del área CA1 del hipocampo. C) Gráfico de intensidad de tinción en *stratum radiatum* (s.r), *stratum pyramidale* (s.p.) y *stratum oriens* (s.o.) Se representan los percentiles 25, 75, mínimo y máximo y la media. Se determinó significancia estadística mediante la Prueba de Mann-Whitney, considerando significancia estadística, \*=p <0,05.

La administración prolongada de flx 0,7 mg/kg indujo cambios en la morfología y en la composición de los receptores glutamatérgicos. Estos cambios podrían producir alteraciones en funciones cognitivas como memoria y aprendizaje, especialmente si se piensa que las dendritas más maduras, ricas en GluN2A y GluA2 han sido reportadas como más estables (Haas y cols., 2006; Alvarez y Sabatini, 2007; Gambrill y Barria, 2011). Para contestar esta pregunta, se realizaron distintas pruebas conductuales que evalúan memoria dependiente de hipocampo (Laberinto de Morris), parcialmente dependiente del hipocampo (reconocimiento de objeto novedoso) y memoria aversiva dependiente de hipocampo y amígdala (evitación pasiva). Además, en estas pruebas fue posible evaluar memoria a corto plazo y memoria remota o de largo plazo.

**4.- Determinar si la administración prolongada de flx induce alteraciones en procesos de memoria/aprendizaje.**

**4.1.- Prueba Water Morris.**

La primera prueba conductual realizada fue la Prueba del Laberinto de Morris. Similares curvas de aprendizaje se observan en ratas sal y flx (**Figura 23A**). Sin embargo, las ratas tratadas con flx muestran un deterioro en la memoria remota evaluada 17 días después de la última sesión de entrenamiento (sal=13,27 ± 1,56 n=12; flx=33,54 ± 5,53; n=11, p=0,002) (**Figura 23 B**).



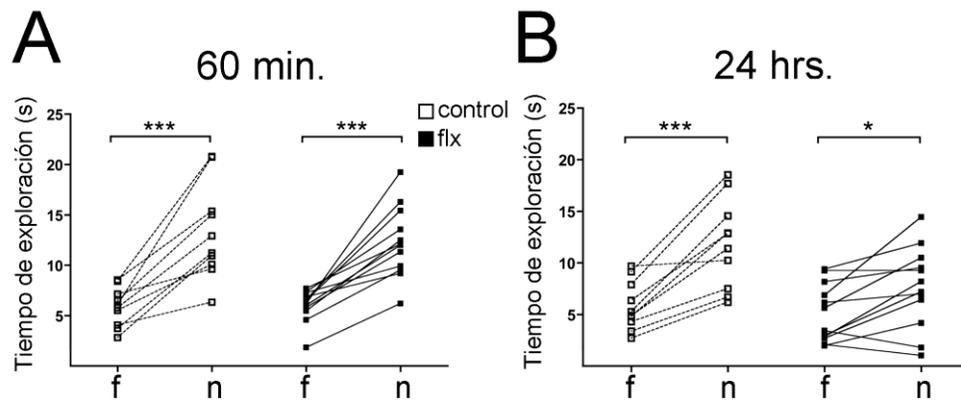
**Figura 23. Fluoxetina induce un déficit en la memoria espacial remota.** En la Prueba del Laberinto de Morris se midió la latencia, tiempo que demora la rata en alcanzar una plataforma escondida. A) Curva de aprendizaje de las ratas durante los 5 días de entrenamiento. Análisis estadístico de la curva de aprendizaje, modelo mixto de medidas repetidas. B) Latencia observada en una prueba única 17 días después de finalizada la etapa de aprendizaje. Análisis estadístico de la latencia en (B) t-de Student. Los valores representan la media ± EE, significancia estadística \*\*p<0.01.

La prueba del Laberinto de Morris mide memoria espacial dependiente de hipocampo. Esta es una prueba aversiva para el animal, ya que para su desarrollo hay que introducirlo a una piscina con agua. Con el objetivo de evaluar memoria dependiente de otras estructuras corticales además del hipocampo como la corteza prefrontal, y menos aversiva, se realizó la Prueba de Reconocimiento de Objetos Novedoso.

#### ***4.2.- Prueba de Reconocimiento de Objeto Novedoso.***

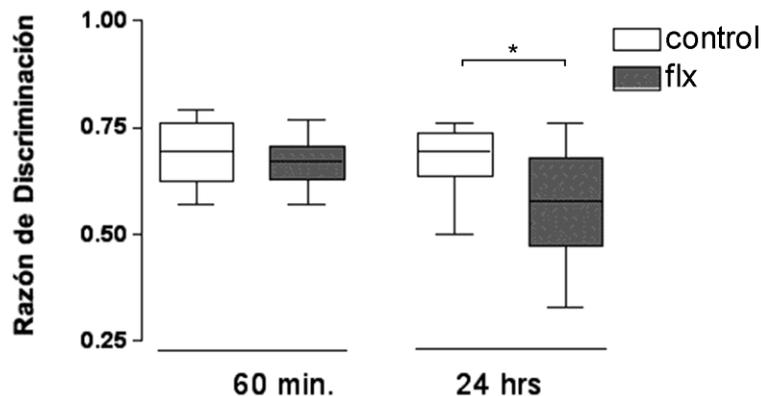
La Prueba de Reconocimiento de objeto se basa en el comportamiento etológico de los roedores a utilizar más tiempo en explorar un objeto novedoso que uno familiar. La memoria de reconocimiento de objeto puede ser relacionada con memoria episódica y a diferencia de otras pruebas de memoria, no es dependiente del estado de motivación o del condicionamiento con refuerzos positivos (comida) o negativos (shock eléctrico) (Ennaceur y Delacour, 1988), por lo que ha sido ampliamente utilizada para evaluar memoria en roedores. Se midió en ratas controles y tratadas con flx el tiempo que el animal utilizó en explorar un objeto novedoso y uno familiar. La prueba se realizó 60 minutos (memoria a corto plazo) o 24 hrs. (memoria a largo plazo) después de la última sesión de entrenamiento. Cuando se evaluó memoria a corto plazo, esto es medido a 60 minutos después, ambas condiciones experimentales las ratas gastan más tiempo explorando el objeto novedoso que el familiar (control: familiar=5,77±0,66; novedoso=13,16±1,52 /flx: familiar=5,78±0,44; novedoso=12,21±1,02). Sin embargo, cuando se evaluó memoria a largo plazo, esto es 24 hrs después, se observó una disminución del tiempo gastado en explorar el objeto novedoso (control: familiar=5,92±0,8; novedoso=12,43±1,5;  $p < 0,001$  /

flx: familiar=5,90±0,9; novedoso=7,87±1,2; p<0,05). Esto quiere decir que la rata no es recuerda el objeto familiar, lo que le impide discriminar entre el familiar y el novedoso.



**Figura 24. Efecto de fluoxetina sobre la memoria de reconocimiento de objetos.** Se muestra el tiempo de exploración total en el objeto familiar (f) y el objeto novedoso (n) en cada uno de los, después de 60 min (memoria a corto plazo) y después de 24 hrs. del entrenamiento (memoria remota). Grupos de animales control n=10 y flx n=12. Los datos se analizaron mediante una prueba de t pareada, considerando significancia estadística \*p<0.05.

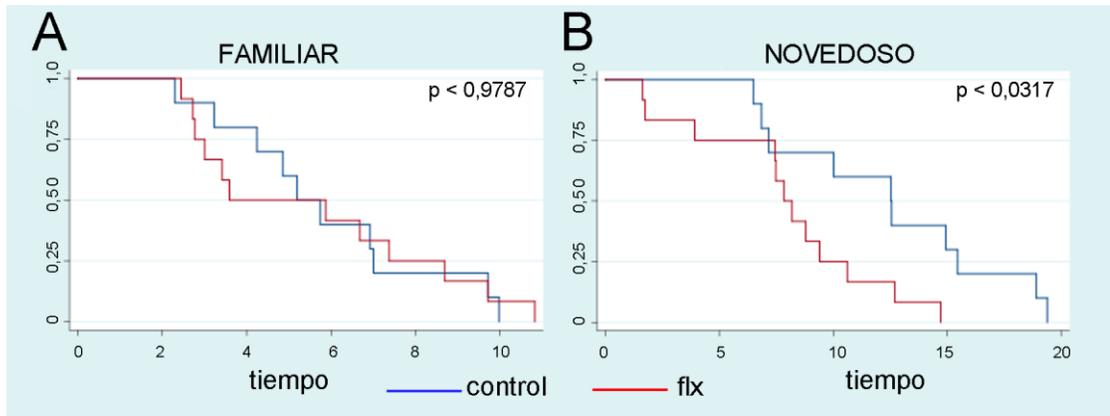
Para comparar los resultados entre los grupos de ratas control y flx, éstos fueron normalizados mediante el calculo de la razón de discriminación (RD: tiempo objeto novedoso/tiempo total). Utilizando esta medida tampoco se encontraron diferencias entre las ratas control y las tratadas con flx a los 60 minutos (RD 60 min.: control: 0,688 ± 0,02; flx 0,671 ± 0,02; p=0,555) pero si a las 24 hrs. después de la última sesión de entrenamiento (RD 24 hrs.: control: 0,678 ± 0,02; flx 0,571 ± 0,04; p=0,036) (**Figura 25**).



**Figura 25. Fluoxetina disminuye el tiempo de exploración del objeto novedoso.** Se determinó la razón de discriminación (tiempo novedoso/tiempo total) de los tiempos de exploración para cada uno de los ensayos, después de 60 min. del entrenamiento (memoria corto plazo) y 24 hrs. después del entrenamiento (memoria remota). Grupos de animales control n=10 y flx n=12. Los datos se analizaron mediante una prueba de t de Student, considerando significancia estadística \*p<0.05.

La normalización de la variable tiempo implica la disminución de la variabilidad de los datos y en el caso de la razón de discriminación, el tiempo total gastado varía entre los grupos control y flx, ya que está cambiando el tiempo gastado en explorar el objeto novedoso (control: 18,35 s; flx: 13,77 s). Para poder corroborar que la diferencia entre los grupos control y flx tiene significancia estadística realizamos un análisis de curvas de Kaplan-Meier. En estas curvas se representa la frecuencia acumulada en relación al tiempo utilizado en el reconocimiento del objeto familiar o novedoso. En el gráfico podemos ver que en la prueba de memoria a largo plazo, las curvas de sobrevividas del tiempo utilizado en reconocimiento del objeto familiar son semejantes en ambos grupos experimentales

(Figura 26A), mientras las de reconocimiento del objeto novedoso son diferentes entre ellos ( $p < 0,0317$ ). (Figura 26B).

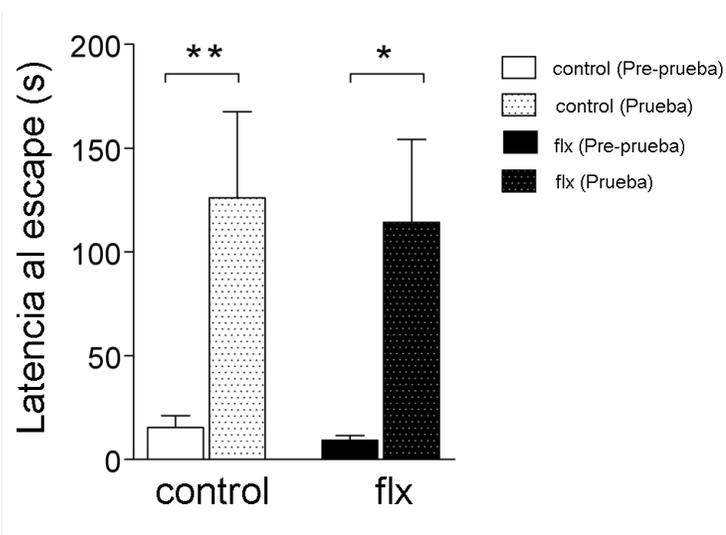


**Figura 26. Fluoxetina disminuye el tiempo de exploración del objeto novedoso. Curva de Kaplan-Meier.** Curva del tiempo utilizado en explorar el objeto familiar (A) y el novedoso (B) 24 hrs. después del entrenamiento. Grupos experimentales, control,  $n=12$  y flx,  $n=10$ . Los datos fueron evaluados mediante el análisis de curvas de Kaplan-Meier, considerando significancia estadística  $*p < 0.05$ .

Los resultados obtenidos muestran que la administración por 4 semanas de flx 0,7 mg/kg produce el deterioro de la memoria remota dependiente (Laberinto de Morris) y parcialmente dependiente (reconocimiento de objeto) del hipocampo. Para evaluar si flx afecta memoria que se sabe depende principalmente de estructuras adicionales, como la amígdala, se realizó la Prueba de Evitación Pasiva.

#### 4.3.- Prueba de Evitación Pasiva.

Al realizar esta prueba, los resultados muestran que flx no modifica la latencia al escape (Figura 27), sugiriendo que los circuitos neuronales comprometidos en esta tarea, y que incluyen la amígdala, no están afectados por administración prolongada de flx a animales naïve.



**Figura 27. Fluoxetina no modifica la latencia al escape en la prueba de evitación pasiva.** En la prueba de evitación pasiva, se mide la latencia al escape hacia el compartimiento oscuro antes (pre-prueba) y después (prueba) de un shock eléctrico en ratas control y flx. Pre-prueba: latencia a la entrada al compartimiento oscuro antes del shock (día 1). Los datos representan el promedio de la latencia en las 3 sesiones antes del shock. Prueba: Latencia a entrada al compartimiento oscuro 24 hrs. después de recibir 1 shock eléctrico (día2). Los datos representan la latencia al escape observada en una única prueba (día 2). control (n=11), flx (n=12). Los valores representan la media  $\pm$  EE. Se determinó significancia estadística de los grupos experimentales mediante una prueba de t-Student, \* $p < 0,05$ ; \*\* $< 0,01$ .

## **Capítulo 6**

---

### **Discusión**

Los principales resultados de esta tesis indican que los efectos conductuales que inducen dos modelos de estrés repetido, restricción e inmovilización, son diferencialmente revertidos por flx y rbx, respectivamente. Además, se observó que sólo la dosis baja de flx fue efectiva en disminuir la desesperanza en ratas naïve y en restricción, lo que sugiere que este efecto puede estar mediado por cambios en la neurotransmisión glutamatérgica. Para estudiar estos cambios, se administró durante 28 días flx 0,7 mg/kg a ratas naïve. Flx indujo los siguientes efectos: i) retracción dendrítica, ii) aumento en la densidad y en el porcentaje de espinas de mayor tamaño, iii) cambios en los niveles de algunas subunidades de receptores glutamatérgicos. Estos efectos se correlacionaron con un deterioro en la memoria remota o de largo plazo. Todos estos resultados sugieren que flx modula, además de los circuitos neuronales implicados en las conductas depresivas, circuitos relacionados con procesos de memoria y aprendizaje.

#### **1.-Modelos animales de depresión.**

A pesar de las limitaciones que tiene la utilización de modelos animales en el estudio de la depresión, éstos constituyen una aproximación valiosa para el estudio preclínico de la patología, ya que presentan las siguientes ventajas: i) permiten el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la depresión, ii) permiten la manipulación farmacológica con drogas nuevas o ya disponibles, iii) los resultados obtenidos con ellos se

pueden reproducir en otros laboratorios y iv) permiten manipulaciones que por motivos éticos no se pueden realizar en humanos. Como se mencionó en la introducción, se utilizan protocolos muy diferentes para inducir síntomas depresivos, que en su gran mayoría utilizan la exposición a estrés repetido, siendo el estresor de naturaleza variable. En esta tesis, se empleó la reducción de movimientos mediante dos procedimientos diferentes ya que en la literatura no encontramos estudios que comparen su eficacia. Más aún, aparentemente son utilizados como equivalentes. Por consiguiente, los resultados obtenidos se tienden a generalizar (Buynitsky y Mostofsky, 2009). Un problema adicional en cuanto a la generalización es que diferentes cepas de ratas y ratones presentan diferencias de sensibilidad al estrés (Pare, 1990; O'Mahony y cols., 2011). Como ejemplo de ello, ratas Wistar-Kyoto presentan una mayor incidencia de los síntomas depresivos comparado con las ratas Sprague-Dawley cuando se someten a estrés por restricción (O'Mahony y cols., 2011). Más aún, la mayoría de los estudios que utilizan la inmovilización como modelo de estrés crónico, lo realizan con ratas Wistar (Vyas y cols., 2002; Mitra y cols., 2005), mientras en los estudios que emplean la restricción como modelo de estrés utilizan ratas Sprague-Dawley (McLaughlin y cols., 2007; Liston y cols., 2006; Hajszan y cols., 2009). Es probable que las diferencias en la sensibilidad al estrés en las cepas pueda deberse a diferencias endógenas en la neurotransmisión dopaminérgica, serotoninérgica (Tejani-Butt y cols., 1994; Pare y Tejani-Butt, 1996) o GABAérgica (O'Mahony y cols., 2011). Por estas razones, era necesario realizar un estudio comparativo de ambos protocolos de estrés en una misma cepa de rata. Por ello, aplicando ambos procedimientos se evaluaron los síntomas depresivos, que efectivamente se indujeron en ambos casos. Posteriormente, se evaluó el efecto de FADs tanto en animales naïve como estresados.

## **2. Efecto de la administración de fluoxetina y reboxetina sobre las conductas depresivas.**

### ***2.1.-Efecto en animales naïve***

En los animales naïve fueron evaluados desesperanza y ansiedad, de manera similar a los estresados. Sin embargo, sólo flx fue efectiva en disminuir la desesperanza aprendida. Lo que está de acuerdo con antecedentes previos (Hirano y cols. 2005, Cryan y cols., 2005). En cuanto a rbx, no existen antecedentes en la literatura sobre el efecto de la administración prolongada de este FAD en ratas naïve y a las dosis utilizadas en esta tesis. Dosis mayores, entre 10 a 60 mg/Kg, muestran que 14 días de tratamiento disminuye la inmovilidad en la prueba de la natación forzada (Cryan y cols., 2005). Ninguna de las concentraciones de flx o rbx fueron efectivas en disminuir la ansiedad. Sin embargo, esto puede ser debido al método estadístico empleado. El análisis de componentes principales recapitula la información recogida por distintas variables en un menor número de dimensiones. Según este procedimiento, es posible que un porcentaje de la información se pierda, ya que sólo se eligen los componentes que explican la máxima variación de los datos originales, descartando los otros. Adicionalmente, un problema inherente al método es que si falta información de una de las pruebas en un animal, este dato se pierde, reduciendo el n final. Es por esto que, si realizamos un análisis para una prueba en particular, por ejemplo NSF, podemos ver cómo la dosis de flx 0,7 mg/kg sí es capaz de disminuir la ansiedad de ratas naïve (Ampuero y cols., 2010). A pesar de esta limitante, el análisis por componentes principales es un método que permite la comparación de una gran cantidad de variables

por lo que es frecuentemente usado para analizar datos conductuales (Colomb y cols., 2012).

## ***2.2.- Efecto de FADs en modelos animales de estrés.***

En esta tesis se mostró que 10 días de estrés son suficientes para inducir síntomas depresivos en ambos modelos de estrés. Estos resultados están de acuerdo con publicaciones anteriores en que se utiliza 10 días de estrés por restricción (Dagnino-Subiabre y cols., 2005) o por inmovilización (Christian y cols., 2011). De la misma manera, después de 28 días de estrés, también se inducen síntomas depresivos como aumento de la ansiedad y la desesperanza. Los resultados obtenidos muestran que la reversión de los síntomas depresivos por la administración de FAD es un dosis dependiente. Las menores dosis utilizadas, esto es flx (0,7 mg/kg) y rbx (0,13 mg/kg), pero no las mayores, fueron efectivas en disminuir la ansiedad y la desesperanza aprendida en los modelos de estrés. Con respecto a flx, gran cantidad de trabajos utilizan dosis mayores en ratas (5-20 mg/kg). La utilización de estas dosis se basan en la menor vida media de flx en ratas comparadas con humanos (Alvarez y cols., 1998). Adicionalmente, Cryan y Lucki (2000) contribuyeron a esta idea, ya que mostraron que sólo altas dosis de flx (20 mg/kg) eran efectivas en disminuir la inmovilidad en el FST (Cryan y Lucki, 2000). Estos resultados llevaron a que la mayoría de los trabajos utilizaran dosis exageradas de éste y otros FADs. Contrariamente, Caccia y cols. (1990) mostraron que en ratas, flx y su metabolito, norfluoxetina, se acumulaban hasta 40 veces en cerebro comparado con plasma (Caccia y cols., 1990) y que la administración de 25 mg/kg de flx provoca la muerte de 80% de los animales al noveno

día de tratamiento (Caccia y cols., 1997). Mas aún, una publicación del laboratorio muestra que 0,7 mg/kg de flx es suficiente para alcanzar concentraciones plasmáticas compatibles con la eficacia terapéutica, según lo reportado en humanos (Charlier y cols., 2000; Wyneken y cols., 2006). Dosis de flx similares a las utilizadas por nosotros también han sido empleadas por otros autores (Stewart y Reid, 2000; Contreras y cols., 2001; Rodríguez-Landa y cols., 2003; Wyneken y cols., 2006). Con respecto a rbx, al igual que flx, la dosis utilizada de este FAD en esta tesis es menor a la utilizada en la literatura (10-15 mg/kg) (Page y Lucki, 2002; Grappi y cols., 2003; Kosten y cols., 2008). No existen estudios conductuales del efecto de rbx a dosis relacionadas con la terapéutica en humanos. Sin embargo, en Wyneken y cols., (2006) también se muestra que tras la administración prolongada de esta dosis se inducen cambios en la señalización de la neurotrofina BDNF y su receptor TrkB, lo que es compatible con su eficacia terapéutica. Basados en este antecedente, la selección de las dosis de rbx de 0,13 mg/kg y 0,65 mg/kg estaba de acuerdo con los efectos conductuales observados.

### ***2.3.- Fluoxetina y reboxetina revierten diferencialmente los síntomas depresivos inducidos por restricción e inmovilización, respectivamente.***

Después de 10 días de estrés repetido, no se observaron diferencias en los niveles de ansiedad y desesperanza aprendida entre la restricción y la inmovilización. Este resultado nos llamó la atención pues parecía obvio que la inmovilización fuera más aversiva que la restricción. En ese sentido, en un estudio posterior se evaluaron otros síntomas depresivos que podrían dar cuentas de diferencias sutiles entre los modelos. Para esto

evaluamos anhedonia, encontrando que está aumentada en inmovilización comparada con restricción (datos del laboratorio no publicados). Otro de los parámetros que muestran diferencias entre los dos modelos empleados fue el peso de las glándulas adrenales. A pesar de que un aumento de éstas se observa tanto en restricción e inmovilidad, esta última induce un aumento significativamente mayor del tamaño de las glándulas comparado con restricción. Las diferencias en el peso de la glándula adrenal entre restricción e inmovilidad no se explican por diferencias en el peso de los animales. En concordancia con este resultado, el estrés por restricción no aumenta la secreción de corticoesterona (Marin y cols., 2007), mientras la inmovilización sí lo hace (Almeida y cols., 1998). Considerando estos antecedentes, podemos concluir que al menos en lo que se refiere a anhedonia y secreción de corticoesterona, los efectos inducidos por inmovilización son diferentes a los inducidos por restricción. Además, el aumento de corticoesterona podría alterar algunos de los circuitos neuronales implicados en la regulación de los síntomas depresivos, lo que podría explicar la respuesta diferencial de los fármacos utilizados en este trabajo. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, en un trabajo publicado recientemente, rlx pero no flx fue efectiva en disminuir el aumento en la ansiedad inducido por inmovilización (Lapmanee y cols., 2012).

Otro antecedente que apoya un efecto diferencial de los dos protocolos de estrés sobre el cerebro de ratas proviene del estudio en que se utilizó la expresión del marcador de actividad neural, c-fos. Así, la aplicación de una única sesión de restricción o inmovilización activó estructuras neuronales diferentes: la restricción aguda activó la corteza RSGb y la corteza medial Prefrontal (mPFC), mientras que la inmovilización aguda activó el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) (ver **figura 28** en Apéndice I). Una

activación de c-fos en la corteza RSGb también ha sido reportada después de estrés de sobrecarga o fatiga (Akazawa y cols., 2010). La reversión diferencial de las conductas depresivas por flx y rbx en ambos modelos de estrés, sugieren que los FADs utilizados ejercen una acción selectiva sobre las estructuras del SNC. En este sentido, se reportó que una dosis única de flx o rbx aumenta diferencialmente el número de células inmunopositivas para c-fos en la amígdala y en la corteza cingulada, respectivamente (Miyata y cols., 2005). Más aún, Barbon y cols., (2011) muestran que la administración crónica de flx o rbx induce la expresión diferencial de las subunidades de los R-AMPA en la corteza prefrontal y el hipocampo. Así, flx aumenta la expresión de la subunidad GluA2 y GluA4, mientras rbx aumenta la expresión de GluA1 y GluA3 (Barbon y cols., 2011). Otros antecedentes del efecto diferencial de los FADs provienen de los estudios donde se analizaban las conductas activas en la prueba de natación forzada (FST). En esta prueba, flx aumenta el nado mientras rbx aumenta el escape. Por ello, el nado ha sido asociado a la neurotransmisión serotoninérgica, mientras el escape ha sido asociado a la neurotransmisión noradrenérgica (Cryan y cols., 2002). En esta tesis se observó que en el FST, la inmovilidad inducida por restricción es revertida por flx debido a un aumento en el nado, mientras que en la inmovilización, ésta es revertida por rbx debido a un aumento en el escape. De este modo, podemos concluir que tanto en animales naïve como estresados, se observa un efecto diferencial a cada uno de los fármacos.

Esta la primera vez que se describe en la literatura que la administración prolongada de flx y rbx tienen un efecto diferencial sobre la reversión de síntomas depresivos inducidos por estrés por reducción de movimientos. La proyección clínica de este hallazgo es importante ya que existe una alta tasa de pacientes que no responden al

primer tratamiento farmacológico elegido ( $\approx 30\%$ ) (Gueorguieva y cols., 2011), lo que significa un problema para el paciente por el costo monetario, de tiempo y de las expectativas al tratamiento farmacológico. Por lo tanto, la identificación de marcadores biológicos que permitan determinar la eficacia farmacológica de un grupo de FADs disminuiría los problemas relacionados con la medicación.

#### ***2.4.- Implicancias de la reversión diferencial de los FADs y su relación con los subtipos de depresión.***

La depresión mayor es considerada un síndrome que presenta una gran diversidad de síntomas en forma variable entre los individuos. Esta característica ha hecho suponer que existen sub-tipos de depresión con bases neurobiológicas diferenciales. Sin embargo, el diagnóstico de la depresión mayor se realiza en base a la presencia de síntomas indicados en los manuales ICD-10 y DSM-IV-TR. En ellos se describen el descenso del ánimo y la anhedonia como síntomas esenciales de la depresión. Basado en estos manuales es posible determinar la existencia de al menos 2 subtipos de depresión: la depresión melancólica y la depresión atípica. En la depresión melancólica se pueden observar al menos 3 de los síntomas adicionales siguientes: exagerados sentimientos de culpa, anorexia o pérdida de peso, agitación motora o retardo, despertares tempranos. En tanto, en la depresión atípica se pueden observar al menos 2 de los síntomas adicionales siguientes: hiperfagia o ganancia de peso corporal, hipersomnio y pesadez de las extremidades. Hasta ahora, la clasificación en subtipos utilizando un criterio fisiopatológico no ha sido posible por la falta de marcadores biológicos confiables. Estudios utilizando tomografía computacional de emisión de fotones muestran diferencias en el flujo cerebral en pacientes con distintos tipos

de depresión. Los pacientes con depresión atípica muestran un aumento del flujo cerebral local en el lóbulo frontal derecho mientras pacientes con depresión melancólica muestran una disminución de éste en la misma área (Fountoulakis y cols., 2004). En roedores, no hay modelos que permitan comparar diferencias sutiles en los síntomas depresivos inducidos por diferentes estrategias de estrés repetido. Además, el número de síntomas que habitualmente se evalúan son reducidos. En cuanto al tratamiento antidepresivo y los subtipos de depresión, hay escasos antecedentes que relacionan una especificidad de acción de las diferentes familias farmacológicas con los subtipos de depresión. Se sabe que pacientes con depresión atípica son resistentes a la acción de los antidepresivos tricíclicos pero sí responden a los inhibidores de la enzima monoamino oxidasa (DSM-IV-TR, 4<sup>ta</sup> ed.), y que pacientes con depresión melancólica presentan una mayor eficacia frente a los FADs de acción dual (inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (Sadock BJ y cols., 2007). En el manejo terapéutico de la depresión es común que la decisión en la elección del fármaco a administrar se base en la experiencia personal y de algunos estudios clínicos, y que durante el curso del tratamiento se cambie el fármacos entre las mismas subfamilias o se aumente la dosis (Kelsey, 1997; Fava, 2000). Es por esto que los resultados descritos en esta tesis en cuanto al efecto diferencial de los FADs sobre los distintos modelos de estrés y su posible relación con los subtipos de depresión son una contribución significativa en el estudio de la depresión.

Con estos resultados, se dio inicio en el laboratorio a una nueva línea de investigación en la que se pretende identificar marcadores biológicos de ambos paradigmas de estrés repetido que permitan predecir la eficacia de la respuesta a fármacos en pacientes deprimidos. Resultados del laboratorio muestran un aumento en la proteína

metabólica, aldolasa C en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de ratas sometidas a estrés por restricción, no así en el LCR de ratas sometidas a estrés por inmovilización. Es más, en el plasma se ha observado el mismo patrón de niveles diferenciales de aldolasa C, confirmando que este biomarcador podría ser detectable a nivel periférico. En el laboratorio, se sigue trabajando en la caracterización neurobiológica de ambos modelos de estrés.

### **3.- Fluoxetina induce plasticidad estructural en las sinapsis glutamatérgicas telencefálicas.**

Los resultados descritos en esta tesis muestran que flx además de disminuir la desesperanza aprendida en ratas estresadas, tiene un efecto similar en ratas naïve, lo que sugiere que la acción de flx sobre las neuronas y sinapsis glutamatérgicas puede estar relacionada con este efecto antidepressivo. Más aún, en la actualidad se piensa que los FADs podrían ejercer efectos sobre sujetos sanos a pesar de que éstos, en humanos, podrían no ser iguales a los efectos sobre sujetos con depresión mayor (Barondes, 1994). Por lo tanto, estudiar los cambios inducidos por flx en ratas naïve nos permitió avanzar en el conocimiento del mecanismo de acción de este fármaco y de su efecto sobre una conducta depresiva específica, además de advertir sobre posibles efectos adversos.

Por ello, se analizó si las neuronas y sinapsis glutamatérgicas pueden ser un blanco de las adaptaciones inducidas por flx, revirtieron así las alteraciones morfológicas y funcionales en circuitos corticales glutamatérgicos inducidas por estrés (McEwen y cols., 2012). Así, el estrés aumenta la liberación de glutamato en la corteza prefrontal e induce la disminución de algunas subunidades de receptores para glutamato, como GluN1 y GluA1

(Sanacora y cols., 2012). El estrés repetido disminuye la densidad y la presencia de espinas de mayor tamaño (Radley y cols., 2006; Radley y cols., 2008), efecto que es revertido por la administración de FADs (Norrholm y Ouimet, 2001; Bessa y cols., 2009; Hajszan y cols., 2009).

Sorprendentemente, nuestros resultados muestran que la administración de flx a ratas naïve indujo retracción del árbol dendrítico en vastas áreas corticales. Este resultado no estaba de acuerdo con lo esperado ya que el estrés repetido tiene el mismo efecto: así, disminuye el largo dendrítico en áreas corticales como: la corteza prefrontal (Brown y cols., 2005, Cerqueira y cols., 2007b, Cook y Wellman 2004, Liston y cols., 2006, Radley y cols., 2006, 2008, Goldwater y cols., 2009) e hipocampo (Magarinos y cols., 1996; Conrad y cols., 1999; Sousa y cols., 2000; McLaughlin y cols., 2007). Este efecto puede ser revertido por la administración prolongada de FADs (Bessa y cols., 2009). La retracción dendrítica está relacionada con la disminución del volumen hipocampal, aunque este fenómeno en pacientes con depresión mayor es controversial. Así, Sheline y cols. (1996) mostraron una disminución de volumen hipocampal en cerebros de pacientes con depresión mayor, efecto que no fue observado en otros reportes (Rusch y cols., 2001; Vythilingam y cols., 2004). La elección de los sujetos de estudio (edad), metodología empleada y el uso de diferentes FADs podrían explicar estas diferencias. La retracción dendrítica mediada por FADs no ha sido abordada en otros estudios, ya que en la mayoría de los trabajos los estudios morfológicos solo se realizan en animales controles, estresados y estresados con FAD. Es probable que el tiempo necesario para realizar estos análisis sea una de las razones para omitir este grupo experimental. Sin embargo, de acuerdo con la retracción dendrítica inducida por flx, la administración durante 21 días de desipramina produce atrofia dendrítica en neuronas del

lecho de la estría terminal (Santibañez M., 2009). Uno de los mecanismos que podrían explicar la disminución del largo dendrítico mediado por flx es un aumento en la presencia de R-NMDA conteniendo la subunidad GluN2A. Se ha descrito que en neuronas hipocampales, la sobreexpresión de R-NMDA con la subunidad GluN2B induce la reactivación de la dendritogénesis, por lo que estas neuronas contienen procesos más largos y más complejos (Sepulveda y cols., 2010). Según esto, un aumento de la subunidad GluN2A es compatible con una retracción del árbol dendrítico. Mas aún, la retracción dendrítica fue observada en todas las áreas analizadas (RSGb, M2 y PrL) lo que sugiere que la presencia de R-NMDA con la subunidad GluN2A también puede ser un fenómeno extendido.

El aumento en la densidad de espinas en RSG, M2 e hipocampo, pero no en PrL muestran que a nivel sináptico, los cambios inducidos por flx ocurren en estructuras cerebrales específicas. De acuerdo con este hallazgo, se ha descrito que el estrés repetido tampoco modifica la densidad de espinas en la corteza PrL (Bessa y cols., 2009; Goldwater y cols., 2009), reflejando que esta zona es menos sensible al estrés y al tratamiento antidepresivo.

La morfología de las espinas determina características funcionales de las sinapsis. Así, el tamaño de la cabeza de las espinas dendríticas se correlaciona con un aumento de la densidad postsináptica (Harris y Stevens, 1989) y del contenido de R-AMPA (Takumi y cols., 1999). El aumento en el porcentaje de espinas tipo callampa y la disminución de las espinas tipo filopodio/delgada en las cortezas RSG, M2 se correlacionó con un aumento selectivo de las subunidades GluN2A, GluA1 y GluA2 en estas zonas. Similarmente, en el hipocampo flx aumentó la densidad, el porcentaje de espinas tipo callampa y disminuyó el porcentaje de

espinas tipo filopodio/delgada. Estos resultados indican que la administración prolongada de flx favorecería la maduración y/o estabilización de los contactos sinápticos en áreas telencefálicas específicas. Esta especificidad se refleja también en el hecho que las dendritas distales de las neuronas piramidales de CA1 no presentan esta plasticidad. Esto puede deberse a la conectividad diferencial de ambas zonas sinápticas. Mientras las fibras colaterales de Schaffer terminan sobre la porción proximal del árbol dendrítico en el *stratum radiatum* de CA1, la región más distal recibe las proyecciones desde la corteza entorhinal (Steward, 1976). Ambas sub-zonas también expresan diferencialmente las subunidades del R-NMDA: las porciones más proximales presentan un mayor contenido de R-NMDA con la subunidad GluN2B, mientras las porciones más distales presentarían un mayor porcentaje de R-NMDA con la subunidad GluN2A (Segal, 1975; Arrigoni y Greene, 2004). Por esto, en las dendritas proximales de una neurona piramidal control que contienen un menor porcentaje de espinas de mayor tamaño (callampa) y R-NMDA conteniendo mayoritariamente GluN2B, flx es capaz de inducir de manera más evidente los cambios descritos. A su vez, en las porciones más distales, que contienen mayor porcentaje de espinas tipo callampa (maduras) y R-NMDA conteniendo la subunidad GluN2A, la inducción de plasticidad es limitada. Además, espinas más grandes y con mayor contenido de GluN2A son compatibles con una potenciación sináptica inducida por flx (Kopeck y Malinow, 2006; Alvarez y Sabatini, 2007; Kobayashi y cols., 2007). Falta por determinar si este fenómeno se correlaciona con un aumento de la proteína andamio PSD-95, ya que esta proteína andamio, además de interactuar directamente con GluN2A (Bard y cols., 2010) está relacionada con estabilización de las sinapsis (Ehrlich y cols., 2007) y con el tráfico de R-AMPA y R-NMDA a la sinapsis (Elias y cols., 2008).

El aumento en los niveles de GluA2 descritos en esta tesis están de acuerdo con el trabajo de Barbon y cols (2011) en donde se muestra que el tratamiento por mas de 2 semana con flx es necesario para inducir un aumento de GluA2 y GluA4 en la corteza prefrontal y de GluA1 y GluA3 en hipocampo (Barbon y cols., 2011). La detección de aumentos de GluA2 en densidades postsinápticas aisladas desde telencéfalo sugieren la interesante posibilidad que flx induzca cambios en la permeabilidad al calcio en estos receptores (Ampuero y cols., 2010). Para verificar estos cambios en las dendritas del hipocampo, específicamente en el *stratum radiatum*, se realizaron pruebas de permeabilidad a calcio mediante la tinción de cobalto. Los resultados confirman el cambio de estequiometría del R-AMPA, esto es un aumento de R-AMPA contiendo la subunidad GluA2. Una de las subunidades del R-AMPA necesarias para el establecimiento de la LTP y cuya presencia en la sinapsis ha sido asociada a sinapsis potenciadas o a espinas maduras (Isaac y cols., 2007; Chen y cols., 2009). Compatible con una reducción en la plasticidad inducida por flx, en rebanadas de cerebros de ratas tratadas con flx se observa la oclusión de los fenómenos de LTP y LTD en sinapsis ubicadas en el *stratum radiatum* pero no así en sinapsis ubicadas en zonas mas distales como el *stratum lacunosum moleculare* (Rubio FJ, 2012, manuscrito enviado a publicación). La potenciación sináptica depende de la experiencia previa (Bear, 2003). Así, sinapsis que han sido previamente potenciadas contienen mayoritariamente GluN2A y en ellas es más factible inducir LTD que LTP y lo inverso sucede en sinapsis previamente deprimidas que contienen mayoritariamente GluN2B. En ellas, es más factible inducir LTP que LTD. Por otra parte, también se ha descrito que la terapia electroconvulsiva disminuye la LTP en hipocampo (Stewart y Reid, 2000), sugiriendo que los efectos sinápticos inducidos por flx que se han descritos en esta

tesis, pueden ser inducidos también por otros tratamientos antidepresivos. Una menor permeabilidad al calcio del R-NMDA (presencia de GluN2A) y del R-AMPA (presencia de GluA2) limitarían la plasticidad sináptica y por tanto, podrían tener consecuencias cognitivas relevantes. Para ello, se realizaron pruebas de aprendizaje y memoria.

#### **4.- Flx produce un deterioro en la memoria remota.**

Distintos tipos de memoria están relacionadas con diferentes estructuras telencefálicas. Mediante estudios de lesión, análisis de imagen o de ensayos conductuales ha sido posible determinar que por ejemplo la memoria no declarativa, como la adquisición de hábitos, depende de la integridad de estructuras como el cuerpo estriado o el cerebelo (tareas motoras), mientras la memoria declarativa o explícita esta relacionada con el hipocampo, o la memoria de condicionamiento aversivo con la amígdala (Kandel E. y cols, 2000). En esta tesis, alteraciones sinápticas descritas en la corteza e hipocampo después de tratamiento con flx, sugerían que posiblemente la memoria podría estar afectada. Por esto se evaluó la memoria explícita mediante diferentes pruebas conductuales. En la prueba del laberinto de Morris se mide memoria espacial. En ésta, el aprendizaje de la tarea depende del hipocampo mientras la consolidación depende de estructuras corticales, como la corteza perirhinal (Squire y Zola, 1996; Barker y Warburton, 2011). Otra forma de memoria explícita que es fácil de medir en roedores es la memoria de reconocimiento de objeto novedoso, una forma de memoria no espacial que además del hipocampo depende de otras estructuras corticales, como por ejemplo la corteza perirhinal (Winters y cols., 2008). Al igual que en la prueba del laberinto de Morris, en la prueba de reconocimiento de objeto el

aprendizaje o la memoria de corto plazo (24 hrs.) no es alterada por flx. Dosis similares de flx a las empleadas en esta tesis tampoco muestran alteraciones en el aprendizaje o en la memoria de corto plazo (Stewart y Reid, 2000; Valluzzi y Chan, 2007). Sin embargo, dosis mayores a 8 mg/kg (i.p.) sí producen un deterioro en el aprendizaje en la prueba del Laberinto de Morris (Majlessi y Naghdi, 2002), efecto que puede ser debido a las altas dosis utilizadas. A diferencia de lo observado en el aprendizaje y en la memoria a corto plazo (60 min. en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso), cuando se evaluó memoria a largo plazo en ambas pruebas, esto es a los 17 días en el laberinto de Morris o a las 24 hrs. después de la última sesión de entrenamiento en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso, sí observamos un deterioro en la memoria. Estos resultados sugieren que flx podría afectar la consolidación, pero no la adquisición, de la memoria. Sin embargo, se requieren pruebas adicionales para dilucidar este fenómeno. Existe consenso en que la memoria explícita, si bien depende del hipocampo para su adquisición, en el largo plazo se hace independiente de esta estructura (Squire y Zola, 1996). Aunque la participación de regiones específicas de la corteza cerebral en la consolidación y almacenamiento de diferentes tipos de memoria ha sido difícil de establecer, los cambios plásticos inducidos por flx en extensas zonas telencefálicas explicarían el déficit en la memoria remota. Consistentemente, una de las áreas más alteradas por flx es la corteza retroesplenial, una área cortical que es esencial para el almacenamiento y recuperación de memoria hipocampal (Maviel y cols., 2004). De acuerdo con los hallazgos descritos en esta tesis, Corcoran y cols. (2011) mostró que específicamente en esta corteza, la subunidad GluN2A del RNMDA está implicada en la recuperación de la memoria remota (Corcoran y cols., 2011). No se observaron diferencias en el aprendizaje de la respuesta condicionada en la

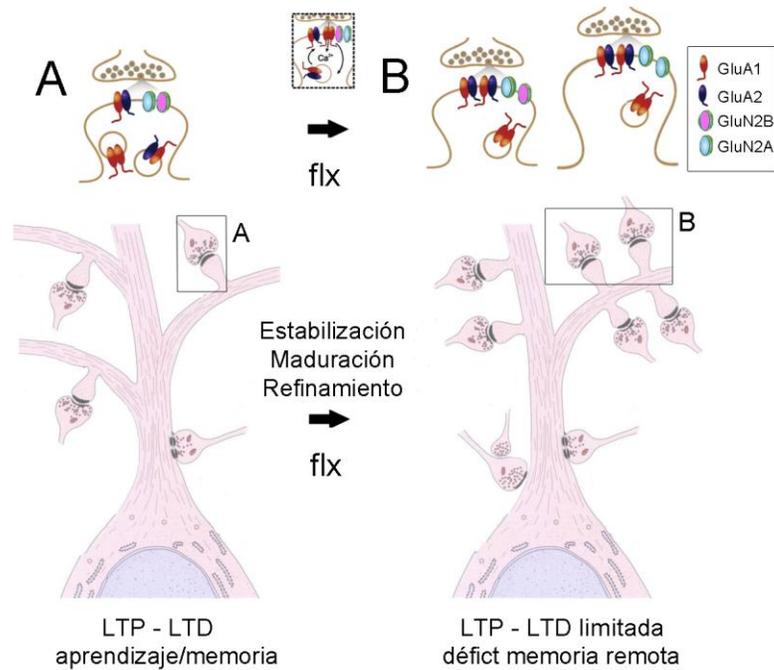
prueba de evitación pasiva, lo que sugiere que el tratamiento con flx no afecta estructuras como la amígdala.

Los efectos cognitivos de la administración prolongada de flx en pacientes con depresión mayor es controversial. Hay reportes que sugieren una mejora en el desarrollo de pruebas cognitivas que miden memoria explícita (Levkovitz y cols., 2002; Vythilingam y cols., 2004; Gallassi y cols., 2006). Sin embargo, también hay trabajos que muestran un efecto deletéreo de flx sobre la memoria (Gorenstein y cols., 2006). Un problema en la interpretación de estos resultados se debe a que la mayoría de estos trabajos evalúa la memoria en pacientes de edad avanzada, lo que podría tener implicancias en el estado neurobiológico del cerebro, influyendo en el resultado final de la administración del FAD. En este sentido, es necesario realizar estudios en adultos sanos para realizar afirmaciones concluyentes sobre el efecto de flx sobre la memoria.

En controversia a nuestras observaciones, dos publicaciones recientes muestran que la administración prolongada de flx restablece plasticidad sináptica dependiente de experiencia como la deprivación monocular (Maya Vetencourt y cols., 2008) y la extinción de las respuestas al miedo (Karpova y cols., 2011). En ellos, se muestra que la administración prolongada de flx reactiva fenómenos de plasticidad que se pierden durante el desarrollo o no se observan en el adulto. En el desarrollo del sistema visual, una vez producido el término del período crítico, se establecen las columnas de dominancia ocular y se restringe la plasticidad de las conexiones entre las aferencias contra e ipsilaterales desde los ojos (Berardi y cols., 2000; Hooks y Chen, 2007). Si antes del término del período crítico se realiza la deprivación monocular, se inducen cambios plásticos en la corteza visual de tal manera de potenciar las conexiones desde el ojo no deprivado.

Después de finalizado el período crítico no ocurre el fenómeno. En este modelo, la administración de fluoxetina en el adulto ha mostrado que reactiva los fenómenos de plasticidad sináptica (Maya Vetencourt y cols., 2008). Por otra parte, durante el proceso de extinción del condicionamiento al miedo se induce plasticidad que es favorecida por flx (Karpova y cols., 2011). Estos antecedentes sugieren que los efectos inducidos por flx dependen de la condición previa, esto quiere decir, que el resultado final de la administración prolongada de flx dependerá de la experiencia previa o del estado de madurez del cerebro. A pesar de ello, nuestros resultados muestran que flx tiene efectos deletéreos sobre la memoria en sujetos en condiciones basales, es decir, no estresados.

Para sintetizar los hallazgos descritos en esta tesis hemos planteado el siguiente modelo que recapitula los cambios plásticos inducidos por flx en un cerebro naïve (**Figura 27**).



**Figura 28. Modelo del efecto de la administración prolongada de flx sobre las sinapsis glutamatérgicas telencefálicas.** La administración prolongada de flx induce el refinamiento de los circuitos neuronales, maduración de las sinapsis y/o estabilización de los contactos sinápticos inmaduros. A su vez, la maduración sináptica inducida por flx conlleva a una mayor presencia a nivel postsináptico de R-AMPA conteniendo la subunidad GluA2 y de R-NMDA conteniendo la subunidad GluN2A. Modificado desde (Isaac y cols., 2007).

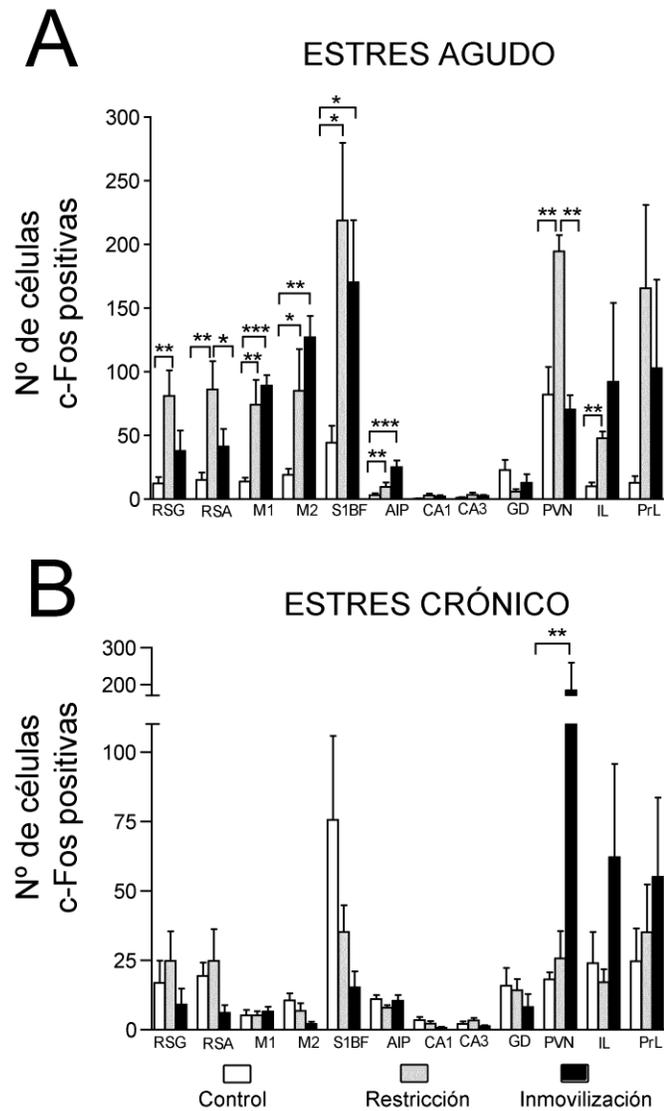
## **Conclusiones**

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten concluir que:

- 1.- Los FADs, flx y rbx ejercen efectos diferenciales sobre las conductas depresivas inducidas por restricción e inmovilización, respectivamente.
- 2.- Sólo la dosis menor de flx fue efectiva en disminuir la desesperanza en ratas no estresadas y después de estrés por restricción, lo que sugiere que el efecto antidepresivo de flx puede ser mediado por cambios plásticos en las sinapsis glutamatérgicas.
- 3.- Los cambios plásticos inducidos por la administración prolongada de flx en ratas naïve ocurren a distintos niveles de organización: en el árbol dendrítico (retracción), en las espinas dendríticas (aumento en la densidad y en el porcentaje de espinas de mayor tamaño) y en los receptores glutamatérgicos (aumento en los niveles de las subunidades GluN2A y GluA2).
- 4.- Los cambios plásticos en las sinapsis glutamatérgicas se correlacionan con un deterioro en LTP, LTD y memoria remota o de largo plazo.

Apéndices

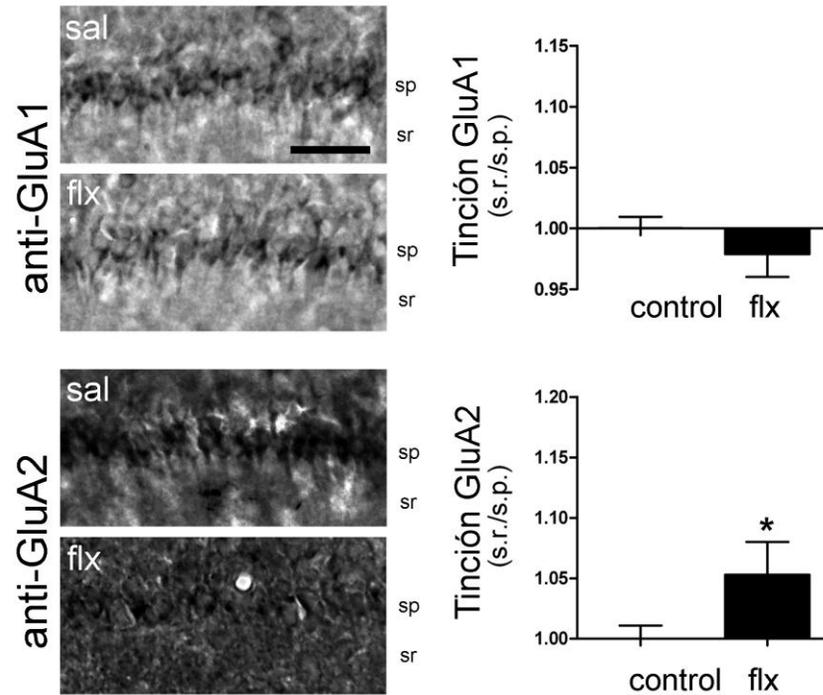
**Apéndice I: Expresión diferencial de c-Fos en restricción e inmovilización:**



**Figura 29. El estrés aumenta diferencialmente el número de células inmunopositivas para c-Fos en distintas áreas telecefálicas en restricción e inmovilización.**

Cuantificación del número de células inmunopositivas en A) estrés agudo y en B) estrés repetido. Los valores corresponden al promedio de células inmunopositivas para c-Fos en 4 cortes provenientes de 4-5 ratas por condición: control, restricción e inmovilización. RSG, corteza retrosplenial granular; RSA, corteza retrosplenial agranular; M1, corteza motora primaria; M2 corteza motora secundaria; S1BF, corteza somatosensorial primaria, campo barril; AIP, corteza insular agranular parte posterior; área CA1 del hipocampo; CA3, área CA3 del hipocampo; GD, giro dentado; PVN, núcleo paraventricular del hipotálamo; IL, corteza Infralímbica; PrL, corteza Prelímbica. Los datos representan el promedio  $\pm$  EE donde \*\*\* indica  $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ ,  $p^* < 0,05$

**Apéndice II: Subunidades R-AMPA en hipocampo.**



**Figura 30. Fluoxetina aumenta la expresión de la subunidad GluA2 del R-AMPA en el área CA1 del hipocampo.** (A) Microfotografías representativas de inmunohistoquímicas anti-GluA1(superior) y anti-GluA2 (inferior) en CA1 en control y flx. (B) Cuantificación de la intensidad relativa (*stratum radiatum/stratum pyramidale*; s.r./s.p.) de GluA1 y GluA2. Los valores representan el promedio  $\pm$  EE. (\* $p < 0.05$ ,  $n = 5-7$ , test t-Student ). Barra corresponde a 50  $\mu$ m.

### **Apéndice III: Análisis estadístico.**

#### ***Análisis de Componentes Principales.***

El análisis de componentes principales (ACP) es un método estadístico multivariado, es decir, aplicado a un conjunto de variables. El procedimiento permite reducir el conjunto de variables originales a menos dimensiones con la mínima pérdida de información. Para poder realizar este método, las variables originales deben estar correlacionadas, de tal manera de mantener la tendencia de las variables originales. Una de las mayores ventajas del ACP es que recapitula la información de un conjunto grande de variables, permitiendo la comparación intergrupo mediante tests estadísticos conocidos: ANOVA o t-Student, facilitando la interpretación de los resultados. Además, cada variable recibe el mismo peso estadístico, por lo que no distorsiona la información aportada por cada variable individual.

#### **Nota:**

En los parámetros medidos en el EPM los datos que se miden se correlacionan de manera inversa con ansiedad, esto es, la mayor ansiedad se correlaciona con disminución de tiempo en brazos abiertos. Por esta razón se generaron las variables t1 y t2 que corresponden al valor negativo del % de tiempo en el brazo abierto (t1) y el tiempo de permanencia en el brazo abierto/tiempo en ambos brazos (t2).

En cuanto al procedimiento, éste se muestra en el ejemplo. Consiste en la obtención de una matriz de correlación de las variables originales. Para esto, se utiliza la covarianza como medida de dispersión de los datos, esto es la variación de una variable x con respecto a otra variable y. Para las variables de ansiedad, esto es la latencia en el NSF, el porcentaje de tiempo en el brazo abierto (t1) y el OTR (razón entre el tiempo en el brazo abierto y el tiempo total, t2), la matriz de correlación es de 3x3. Para desesperanza, las variables son la inmovilidad en el TST y FST, por lo que la matriz de correlación es de 2x2.

Para la ansiedad, tenemos las siguientes variables: NSF (x) , T1 (y) , T2 (z).

X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>		X <sub>p</sub>
Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>		Y <sub>p</sub>
Z <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	Z <sub>3</sub>		Z <sub>p</sub>

La matriz de correlación ( R ) es una matriz simétrica dada por:

$$R = \begin{bmatrix} 1 & \rho_{xy} & \rho_{xz} \\ & 1 & \rho_{yz} \\ & & 1 \end{bmatrix}$$

Una vez obtenida la matriz de correlación se calculan los valores y vectores propios en orden decreciente. Cada valor propio expresa la proporción de varianza explicada por cada componente. Cada puntaje principal es la combinación lineal

$$Z_p = X \beta_1 + Y \beta_2 + Z \beta_3$$

Donde cada vector propio tiene componentes  $\beta_1, \beta_2$  y  $\beta_3$ .

Los componentes se ordenan de acuerdo al porcentaje de variabilidad que explican. Se seleccionan el o los componentes que presentan valores mayores a 1, ya que en ellos se

representa la mayor variación de los datos. Por ejemplo para la ansiedad, el componente 1 explica la variación de un 67,05% de los datos, el componente 2 un 32,93% y el último componente un 0,02%, por lo tanto la contribución del primero es mayoritaria.

Component	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
<b>Comp1</b>	<b>2.01149</b>	1.0236	0.6705	0.6705
Comp2	.987886	.987258	0.3293	0.9998
Comp3	.000627648		0.0002	1.0000

***Análisis estadístico de la Prueba de Reconocimiento de Objeto.***

Para determinar si la administración prolongada de flx modifica el patrón de respuesta de las ratas se utilizó un análisis basado en el método de Kaplan-Meier para curvas de sobrevida.

Este método se utilizó ya que la variable medida es el tiempo gastado en el reconocimiento del objeto. Se comparó el tiempo total gastado en cada uno de los pares de objetos en los grupos controles (sal) y tratados con flx. Para determinar si estos grupos experimentales muestran funciones de sobrevida diferentes se utilizó el test de Longrank

cuya hipótesis nula se basa en funciones de supervivencia iguales. Esto permite determinar que el tiempo gastado en el reconocimiento del objeto familiar son iguales entre el grupo de ratas control y el grupo de ratas tratadas con flx con un valor de  $p=0,9787$ , mientras la respuesta en el tiempo de reconocimiento del objeto novedoso en el grupo de ratas controles y las ratas tratadas flx son significativamente diferentes con un valor de  $p=0,0317$ .

## **Capítulo 8**

---

### **Referencias**

- Akazawa KH, Cui Y, Tanaka M, Kataoka Y, Yoneda Y y Watanabe Y. Mapping of regional brain activation in response to fatigue-load and recovery in rats with c-Fos immunohistochemistry. *Neurosci Res* 66:372-379. 2010.
- Almeida SA, Anselmo-Franci JA, Rosa e Silva AA y Carvalho TL. Chronic intermittent immobilization of male rats throughout sexual development: a stress protocol. *Exp Physiol* 83:701-704. 1998.
- Alvarez JC, Bothua D, Collignon I, Advenier C y Spreux-Varoquaux O. Determination of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in serum and brain areas using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 707:175-180. 1998.
- Alvarez VA, Sabatini BL. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 30:79-97. 2007.
- Ampuero E, Rubio FJ, Falcon R, Sandoval M, Diaz-Veliz G, Gonzalez RE, Earle N, Dagnino-Subiabre A, Aboitiz F, Orrego F y Wyneken U. Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 169:98-108. 2010.
- Arango V, Underwood MD y Mann JJ. Postmortem findings in suicide victims. Implications for in vivo imaging studies. *Ann N Y Acad Sci* 836:269-287. 1997.
- Arrigoni E, Greene RW. Schaffer collateral and perforant path inputs activate different subtypes of NMDA receptors on the same CA1 pyramidal cell. *Br J Pharmacol* 142:317-322. 2004.
- Baldessarini R (1996) *The Pharmacological basis of Therapeutics*
- Barbon A, Caracciolo L, Orlandi C, Musazzi L, Mallei A, La Via L, Bonini D, Mora C, Tardito D, Gennarelli M, Racagni G, Popoli M y Barlati S. Chronic antidepressant treatments induce a time-dependent up-regulation of AMPA receptor subunit protein levels. *Neurochem Int* 59:896-905. 2011.
- Bard L, Sainlos M, Bouchet D, Cousins S, Mikasova L, Breillat C, Stephenson FA, Imperiali B, Choquet D y Groc L. Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19561-19566. 2010.

- Barker GR, Warburton EC. When is the hippocampus involved in recognition memory? *J Neurosci* 31:10721-10731. 2011.
- Barondes SH. Thinking about Prozac. *Science* 263:1102-1103. 1994.
- Bear MF. Bidirectional synaptic plasticity: from theory to reality. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:649-655. 2003.
- Berardi N, Pizzorusso T y Maffei L. Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol* 10:138-145. 2000.
- Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7:137-151. 2006.
- Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF y Sousa N. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry* 14:764-773, 739. 2009.
- Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Aitken DH, Quirion R y Meaney MJ. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 95:298-302. 1988.
- Borbely S, Dobo E, Czege D, Molnar E, Bakos M, Szucs B, Vincze A, Vilagi I y Mihaly A. Modification of ionotropic glutamate receptor-mediated processes in the rat hippocampus following repeated, brief seizures. *Neuroscience* 159:358-368. 2009.
- Bravo J. Efecto del antidepressivo desipramina sobre marcadores hipocámpales asociados a resiliencia celular. Doctorado en Bioquímica. Universidad de Chile. Santiago. Chile. 2007.
- Brown SM, Henning S y Wellman CL. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 15:1714-1722. 2005.
- Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev* 33:1089-1098. 2009.
- Caccia S, Cappi M, Fracasso C y Garattini S. Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 100:509-514. 1990.
- Caccia S, Confalonieri S, Bergami A, Fracasso C, Anelli M y Garattini S. Neuropharmacological effects of low and high doses of repeated oral dexfenfluramine in rats: a comparison with fluoxetine. *Pharmacol Biochem Behav* 57:851-856. 1997.
- Castagne V, Moser P y Porsolt RD. Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents. 2009.

- Castagne V, Porsolt RD y Moser P. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *Eur J Pharmacol* 616:128-133. 2009.
- Castren E, Voikar V y Rantamaki T. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol* 7:18-21. 2007.
- Cerqueira JJ, Taipa R, Uylings HB, Almeida OF y Sousa N. Specific configuration of dendritic degeneration in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex induced by differing corticosteroid regimens. *Cereb Cortex* 17:1998-2006. 2007.
- Charlier C, Pinto E, Ansseau M y Plomteux G. Relationship between clinical effects, serum drug concentration, and concurrent drug interactions in depressed patients treated with citalopram, fluoxetine, clomipramine, paroxetine or venlafaxine. *Hum Psychopharmacol* 15:453-459. 2000.
- Chen W, Prithviraj R, Mahnke AH, McGloin KE, Tan JW, Gooch AK y Inglis FM. AMPA glutamate receptor subunits 1 and 2 regulate dendrite complexity and spine motility in neurons of the developing neocortex. *Neuroscience* 2008.
- Chen W, Prithviraj R, Mahnke AH, McGloin KE, Tan JW, Gooch AK y Inglis FM. AMPA glutamate receptor subunits 1 and 2 regulate dendrite complexity and spine motility in neurons of the developing neocortex. *Neuroscience* 159:172-182. 2009.
- Christian KM, Miracle AD, Wellman CL y Nakazawa K. Chronic stress-induced hippocampal dendritic retraction requires CA3 NMDA receptors. *Neuroscience* 174:26-36. 2011.
- Colomb J, Reiter L, Blaszkiewicz J, Wessnitzer J y Brembs B. Open Source Tracking and Analysis of Adult Drosophila Locomotion in Buridan's Paradigm with and without Visual Targets. *PLoS One* 7:e42247. 2012.
- Conrad CD, LeDoux JE, Magarinos AM y McEwen BS. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci* 113:902-913. 1999.
- Contreras CM, Rodriguez-Landa JF, Gutierrez-Garcia AG y Bernal-Morales B. The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurones in the rat. *J Psychopharmacol* 15:231-236. 2001.
- Cook SC, Wellman CL. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 60:236-248. 2004.

- Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R y Everall I. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 58:545-553. 2001.
- Cryan JF, Lucki I. 5-HT<sub>4</sub> receptors do not mediate the antidepressant-like behavioral effects of fluoxetine in a modified forced swim test. *Eur J Pharmacol* 409:295-299. 2000.
- Cryan JF, Markou A y Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23:238-245. 2002.
- Cryan JF, Page ME y Lucki I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 182:335-344. 2005.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004:re16. 2004.
- Czeh B, Muller-Keuker JI, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C, Domenici E y Fuchs E. Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 32:1490-1503. 2007.
- Dagnino-Subiabre A, Terreros G, Carmona-Fontaine C, Zepeda R, Orellana JA, Diaz-Veliz G, Mora S y Aboitiz F. Chronic stress impairs acoustic conditioning more than visual conditioning in rats: morphological and behavioural evidence. *Neuroscience* 135:1067-1074. 2005.
- Diaz-Veliz G, Mora S, Gomez P, Dossi MT, Montiel J, Arriagada C, Aboitiz F y Segura-Aguilar J. Behavioral effects of manganese injected in the rat substantia nigra are potentiated by dicumarol, a DT-diaphorase inhibitor. *Pharmacol Biochem Behav* 77:245-251. 2004.
- Donohue HS, Gabbott PL, Davies HA, Rodriguez JJ, Cordero MI, Sandi C, Medvedev NI, Popov VI, Colyer FM, Peddie CJ y Stewart MG. Chronic restraint stress induces changes in synapse morphology in stratum lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: a stereological and three-dimensional ultrastructural study. *Neuroscience* 140:597-606. 2006.
- Drevets WC. Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. *Ann N Y Acad Sci* 985:420-444. 2003.
- Dulawa SC, Hen R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neurosci Biobehav Rev* 29:771-783. 2005.

- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B y Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257-269. 2003.
- Ehrlich I, Klein M, Rumpel S y Malinow R. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4176-4181. 2007.
- Elias GM, Elias LA, Apostolides PF, Kriegstein AR y Nicoll RA. Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors by SAP102 and PSD-95 underlies synapse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20953-20958. 2008.
- Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59. 1988.
- Fava M. New approaches to the treatment of refractory depression. *J Clin Psychiatry* 61 Suppl 1:26-32. 2000.
- File SE, Lippa AS, Beer B y Lippa MT. Animal tests of anxiety. *Curr Protoc Neurosci Chapter* 8:Unit 8 3. 2004.
- Fountoulakis KN, Iacovides A, Gerasimou G, Fotiou F, Ioannidou C, Bascialla F, Grammaticos P y Kaprinis G. The relationship of regional cerebral blood flow with subtypes of major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:537-546. 2004.
- Frodl T, Schaub A, Banac S, Charypar M, Jager M, Kummler P, Bottlender R, Zetzsche T, Born C, Leinsinger G, Reiser M, Moller HJ y Meisenzahl EM. Reduced hippocampal volume correlates with executive dysfunctioning in major depression. *J Psychiatry Neurosci* 31:316-323. 2006.
- Gallassi R, Di Sarro R, Morreale A y Amore M. Memory impairment in patients with late-onset major depression: the effect of antidepressant therapy. *J Affect Disord* 91:243-250. 2006.
- Gambrill AC, Barria A. NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5855-5860. 2011.
- Goldwater DS, Pavlides C, Hunter RG, Bloss EB, Hof PR, McEwen BS y Morrison JH. Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. *Neuroscience* 164:798-808. 2009.
- Gorenstein C, de Carvalho SC, Artes R, Moreno RA y Marcourakis T. Cognitive performance in depressed patients after chronic use of antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 185:84-92. 2006.

- Grappi S, Nanni G, Leggio B, Rauggi R, Scheggi S, Masi F y Gambarana C. The efficacy of reboxetine in preventing and reverting a condition of escape deficit in rats. *Biol Psychiatry* 53:890-898. 2003.
- Gueorguieva R, Mallinckrodt C y Krystal JH. Trajectories of depression severity in clinical trials of duloxetine: insights into antidepressant and placebo responses. *Arch Gen Psychiatry* 68:1227-1237. 2011.
- Haas K, Li J y Cline HT. AMPA receptors regulate experience-dependent dendritic arbor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12127-12131. 2006.
- Hajszan T, Dow A, Warner-Schmidt JL, Szigeti-Buck K, Sallam NL, Parducz A, Leranath C y Duman RS. Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. *Biol Psychiatry* 65:392-400. 2009.
- Harris KM, Stevens JK. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9:2982-2997. 1989.
- Hashimoto K, Sawa A y Iyo M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry* 62:1310-1316. 2007.
- Hering H, Sheng M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2:880-888. 2001.
- Hirano K, Kimura R, Sugimoto Y, Yamada J, Uchida S, Kato Y, Hashimoto H y Yamada S. Relationship between brain serotonin transporter binding, plasma concentration and behavioural effect of selective serotonin reuptake inhibitors. *Br J Pharmacol* 144:695-702. 2005.
- Hoogenraad CC, Akhmanova A. Dendritic spine plasticity: new regulatory roles of dynamic microtubules. *Neuroscientist* 16:650-661. 2010.
- Hooks BM, Chen C. Critical periods in the visual system: changing views for a model of experience-dependent plasticity. *Neuron* 56:312-326. 2007.
- Isaac JT, Ashby MC y McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* 54:859-871. 2007.
- Karpova NN, Pickenhagen A, Lindholm J, Tiraboschi E, Kuleshkaya N, Agustsdottir A, Antila H, Popova D, Akamine Y, Bahi A, Sullivan R, Hen R, Drew LJ y Castren E. Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. *Science* 334:1731-1734. 2011.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N y Nakahara H. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26:360-368. 2003.

- Kelsey JE. Switching drug class after initial SSRI failure. *J Clin Psychiatry* 58:326-327. 1997.
- Kessler RC. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 48:191-214. 1997.
- Kobayashi C, Aoki C, Kojima N, Yamazaki H y Shirao T. Drebrin a content correlates with spine head size in the adult mouse cerebral cortex. *J Comp Neurol* 503:618-626. 2007.
- Kopec C, Malinow R. Neuroscience. Matters of size. *Science* 314:1554-1555. 2006.
- Kosten TA, Galloway MP, Duman RS, Russell DS y D'Sa C. 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* 33:1545-1558. 2008.
- Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894-902. 2008.
- Lapmanee S, Charoenphandhu N, Krishnamra N y Charoenphandhu J. Anxiolytic-like actions of reboxetine, venlafaxine and endurance swimming in stressed male rats. *Behav Brain Res* 231:20-28. 2012.
- Levkovitz Y, Caftori R, Avital A y Richter-Levin G. The SSRIs drug Fluoxetine, but not the noradrenergic tricyclic drug Desipramine, improves memory performance during acute major depression. *Brain Res Bull* 58:345-350. 2002.
- Liston C, Miller MM, Goldwater DS, Radley JJ, Rocher AB, Hof PR, Morrison JH y McEwen BS. Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J Neurosci* 26:7870-7874. 2006.
- Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 8:523-532. 1997.
- Machado-Vieira R, Salvadore G, Ibrahim LA, Diaz-Granados N y Zarate CA, Jr. Targeting glutamatergic signaling for the development of novel therapeutics for mood disorders. *Curr Pharm Des* 15:1595-1611. 2009.
- Madden DR. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3:91-101. 2002.
- Magarinos AM, McEwen BS, Flugge G y Fuchs E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci* 16:3534-3540. 1996.

- Majlessi N, Naghdi N. Impaired spatial learning in the Morris water maze induced by serotonin reuptake inhibitors in rats. *Behav Pharmacol* 13:237-242. 2002.
- Marin MT, Cruz FC y Planeta CS. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav* 90:29-35. 2007.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F y Bontempi B. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96-99. 2004.
- Maya Vetencourt JF, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O'Leary OF, Castren E y Maffei L. The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science* 320:385-388. 2008.
- McEwen BS, Eiland L, Hunter RG y Miller MM. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* 62:3-12. 2012.
- McLaughlin KJ, Gomez JL, Baran SE y Conrad CD. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Res* 1161:56-64. 2007.
- Medvedev NI, Rodriguez-Arellano JJ, Popov VI, Davies HA, Tigaret CM, Schoepfer R y Stewart MG. The glutamate receptor 2 subunit controls post-synaptic density complexity and spine shape in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 27:315-325. 2008.
- Mitchell PJ, Redfern PH. Animal models of depressive illness: the importance of chronic drug treatment. *Curr Pharm Des* 11:171-203. 2005.
- Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A y Chattarji S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9371-9376. 2005.
- Miyata S, Hamamura T, Lee Y, Miki M, Habara T, Oka T, Endo S, Taoka H y Kuroda S. Contrasting Fos expression induced by acute reboxetine and fluoxetine in the rat forebrain: neuroanatomical substrates for the antidepressant effect. *Psychopharmacology (Berl)* 177:289-295. 2005.
- Monleon S, D'Aquila P, Parra A, Simon VM, Brain PF y Willner P. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology (Berl)* 117:453-457. 1995.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60. 1984.

- Musazzi L, Racagni G y Popoli M. Stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. *Neurochem Int* 59:138-149. 2011.
- Nemeroff CB. Prevalence and management of treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry* 68 Suppl 8:17-25. 2007.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ y Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25. 2002.
- Newport DJ, Nemeroff CB. Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *Curr Opin Neurobiol* 10:211-218. 2000.
- Norrholm SD, Ouimet CC. Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment. *Synapse* 42:151-163. 2001.
- O'Mahony CM, Clarke G, Gibney S, Dinan TG y Cryan JF. Strain differences in the neurochemical response to chronic restraint stress in the rat: relevance to depression. *Pharmacol Biochem Behav* 97:690-699. 2011.
- Overmier JB, Seligman ME. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J Comp Physiol Psychol* 63:28-33. 1967.
- Page ME, Lucki I. Effects of acute and chronic reboxetine treatment on stress-induced monoamine efflux in the rat frontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 27:237-247. 2002.
- Pare WP. Technique and strain comparisons in stress ulcer. *Ann N Y Acad Sci* 597:223-230. 1990.
- Pare WP, Tejani-Butt SM. Effect of stress on the behavior and 5-HT system in Sprague-Dawley and Wistar Kyoto rat strains. *Integr Physiol Behav Sci* 31:112-121. 1996.
- Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:88-109. 2008.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N y Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47:379-391. 1978.
- Radley JJ, Rocher AB, Janssen WG, Hof PR, McEwen BS y Morrison JH. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp Neurol* 196:199-203. 2005.
- Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, McEwen BS y Morrison JH. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 16:313-320. 2006.

- Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dammann M, McEwen BS, Morrison JH, Wearne SL y Hof PR. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol* 507:1141-1150. 2008.
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL y Stockmeier CA. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry* 45:1085-1098. 1999.
- Rantamaki T, Hendolin P, Kankaanpaa A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Mannisto PT y Castren E. Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 32:2152-2162. 2007.
- Rodriguez-Landa JF, Contreras CM, Gutierrez-Garcia AG y Bernal-Morales B. Chronic, but not acute, clomipramine or fluoxetine treatment reduces the spontaneous firing rate in the mesoaccumbens neurons of the rat. *Neuropsychobiology* 48:116-123. 2003.
- Rusch BD, Abercrombie HC, Oakes TR, Schaefer SM y Davidson RJ. Hippocampal morphometry in depressed patients and control subjects: relations to anxiety symptoms. *Biol Psychiatry* 50:960-964. 2001.
- Rygula R, Abumaria N, Flugge G, Fuchs E, Ruther E y Havemann-Reinecke U. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res* 162:127-134. 2005.
- Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P y Castren E. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* 23:349-357. 2003.
- Saglietti L, Dequidt C, Kamieniarz K, Rousset MC, Valnegri P, Thoumine O, Beretta F, Fagni L, Choquet D, Sala C, Sheng M y Passafaro M. Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron* 54:461-477. 2007.
- Sanacora G, Treccani G y Popoli M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62:63-77. 2012.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C y Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809. 2003.

- Santibañez M, El efecto ansiolítico y antidepresivo de la desipramina evita y revierte los efectos del estrés sobre la morfología dendrítica, la expresión del ARNm y el péptido CRH en la amígdala y el lecho de la estría terminal. Doctorado en Fisiología. Pontificia Universidad Católica. Santiago. Chile. 2009.
- Schmidt HD, Banasr M y Duman RS. Future Antidepressant Targets: Neurotrophic Factors and Related Signaling Cascades. *Drug Discov Today Ther Strateg* 5:151-156. 2008.
- Segal M. Physiological and pharmacological evidence for a serotonergic projection to the hippocampus. *Brain Res* 94:115-131. 1975.
- Sepulveda FJ, Bustos FJ, Inostroza E, Zuniga FA, Neve RL, Montecino M y van Zundert B. Differential roles of NMDA Receptor Subtypes NR2A and NR2B in dendritic branch development and requirement of RasGRF1. *J Neurophysiol* 103:1758-1770. 2010.
- Serretti A, Calati R, Goracci A, Di Simplicio M, Castrogiovanni P y De Ronchi D. Antidepressants in healthy subjects: what are the psychotropic/psychological effects? *Eur Neuropsychopharmacol* 20:433-453. 2010.
- Sheline YI. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biol Psychiatry* 54:338-352. 2003.
- Sheng M, Hoogenraad CC. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76:823-847. 2007.
- Silva-Gomez AB, Rojas D, Juarez I y Flores G. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain Res* 983:128-136. 2003.
- Siuciak JA, Clark MS, Rind HB, Whittemore SR y Russo AF. BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *J Neurosci Res* 52:149-158. 1998.
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF y Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97:253-266. 2000.
- Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13515-13522. 1996.
- Steward O. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 167:285-314. 1976.
- Stewart CA, Reid IC. Repeated ECS and fluoxetine administration have equivalent effects on hippocampal synaptic plasticity. *Psychopharmacology (Berl)* 148:217-223. 2000.

- Takumi Y, Ramirez-Leon V, Laake P, Rinvik E y Ottersen OP. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 2:618-624. 1999.
- Tanti A, Belzung C. Open questions in current models of antidepressant action. *Br J Pharmacol* 159:1187-1200. 2010.
- Taylor MJ, Mannie ZN, Norbury R, Near J y Cowen PJ. Elevated cortical glutamate in young people at increased familial risk of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:255-259. 2011.
- Tejani-Butt SM, Pare WP y Yang J. Effect of repeated novel stressors on depressive behavior and brain norepinephrine receptor system in Sprague-Dawley and Wistar Kyoto (WKY) rats. *Brain Res* 649:27-35. 1994.
- Valluzzi JA, Chan K. Effects of fluoxetine on hippocampal-dependent and hippocampal-independent learning tasks. *Behav Pharmacol* 18:507-513. 2007.
- van Zundert B, Yoshii A y Constantine-Paton M. Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends Neurosci* 27:428-437. 2004.
- Vicente B, Rioseco P, Saldivia S, Kohn R y Torres S. [Chilean study on the prevalence of psychiatric disorders (DSM-III-R/CIDI) (ECPP)]. *Rev Med Chil* 130:527-536. 2002.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS y Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22:6810-6818. 2002.
- Vythilingam M, Vermetten E, Anderson GM, Luckenbaugh D, Anderson ER, Snow J, Staib LH, Charney DS y Bremner JD. Hippocampal volume, memory, and cortisol status in major depressive disorder: effects of treatment. *Biol Psychiatry* 56:101-112. 2004.
- Winters BD, Saksida LM y Bussey TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1055-1070. 2008.
- Wyneken U, Sandoval M, Sandoval S, Jorquera F, Gonzalez I, Vargas F, Falcon R, Monari M y Orrego F. Clinically relevant doses of fluoxetine and reboxetine induce changes in the TrkB content of central excitatory synapses. *Neuropsychopharmacology* 31:2415-2423. 2006.