



**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**  
**INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA DE CANTABRIA**  
**(IBBTEC)**

**TESIS DOCTORAL**

**PAPEL DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE  
mTOR Y  $\beta$ -CATENINA COMO DIANAS  
MOLECULARES PARA EL DESARROLLO DE  
ANTIDEPRESIVOS DE ACCIÓN RÁPIDA**

**Emilio Garro Martínez**

**Santander, 2017**

**Directores: Ángel Pazos y Fuencisla Pilar**



**ÁNGEL PAZOS CARRO**, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria y **FUENCISLA PILAR CUÉLLAR**, Investigadora del Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM),

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Papel de las vías de señalización de mTOR y  $\beta$ -catenina como dianas moleculares para el desarrollo de antidepresivos de acción rápida”, ha sido realizada por Emilio Garro Martínez, bajo su dirección en el Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) (UC-CSIC-SODERCAN), con el fin de optar al grado de Doctor.

Santander, Septiembre de 2017

Fdo: Ángel Pazos Carro

Fuencisla Pilar Cuéllar



Este trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el laboratorio de “*Bases neurobiológicas del mecanismo de acción de compuestos que actúan a nivel del Sistema Nervioso Central*”, del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) y del Departamento de Fisiología y Farmacología, de la Universidad de Cantabria, bajo la dirección de los Drs. Fuencisla Pilar Cuéllar y Ángel Pazos Carro, entre Octubre de 2013 y Septiembre de 2017.

Para la realización de este trabajo, el doctorando ha disfrutado de un contrato predoctoral del programa de AYUDAS FPI 2012, con referencia BES-2012-055665, asociado al proyecto “Mecanismos de neuroplasticidad involucrados en la respuesta antidepresiva rápida de los agonistas de receptor 5-HT<sub>4</sub>: papel de las vías de Wnt- $\beta$ -catenina y mTOR”, con referencia SAF2011-25020

Este trabajo ha sido financiado por:

- Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-25020 y SAF2015-67457-R).
- Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III.

Las colaboraciones científicas del presente trabajo fueron realizadas y cofinanciadas por los laboratorios del:

- Dr. José Castillo Sánchez, en el Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas (LINC), del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, España).
- Dra. Analía Bortolozzi y Dr. Francesc Artigas, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB) (CSIC-IDIBAPS) del Hospital Clínic de Barcelona (Barcelona, España).



***A REGGI***



Antes de empezar con los agradecimientos, me gustaría recordar a la Profesora Elsa Valdizán con la que di mis primeros pasos en el mundo de la ciencia y mis primeras risas en el laboratorio de los Pazos.

El más grande de mis agradecimientos es para ti Fuen. Cogiste el relevo de Elsa sin saber lo que se te venía encima y a pesar de las “dificultades” pienso que no has tirado la toalla en ningún momento. Reflejo de ello es este “pergamino” por el cual te estaré por siempre complacido. Gracias por tu formación, por hacerme ver las cosas con los pies en el suelo y sobre todo por transmitirme tus conocimientos y más importante aún, como se realiza ciencia de calidad.

Gracias también a los mayores del laboratorio: a Ángel por acogerme en su grupo y permitir que el mayor de mis sueños fuese tangible. A la Doutora Castro, por sus charlas farmacológicas, sus clases de gallego y las risas a la hora del pitillo. Al Doctor Díaz, mi padre cántabro, por su ayuda desinteresada, los paseos caninos por la ría y las charlas interminables.

A Josele, con el que empecé y he terminado este largo viaje, siempre juntos. Ha sido un placer compartir todo contigo. Hemos aprendido mucho el uno del otro y sólo espero que continúe así aunque no sepamos que será de nosotros una vez seamos doctores.

A Evæ, la última incorporación, una pena que debido a mi situación tesil no hayamos interaccionado mucho más. Te deseo mucha suerte con el cannabidiol.

A las antiguas habitantes del 02.07: Reichel, Bea, Rebe, Vero, Alicia y Helen. Por sus consejos dentro y fuera del labo y por todos esos buenos momentos.

A toda la trupe del IBBTEC, por las salidas diurnas, nocturnas, cenas, casas rurales durante todos estos años...por obligarnos a salir y desconectar de nuestra querida *Jaula de Faraday*. En especial a Omarsito que me sociabilizó nada más poner un pie en Cantabria. A la Vida Pirata, eso sí que son emociones! A la karateka e Iñaki por compartir tantos fines de semana y consolarnos mutuamente en la última etapa.

A los Campa-Gutierrez, por su ayuda profesional, por los buenos ratos a la hora del café y por las risas en presencia de los miniCampas ya sean en paseos, cenas o eventos varios.

A los laboratorios que me han acogido para realizar las estancias durante esta tesis. Por enseñarme nuevas formas de trabajar, nuevos puntos de vista, nuevos campos científicos y conocer gente encantadora.

A los Mogreros, por todas las horas paseo arriba paseo abajo, los cotilleos, las cenas, los canes, la caza de las navajas, las hogueras de San Juan, etc...

A Nonna, por hacerme ser consciente en todo momento de la enorme oportunidad que me han brindado, por creer siempre en mí, por su apoyo, sus mimos, sus consejos, las discusiones, por querer tanto a Re y por compartir la pasión por la ciencia.

A los Tarraconenses, en particular a Laura y Pires por estar siempre cerca en la distancia.

A Eloísa por lo bien que lo pasamos juntos.

A los míos. Francesca, Juls, Negro, Cuñao y Chumitos. Gracias por todas vuestras visitas y alegrar el Paseo Marítimo 550 nº3 3-F transportando Tarraco a Cantabria. Vuestros ánimos, apoyo y comprensión en cada momento de esta etapa y de todas las que la han precedido porque entiendo que en ocasiones, no ha tenido que ser fácil, y porque gracias a ello soy lo que soy.





## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**8-OH-DPAT:** 8-Hydroxy-2-(di-n-propilamino) tetralina

**[<sup>35</sup>S]-GTPγS:** guanosina 5'-[γ- tio]trifosfato

**5-HT<sub>1A</sub>:** receptor de serotonina 1A

**Amy:** amígdala

**ANP:** amplifying neural progenitors

**BDNF:** factor neurotrófico derivado de cerebro

**BrdU:** bromodesoxiuridina

**BSA:** albúmina sérica bovina

**cDNA:** ácido desoxiribonucleico complementario

**cKO:** knockout condicional

**CPu:** caudado-putamen

**Ct:** ciclo umbral

**DAB:** 3,3'-diaminobenzidina

**DCX:** doblecortina

**DG:** giro dentado

**DRN:** dorsal raphe nucleus

**EC<sub>50</sub>:** concentración eficaz 50

**E<sub>max</sub>:** estimulación máxima

**FST:** forced swimming test

**GLAST:** transportador glutamato/aspartato

**HCl:** ácido clorhídrico

**Hp:** hipocampo

**Hyp:** hipotálamo

**IL:** corteza infralímbica

**LCRa:** líquido cefaloraquídeo artificial

**LDB:** light-dark box

**mPFCx:** corteza prefrontal medial

**mRNA:** ácido ribonucleico mensajero

**NSC:** neural stem cells

**NSF:** novelty-supressed feeding test

**OFT:** open field test

**PBS:** buffer fosfato salino

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PFA:** paraformaldehido

**PL:** corteza prelámbica

**QNP:** quiescent neural progenitor

**qPCR:** PCR cuantitativa a tiempo real

**RM:** resonancia magnética

**SGZ:** zona subgranular

**SIH:** stress induced hyperthermia

**siRNA NS:** ARN interferente pequeño no-sentido

**siRNA:** ARN interferente pequeño

**cST:** estable constitutivamente

**TMX:** tamoxifeno

**TST:** tail suspension test

**WT:** wildtype

# ÍNDICE



<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1. TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR.....</b>	<b>3</b>
1.1. Aspectos generales.....	3
1.2. Etiología de la depresión.....	5
1.2.1. Factores genéticos y epigenéticos.....	5
1.2.2. Factores ambientales.....	7
1.3. Hipótesis etiológicas.....	7
1.3.1. Hipótesis monoaminérgica.....	8
1.3.2. Hipótesis neurotrófica/neuroplástica.....	10
1.3.3. Hipótesis glutamatérgica.....	14
1.3.4. Hipótesis neuroendocrina.....	16
1.3.5. Hipótesis neuroinflamatoria.....	18
<b>2. SISTEMA SEROTONÉRGICO.....</b>	<b>19</b>
2.1. Neuroanatomía del sistema serotoninérgico.....	20
2.2. Neuroquímica del sistema serotoninérgico.....	21
2.3. Receptores serotoninérgicos.....	22
<i>Receptor 5-HT<sub>1A</sub></i> .....	22
<i>Receptor 5-HT<sub>1B</sub></i> .....	24
<i>Receptor 5-HT<sub>4</sub></i> .....	26
2.4. Sistema serotoninérgico en depresión mayor.....	27
<i>Receptor 5-HT<sub>1A</sub></i> .....	27
<i>Receptor 5-HT<sub>1B</sub></i> .....	29
<i>Receptor 5-HT<sub>4</sub></i> .....	31
<b>3. NEUROGÉNESIS Y NEUROPLASTICIDAD.....</b>	<b>32</b>
3.1. Proliferación hipocampal.....	32
3.2. Vías implicadas en proliferación/plasticidad.....	34
3.2.1. Vía Wnt/ $\beta$ -catenina.....	34
$\beta$ -catenina.....	36
<i>a) Papel de <math>\beta</math>-catenina en señalización celular.....</i>	<i>37</i>
<i>b) Papel de <math>\beta</math>-catenina en adhesión celular.....</i>	<i>37</i>
$\beta$ -catenina y los trastornos del estado del ánimo.....	38
3.2.2. Vía de mTOR.....	40
<b>4. CIRCUITOS CEREBRALES IMPLICADOS EN DEPRESIÓN MAYOR..</b>	<b>43</b>
<b>5. MODELOS ANIMALES DE DEPRESIÓN.....</b>	<b>46</b>

<b>6. PANORAMA ACTUAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>49</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
<b>1. ANIMALES Y MUESTRAS <i>POSTMORTEM</i> HUMANAS.....</b>	<b>57</b>
1.1. Ratones transgénicos condicionales para $\beta$ -catenina.....	57
1.1.1. Generación de los animales transgénicos.....	57
1.1.2. Genotipado.....	59
1.2. Ratones para el silenciamiento de la proteína mTOR.....	61
1.3. Muestras humanas <i>postmortem</i> .....	62
<b>2. GRUPOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS.....</b>	<b>64</b>
2.1. Estudios sobre $\beta$ -catenina.....	64
2.1. Estudios sobre mTOR.....	67
2.1.1. Silenciamiento agudo de mTOR.....	67
2.1.2. Silenciamiento subcrónico de mTOR.....	69
<b>3. FÁRMACOS Y REACTIVOS.....</b>	<b>70</b>
<b>4. ESTUDIOS CONDUCTUALES.....</b>	<b>73</b>
4.1. Open Field Test (OFT) o test del campo abierto.....	74
4.2. Light-Dark Box (LDB) o test de la caja clara-oscura.....	74
4.3. Novelty-supressed feeding (NSF).....	74
4.4. Preferencia e ingesta de sacarosa.....	75
4.5. Forced Swimming Test (FST) o test de la natación forzada.....	76
4.6. Tail Suspension Test (TST) o test de suspensión de la cola.....	76
<b>5. ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....</b>	<b>76</b>
5.1. Inmunohistoquímica de $\beta$ -catenina.....	77
5.2. Inmunohistoquímica de bromodesoxiuridina (BrdU).....	78
5.3. Inmunohistoquímica de la proteína nuclear Ki67.....	79
5.4. Inmunohistoquímica de c-Fos.....	79
<b>6. FUNCIONALIDAD DE RECEPTORES MEDIANTE ESTUDIOS DE FIJACIÓN DE [35S]GTP<math>\gamma</math>S.....</b>	<b>80</b>
6.1 Binding funcional: fijación de [35S]GTP $\gamma$ S inducida por la activación del receptor 5-HT <sub>1A</sub> .....	80
6.2. Autorradiografía funcional: fijación de [35S]GTP $\gamma$ S inducida por la activación de los receptores 5-HT <sub>1A</sub> y 5-HT <sub>1B</sub> .....	82

<b>7. MEDIDA DE LA TEMPERATURA CORPORAL.....</b>	<b>84</b>
7.1. Stress Induced Hyperthermia (SIH) o hipertermia inducida por estrés.....	84
7.2. Medida del efecto hipotérmico inducido por la activación de los receptores 5-HT <sub>1A</sub> y 5-HT <sub>1B</sub> .....	85
<b>8. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>4</sub> EN <i>ESTRIADO</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>9. ESTUDIOS DE MICRODIÁLISIS CEREBRAL IN VIVO.....</b>	<b>87</b>
<b>10. ESTUDIOS DE NEUROIMAGEN.....</b>	<b>89</b>
<b>11. EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN IN SITU PARA LA DETECCIÓN DEL mRNA DE mTOR Y BDNF.....</b>	<b>92</b>
<b>12. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i>.....</b>	<b>94</b>
<b>13. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA: PCR CUANTITATIVA (qPCR).....</b>	<b>97</b>
<b>14. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>99</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>101</b>
<b>β-CATENINA.....</b>	<b>103</b>
<b>1. CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD ANATÓMICA DE LA EXPRESIÓN INDUCIBLE DE LA RECOMBINASA Cre BAJO EL PROMOTOR GLAST.....</b>	<b>103</b>
<b>2. CARACTERIZACIÓN DEL RATÓN KNOCKOUT CONDICIONAL PARA β-CATENINA.....</b>	<b>104</b>
2.1. Estudio de la expresión de β-catenina en hipocampo.....	104
2.2. Estudio de marcadores de proliferación y neurogénesis en hipocampo.....	105
2.2.1. Expresión de marcadores de proliferación.....	105
2.2.2. Expresión de doblecortina (DCX).....	107
2.3. Estudios conductuales.....	108
2.3.1. Conducta de tipo ansiosa.....	108
2.3.2. Conducta de tipo depresiva.....	110
2.4. Estudios neuroquímicos.....	111
2.4.1. Funcionalidad de los receptores 5-HT <sub>1A</sub> : estudios <i>in vitro</i> .....	111
2.4.2. Funcionalidad de los receptores 5-HT <sub>1A</sub> : estudios <i>in vivo</i> .....	115
2.4.3. Funcionalidad de los receptores 5-HT <sub>1B</sub> .....	118
2.4.4. Funcionalidad de los receptores 5-HT <sub>4</sub> .....	121
2.4.5. Evaluación de la liberación de neurotransmisores en <i>corteza prefrontal</i> : estudios de microdiálisis.....	122

2.5. Estudios de neuroimagen en los ratones cko para $\beta$ -catenina.....	126
2.6. Respuesta del ratón knockout para $\beta$ -catenina al tratamiento con fármacos antidepresivos.....	127
2.6.1. Tratamiento crónico con fluoxetina en ratones cKO $\beta$ -catenina: efecto conductual.....	127
2.6.2. Tratamiento subcrónico con RS67,333 en ratones cKO $\beta$ -catenina.....	129
<b>3. CARACTERIZACIÓN DEL RATÓN QUE ESTABILIZA <math>\beta</math>-CATENINA....</b>	<b>133</b>
3.1. Estudio de la expresión de $\beta$ -catenina en hipocampo.....	133
3.2. Estudio de marcadores de proliferación y neurogénesis en hipocampo.....	134
3.2.1. Expresión de marcadores de proliferación.....	134
3.2.2. Expresión de doblecortina (DCX).....	135
3.3. Estudios conductuales.....	136
2.3.1. Conducta de tipo ansiosa.....	136
2.3.2. Conducta de tipo depresiva.....	138
3.4. Estudios neuroquímicos.....	139
3.4.1. Funcionalidad de los receptores 5-HT <sub>1A</sub> : estudios <i>in vitro</i> .....	139
3.4.2. Funcionalidad de los receptores 5-HT <sub>1A</sub> : estudios <i>in vivo</i> .....	142
3.4.3. Funcionalidad de los receptores 5-HT <sub>1B</sub> .....	144
3.5. Modelo de corticosterona crónica en animales cst $\beta$ -catenina.....	147
<b>mTOR.....</b>	<b>151</b>
<b>4- SILENCIAMIENTO IN VIVO DE mTOR EN mPFCx. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL, NEUROQUÍMICA Y MOLECULAR.....</b>	<b>151</b>
4.1. Silenciamiento agudo de mTOR.....	151
4.1.1. Efecto conductual del silenciamiento de mTOR en mPFCx.....	151
4.1.2. Cambios moleculares asociados al silenciamiento de mTOR en la mPFCx.....	154
Expresión del mRNA de mTOR tras su silenciamiento en la corteza IL y corteza PL.....	154
Expresión del ARNm de BDNF tras el silenciamiento de mTOR en las cortezas IL y PL.....	158
4.1.3. Modulación de la liberación de serotonina en núcleo dorsal del rafe tras el silenciamiento de mTOR en la corteza IL.....	160
4.2. Silenciamiento subcrónico de mTOR	
4.2.1. Efecto del silenciamiento de mTOR en corteza IL sobre la conducta....	162
4.2.2. Cambios moleculares tras el silenciamiento subcrónico de mTOR en la corteza IL.....	164

<b>5. ESTUDIO DE LA VÍA DE mTOR EN MUESTRAS POSTMORTEM DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE DEPRESIÓN.....</b>	<b>167</b>
5.1. Estudio mediante western blot de la expresión de proteínas de la vía de mTOR.	167
5.2. Estudio mediante qPCR de la expresión de mrna de elementos de la vía de mTOR.....	169
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>171</b>
<b>β-CATENINA.....</b>	<b>173</b>
<b>1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS INDUCIBLES PARA β-CATENINA EN PROGENITORAS DE HIPOCAMPO.....</b>	<b>173</b>
1.1. Estudios de proliferación.....	176
1.1.1. Efecto de la inactivación de β-catenina.....	176
1.1.2. Efecto de la estabilización de β-catenina.....	178
1.2. Estudios conductuales.....	180
1.2.1. Efecto de la inactivación de β-catenina.....	180
1.2.2. Efecto de la estabilización de β-catenina.....	183
1.3. Estudios neuroquímicos.....	184
1.3.1. Funcionalidad de los receptores 5-HT <sub>1A</sub> .....	185
1.3.2. Funcionalidad de los receptores 5-HT <sub>1B</sub> .....	190
1.3.3. Funcionalidad de los receptores 5-HT <sub>4</sub> .....	193
1.3.4. Estudio de la liberación de neurotransmisores en corteza prefrontal del animal cKO β-catenina.....	195
1.4. Estudios de neuroimagen.....	199
<b>2. MODULACIÓN POR ANTIDEPRESIVOS EN EL RATÓN KNOCKOUT CONDICIONAL PARA β-CATENINA.....</b>	<b>201</b>
2.1. Caracterización conductual tras el tratamiento crónico con fluoxetina.....	202
2.2. Caracterización conductual y molecular tras el tratamiento subcrónico con RS67,333.....	203
2.2.1. Efecto sobre la conducta ansiosa/depresiva.....	203
2.2.2. Efecto sobre la funcionalidad del sistema serotoninérgico.....	204
<b>3. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DE UN MODELO DE DEPRESIÓN EN EL ANIMAL CON β-CATENINA ESTABILIZADA.....</b>	<b>206</b>
<b>mTOR.....</b>	<b>208</b>
<b>4. SILENCIAMIENTO IN VIVO DE mTOR EN mPFCx: CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL, NEUROQUÍMICA Y MOLECULAR.....</b>	<b>208</b>

4.1. Silenciamiento de mTOR en la corteza IL: cambios conductuales.....	209
4.1.1. Conducta de tipo depresivo.....	209
4.1.2. Conducta de tipo ansioso.....	211
4.2. Silenciamiento de mtor en la mpfex: cambios moleculares.....	212
4.2.1. Influencia del silenciamiento agudo sobre la expresión del mRNA de mTOR.....	212
4.2.2. Influencia del silenciamiento agudo sobre la expresión del mRNA de BDNF.....	213
4.2.3. Influencia del silenciamiento subcrónico sobre la expresión de c-Fos.....	215
4.2.4. Influencia del silenciamiento subcrónico sobre la proliferación hipocampal.....	217
4.3. Silenciamiento de mtor en la corteza il: influencia sobre la liberación de 5-HT en DRN.....	217
<b>5. ESTUDIO DE LA VÍA DE mTOR EN MUESTRAS POSTMORTEM DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE DEPRESIÓN MAYOR.....</b>	<b>221</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>223</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>227</b>

# **I. INTRODUCCIÓN**



# 1. TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR

## 1.1. ASPECTOS GENERALES

El término de melancolía y las representaciones de lo que en la actualidad conocemos como trastornos del estado del ánimo, se remontan a la antigua Grecia. Aunque no fue hasta el siglo XIX cuando los conceptos modernos de la patología adquirieron forma, gracias a los trabajos de psiquiatras como Falret, Baillarger, Kahlbaum y Kraepelin.

La depresión mayor (*major depressive disorder*, MDD) es un trastorno psiquiátrico crónico, recurrente, multifactorial y que pone en riesgo la vida del sujeto. Esta patología se caracteriza por una serie de síntomas fisiológicos, psicológicos y del comportamiento, como ánimo deprimido, alteraciones del sueño o apetito, pérdida del interés/placer o disfunciones ejecutivas entre otros. El riesgo de padecer el trastorno en algún momento durante la vida del individuo varía dependiendo del género, siendo la frecuencia el doble en mujeres adultas (entre el 10 y el 25%), que en hombres (del 5 al 12%), lo que se encuentra entre los datos más homogéneos dentro de la epidemiología de los trastornos del estado del ánimo (González Pinto *et al.*, 2009).

La depresión mayor contribuye en la actualidad de forma importante a la carga global de enfermedades. Afecta a 350 millones de personas en todo el mundo normalmente en las etapas más productivas de su vida, lo que ocasiona unos costes socioeconómicos elevadísimos. Por ello, esta patología se ha convertido en la primera causa de discapacidad mundial en términos de enfermedad, lo que apoya la necesidad de reducir este trastorno mediante terapias más efectivas (OMS, 2012).

El diagnóstico de la enfermedad, basado en un conjunto amplio de síntomas variables, no es sencillo, y con frecuencia esta patología se encuentra subdiagnosticada. Por ello, en la última edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5), se han introducido varios cambios que pueden influir significativamente en su uso para el diagnóstico e investigación en clínica. De acuerdo con el DSM-5, un paciente es diagnosticado de depresión mayor cuando cierto número de síntomas se declaran durante

más de dos semanas, y cuando éstos perturban la funcionalidad normal, social y funcional del individuo. Estos síntomas se dividen en cuatro grupos principales:

1. **Síntomas afectivos:** son el principal distintivo de la depresión e incluyen cambios en el ánimo como tristeza, pesimismo, desesperanza, y tendencia al llanto.
2. **Síntomas cognitivos:** derivan de la modulación del ánimo sobre la valoración negativa que hace el individuo sobre él mismo, su entorno o su futuro. Con respecto a sí mismo, expresa ideas de discapacidad e inutilidad, el futuro aparece pesimista sin posibilidad de recuperación, siendo capaz de alcanzar la desesperación y apareciendo ideas suicidas. Por otro lado, existe una disminución de la atención y concentración, y una subjetiva pérdida de memoria, pudiéndose apreciar bradipsiquia.
3. **Síntomas volitivos:** el individuo muestra apatía y falta de iniciativa para la realización de las tareas comunes de la vida diaria, lo que desemboca en deterioro o abandono del trabajo, o de las actividades domésticas.
4. **Síntomas somáticos:** afectan a una diversidad de ritmos biológicos. Los más destacados son las alteraciones del sueño, como el insomnio, y del apetito, que habitualmente se presenta disminuido. También surgen otros tipos de síntomas como tendencia a la somatización (dolores de cabeza, molestias en la espalda, etc.).

Dentro de la depresión mayor, se han distinguido diferentes subtipos dependiendo del número total de síntomas presentes en el paciente. La clasificación es la siguiente:

1. **Depresión melancólica:** síntomas severos y alteraciones neurovegetativas prominentes (depresión endógena).
2. **Depresión reactiva:** síntomas moderados aparentemente en respuesta a factores externos (depresión exógena).
3. **Depresión psicótica:** síntomas severos asociados a psicosis (delirios y alucinaciones).
4. **Depresión atípica:** manifestación leve de la enfermedad caracterizada por alteraciones del sueño y del apetito.
5. **Distimia:** depresión menos grave, pero de larga duración, que generalmente no remite durante dos años o más.

Actualmente el diagnóstico de la enfermedad es clínico y por el momento parece seguir en esta misma dirección porque, a pesar de los grandes avances obtenidos en las últimas décadas en investigación preclínica, la búsqueda de biomarcadores o genes asociados a este trastorno psiquiátrico, sigue todavía sin dar sus frutos.

## **1.2. ETIOLOGÍA DE LA DEPRESIÓN**

El origen de este trastorno mental es desconocido, aunque se presenta como un complejo proceso resultante de un cúmulo de señales, internas y externas, en las cuales están implicados componentes genéticos, epigenéticos y ambientales que acompañan al sujeto. Esta heterogeneidad dificulta la búsqueda de fenotipos patofisiológicos o biológicos con especificidad, heredabilidad, o asociación y cosegregación familiar para la enfermedad. En consecuencia, la enfermedad no puede ser contemplada como una patología sencilla, pero sí un síndrome heterogéneo, integrado por numerosas afecciones de causas y patofisiologías diversas (Nestler et al, 2002).

### **1.2.1. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS**

Estudios genéticos, algunos de ellos realizados en gemelos (Bierut et al, 1999), sugieren una modesta heredabilidad (31-50%) del trastorno depresivo (Kendler et al, 2001; Sullivan et al, 2000). Estos trabajos reflejan que el componente genético es moderadamente alto, pero no el único. De hecho, algunos estudios llevados a cabo en gemelos monocigóticos muestran el desarrollo de la enfermedad sólo en uno de ellos, implicando cambios epigenéticos como moduladores del comportamiento (Petronis et al, 2003).

Debido a la clásica asociación del trastorno con alteraciones en la actividad de los sistemas monoaminérgicos cerebrales, los primeros estudios genéticos basados en polimorfismos de nucleótido simple (*single nucleotid polymorphisms*, SNPs), revelaron variantes genéticas las cuales alteran la expresión o la funcionalidad de genes relacionados con estos sistemas moduladores. Entre estos SNPs destacan el C1019G en el promotor del gen del receptor de serotonina 1A (5-HT<sub>1A</sub>), en el gen del receptor de serotonina 2A (5-HT<sub>2A</sub>) T102C y A1438G, variaciones en el gen que codifica para el transportador de serotonina (5-HTT) SCL6A4, en el gen de la enzima limitante de la síntesis de dopamina

(DA) tirosina hidroxilasa (TH) Val81Met, de la enzima implicada en la síntesis de serotonina (5-HT) triptófano hidroxilasa-1 (TPH1) A779C y A218C, de la enzima que degrada dopamina (DA) y/o serotonina (5-HT) catecol-o-metiltransferasa (COMT) G1947A, o de la monoamina oxidasa (MAO) G941T o T1077A entre otros (Levinson, 2006).

El factor neurotrófico derivado de cerebro (*brain derived neurotrophic factor*, BDNF), es una de las neurotrofinas más estudiadas y caracterizadas dentro del sistema nervioso central (SNC) debido a su rol en plasticidad sináptica (Kossel et al, 2001; Levine et al, 1998; Levine et al, 1995; Lohof et al, 1993), y por su implicación en la patogénesis de los trastornos psiquiátricos (Duman & Monteggia, 2006). Alteraciones en sus niveles y funcionalidad se han descrito en varias enfermedades mentales como depresión, esquizofrenia, trastorno bipolar y ansiedad (Polyakova et al, 2015). Concretamente, el SNP Val66Met se ha asociado a estados depresivos tanto en humanos (Hajek et al, 2012; Tsai et al, 2010), como en animales (Chen et al, 2006).

Sin embargo, los estudios genómicos llevados a cabo hasta el momento concluyen que los alelos de riesgo existentes no parecen estar asociados con la patología depresiva (Flint & Kendler, 2014). La naturaleza poligénica del trastorno combinada con el efecto de los diferentes factores ambientales, resulta en múltiples combinaciones de posibles factores de riesgo (Mullins & Lewis, 2017). Si a esta heterogeneidad, le sumamos la moderada heredabilidad, la baja frecuencia alélica de los SNPs asociados y la elevada prevalencia de la enfermedad durante la vida del paciente, encontramos las posibles razones que reducen la potencia de los análisis y por las que los estudios genéticos no son actualmente concluyentes (Mullins & Lewis, 2017). Estas variables exigen un aumento considerable del tamaño de la muestra la cual debería ser estratificada fenotípicamente para aumentar su homogeneidad (Insel & Cuthbert, 2015).

La unión de las técnicas moleculares y el desarrollo computacional están ampliando la posibilidad de identificar factores relacionados con la susceptibilidad o el desarrollo de enfermedades complejas. De este modo, cuantos más genes candidatos vean la luz, mejor conoceremos la relación gen-fenotipo y más sabremos sobre la patofisiología de la depresión mayor, lo que permitirá avanzar en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

## **1.2.2. FACTORES AMBIENTALES**

Existen diversos trabajos que describen el impacto del estrés en las etapas del desarrollo cerebral prenatal, así como en la infancia y la pubertad. El desarrollo cerebral se ha definido como un proceso de múltiples etapas, organizado y altamente dinámico que está genéticamente determinado, epigenéticamente dirigido y ambientalmente influenciado (Tau & Peterson, 2010). Estos eventos estresantes, modifican el material genético alterando la circuitería neuronal y confiriendo al individuo un incremento en la susceptibilidad a desarrollar una futura enfermedad mental, confirmando el papel del ambiente como factor de acción temprana en las enfermedades mentales (Palma-Gudiel et al, 2015; Weaver et al, 2004).

Dentro de la patología depresiva, la infancia es una etapa especialmente sensible a las alteraciones ambientales que incrementan el riesgo a sufrir la enfermedad (Heim et al, 2010). La programación temprana de los sistemas neurobiológicos que regulan las respuestas a estrés y las emociones, actúan como mediadores del riesgo a padecer el trastorno en etapas posteriores de la vida (Heim & Binder, 2012). Dependiendo de los procesos temporales y regionales del desarrollo neural, altamente variable (Tau & Peterson, 2010), así como de la funcionalidad de las estructuras cerebrales relevantes para la experiencia emocional, la susceptibilidad a los efectos de las experiencias adversas podrían variar (Andersen & Teicher, 2008; Rice & Barone, 2000).

Como se ha descrito en este apartado, es ampliamente aceptado que la depresión mayor es el resultado de la interacción entre la predisposición genética y los factores ambientales, pero todavía queda mucho por estudiar sobre la compleja interrelación entre las diferentes etapas del desarrollo, los múltiples genes, condiciones ambientales, y los mecanismos moleculares tras la exposición a los eventos estresantes y la patología.

## **1.3. HIPÓTESIS ETIOLÓGICAS**

La etiología de este trastorno multifactorial sigue siendo desconocida, por lo que varias hipótesis se han postulado con la intención de explicar cómo podrían originarse los cambios comportamentales y neuroquímicos presentes en los pacientes, así como el

mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos. A continuación, se describen aquellas hipótesis más relevantes para el presente trabajo.

### 1.3.1. HIPÓTESIS MONOAMINÉRGICA

En los años 50 del siglo XX, el uso de la reserpina como antihipertensivo indujo en algunos pacientes un estado de tipo depresivo, como efecto adverso de su mecanismo de acción. Poco después se descubrió que dicho efecto era debido a que este agente agotaba las reservas de monoaminas disminuyendo sus niveles en el espacio sináptico. Estas evidencias dieron origen a la hipótesis clásica o monoaminérgica de la depresión (Schildkraut, 1965), la cual postula que la enfermedad es debida a una disminución de la actividad de los sistemas monoaminérgicos cerebrales, principalmente el serotoninérgico y el noradrenérgico. Poco después, dos compuestos no usados en psiquiatría, iproniazida (tuberculostático) e imipramina (neuroléptico), mostraron un alto potencial como antidepresivos. Nos encontrábamos ante el nacimiento de los inhibidores de la enzima monoamino oxidasa (IMAO), y de los antidepresivos tricíclicos (*tricyclic antidepressants*, TCA), los cuales actúan principalmente inhibiendo los transportadores de serotonina y noradrenalina (NA) (Manji et al, 2001; Morilak & Frazer, 2004). Ambos compuestos sirvieron como base para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, incluyendo los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (*serotonin selective reuptake inhibitors*, SSRI), de la noradrenalina (*noradrenaline selective reuptake inhibitors*, NSRI), o duales (*serotonin-noradrenalin reuptake inhibitors*, SNRI), actualmente utilizados como fármacos de primera línea en el tratamiento antidepresivo. Pese a ser más selectivos que los TCAs y presentar una menor incidencia de efectos secundarios, los tratamientos actuales presentan varias limitaciones como son el retraso en la aparición del efecto y la baja eficiencia —menos del 50% de los pacientes tratados muestran una completa remisión— (Berton & Nestler, 2006).

Numerosos estudios se realizaron con la intención de encontrar alteraciones en los niveles de monoaminas cerebrales o de sus metabolitos, pensando obtener biomarcadores de la patología en plasma, orina o líquido cefalorraquídeo (LCR). Estudios similares se llevaron a cabo en cerebros *postmortem* de pacientes diagnosticados de MDD, concluyendo que los resultados obtenidos estaban lejos de llegar a un consenso. Por un lado, algunas de

las investigaciones revelaron una disminución de los niveles de monoaminas (Ashcroft et al, 1966), mientras que otras no mostraron ninguna modificación (Asberg, 1997; Ricci & Wellman, 1990). Además, los fármacos dirigidos hacia los sistemas monoaminérgicos, afectan a los sistemas de neurotransmisores en horas (Bel & Artigas, 1992), mientras que su efecto clínico sólo es evidente después de varias semanas de tratamiento. Estas observaciones llevaron a algunos investigadores a centrar su trabajo en el estudio del estado de los receptores monoaminérgicos, así como en los cambios producidos tras la administración crónica de antidepresivos. Diferentes trabajos evidenciaron alteraciones en la densidad y funcionalidad de diferentes subtipos de receptores pertenecientes a los principales sistemas monoaminérgicos cerebrales. Entre ellos podemos encontrar trabajos que muestran un aumento en la densidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en individuos con depresión mayor (Biegon & Israeli, 1988; Mann et al, 1986), o ausencia de cambios en pacientes suicidas con historia de depresión (De Paermentier et al, 1990). Por el contrario, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se encuentran desensibilizados tras el tratamiento crónico con antidepresivos (Sulser, 1978; Vetulani et al, 1976).

Dentro de este sistema noradrenérgico, el receptor presináptico  $\alpha_2$  también está asociado a este trastorno psiquiátrico de forma que hay un incremento de su densidad y afinidad en cerebros de pacientes suicidas diagnosticados de depresión (Callado et al, 1998; Meana et al, 1992). Tras el tratamiento crónico con fármacos antidepresivos, los heteroreceptores  $\alpha_2$  se encuentran desensibilizados (Mongeau et al, 1994). Puesto que la activación de estos receptores localizados en neuronas serotoninérgicas provoca una disminución de su actividad en el *hipocampo* y la *corteza* (Mongeau et al, 1993), se propuso que la hiperfuncionalidad de estos receptores en el cerebro de los sujetos deprimidos, llevaría a una disminución de la actividad serotoninérgica en dichas áreas de proyección.

Otro de los sistemas de neurotransmisión implicados en esta patología es el sistema dopaminérgico. No fue hasta los años 70 del siglo XX cuando se descubrió el papel de la dopamina en depresión (Randrup *et al.*, 1975). La mayoría de los estudios comparando los niveles del neurotransmisor y sus metabolitos en líquido cefalorraquídeo de pacientes deprimidos, mostraron menores niveles de DA, particularmente en aquellos pacientes que presentaban retraso psicomotor (Banki, 1977; Goodwin et al, 1973; Mendels et al, 1972; Roy et al, 1989). A pesar de los hallazgos citados, existe discrepancia en los resultados referentes a los niveles de DA y su principal metabolito, el ácido homovanílico

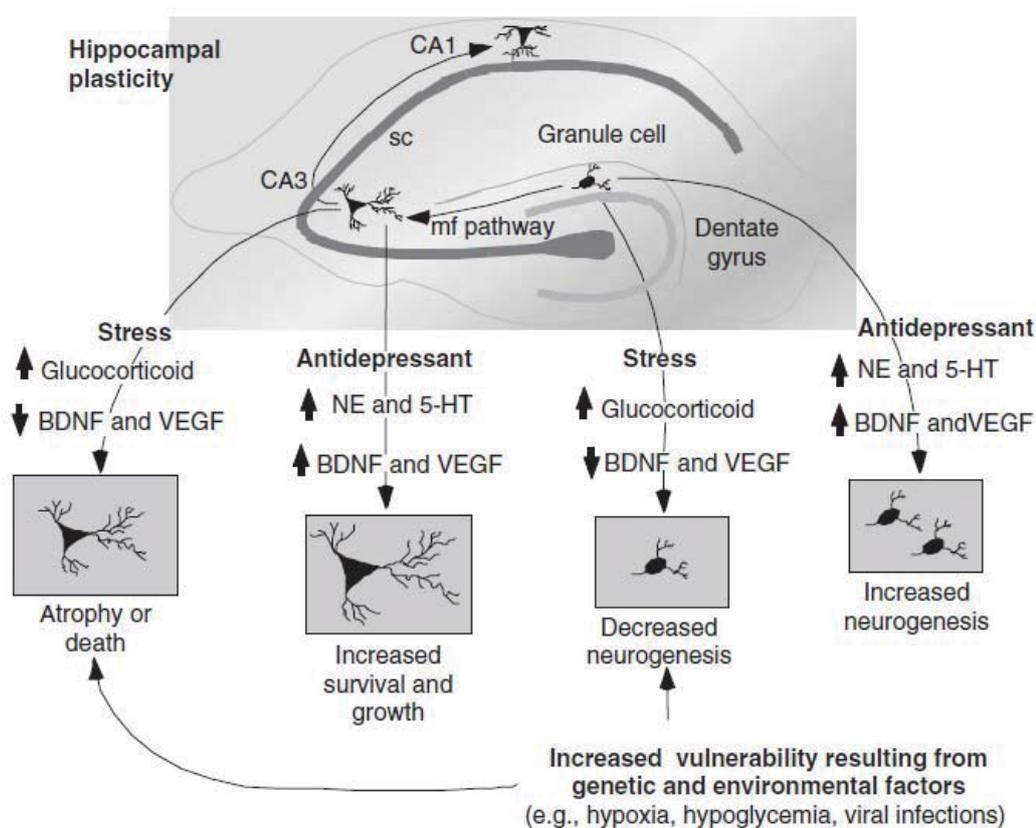
(*homovanillic acid*, HVA) (Harada et al, 1999; Vestergaard et al, 1978). La misma situación se observó en muestras *postmortem* de *corteza frontal* (*frontal cortex*, FCx), donde se describieron aumentos de los niveles de HVA (Beskow et al, 1976; Ohmori et al, 1992), o ausencia de cambios respecto a los individuos control (Crow et al, 1984). Todavía queda mucho trabajo por hacer en relación al papel del sistema dopaminérgico en la patología depresiva, ya que la circuitería responsable de la conducta relacionada con la recompensa (motivación, placer), alterada en el trastorno, está regulada principalmente por neuronas dopaminérgicas. Esto supone un área de gran interés, donde poder obtener gran información sobre el sistema, su neurobiología y la relación con el trastorno depresivo (Nestler, 2015).

### 1.3.2. HIPÓTESIS NEUROTRÓFICA/NEUROPLÁSTICA

Los avances en Biología Molecular y Celular, permitieron esclarecer los mecanismos intracelulares por los cuales las monoaminas, tras unirse específicamente a sus receptores, modulan mensajeros secundarios como el CREB (*cAMP response element-binding protein*), y el BDNF, relacionados con la neuroplasticidad y la neurogénesis. De esta manera, se postuló la hipótesis neurotrófica de la depresión (Duman et al, 1997), con el objetivo de caracterizar las acciones del estrés y de los tratamientos con fármacos antidepresivos, más allá de los sistemas de neurotransmisores y sus receptores, principalmente en áreas cerebrales como el *hipocampo* y la *corteza frontal*. Esta nueva hipótesis correlacionó los tratamientos con fármacos antidepresivos y la regulación de los niveles de factores neurotróficos, además de demostrar cómo estos factores tróficos juegan un papel muy importante en el trastorno depresivo.

Las neurotrofinas son una familia proteica relacionada con la diferenciación y el crecimiento de muchos tipos neuronales durante el desarrollo, así como en el mantenimiento y supervivencia neuronal en el cerebro adulto (Lindsay et al, 1994; Lindvall et al, 1994; Lo, 1995; Park & Poo, 2013; Thoenen, 1995). Dentro de esta familia, el BDNF es uno de los factores tróficos más estudiados por su amplia distribución en cerebro adulto, y por su relación directa con la depresión. Los primeros trabajos que relacionaron el BDNF con esta patología, mostraban como la administración de SSRIs, NSRIs, IMAOs, antidepresivos atípicos e incluso tras la terapia electroconvulsiva, producía un incremento de la expresión de BDNF en el *hipocampo* de roedores (Nibuya et al, 1995; Nibuya et al,

1996; Vaidya & Duman, 2001; Zhang et al, 2010) (fig. 1). Paralelamente se describió como algunos tipos de estrés causaban atrofia e incluso muerte neuronal en la región CA3 del *hipocampo* (Magarinos et al, 1996; Sheline, 1996), lo que se ha relacionado con un aumento de los niveles de la hormona del estrés en roedores o en humanos (Sapolsky, 2000; Sapolsky et al, 1990). Estas alteraciones se correlacionaron con una disminución del BDNF en estas mismas regiones cerebrales (Duman et al, 1997; Duman & Monteggia, 2006) (fig. 1).



**Figura 1.** Representación de la hipótesis neurotrófica/neuroplástica de la depresión. En ella se pueden apreciar los cambios neurofisiológicos y moleculares propuestos en los trastornos relacionados o inducidos por el estrés. Los antidepresivos, administrados de forma crónica, revertirían los cambios producidos por la exposición al estrés. sc: *schaffer colateral* (axones procedentes del área CA3 del *hipocampo*); mf: *mossy fiber*; BDNF: *brain-derived neurotrophic factor*; VEGF: *vessel endothelial growth factor*; NE: noradrenalina; 5-HT: serotonina. Tomado de Duman (2007).

Desde su aparición en el campo de la psiquiatría, el BDNF y su receptor tirosina quinasa B (*tyrosine kinase receptor B*, TrkB), han sido analizados en una enorme cantidad de trabajos utilizando muestras de pacientes diagnosticados de depresión. Un importante

número de autores describen como los niveles de BDNF, así como los de su receptor se encuentran disminuidos en cerebros *postmortem* y plasma de suicidas diagnosticados de depresión (Dwivedi et al, 2003; Kim et al, 2007), mientras que otros autores muestran discrepancias en la relación entre sus niveles o actividades, y la patología. La asociación de niveles anormalmente bajos de BDNF y depresión, se confirmó con el descubrimiento del SNP Val66Met en el gen humano de este factor neurotrófico. La presencia de este SNP conlleva una disminución de la liberación de BDNF, y se ha vinculado con una mayor susceptibilidad a sufrir trastornos psiquiátricos (Chen et al, 2004; Egan et al, 2003; Eisenberg et al, 2013; Monteggia et al, 2007). Por otro lado, la implicación del BDNF en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos parece claro, observándose un incremento de los niveles de este factor trófico en cerebro humano *postmortem* de pacientes tratados de forma crónica con antidepresivos (Chen et al, 2001b).

La motivación por conocer con más claridad el papel de esta neurotrofina tanto en la fisiopatología como en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos, originó el desarrollo de modelos animales con alteraciones en los niveles tanto del BDNF como de su receptor. Los animales heterocigotos para este factor trófico (BDNF +/-) poseían un fenotipo más agresivo y un incremento en la ansiedad respecto a sus controles (Lyons et al, 1999), en paralelo a lo observado en animales que presentan el polimorfismo Val 66Met en el gen que codifica para este factor trófico (Chen et al, 2006; Li et al, 2010b), mientras que otros autores describieron niveles de ansiedad similares a los individuos control (Chourbaji et al, 2004; Ibarguen-Vargas et al, 2009; Lindholm et al, 2012). En relación a la conducta de tipo depresiva, los animales no presentaban diferencias en test conductuales clásicos como el test de la natación forzada (*forced swimming test*, FST) o el test de la suspensión de la cola (*tail susension test*, TST), donde se determina la desesperación del animal (Chourbaji et al, 2004; Duman et al, 2007; Ibarguen-Vargas et al, 2009). En cambio, sí mostraban un estado de tipo depresivo evaluado mediante la conducta de indefensión aprendida (*learned helplessness*, LHP) (MacQueen et al, 2001). Es de destacar que tras la exposición de estos animales a estrés, el fenotipo ansioso y de tipo depresivo se hacía notable (Carola & Gross, 2010; Duman et al, 2007), sugiriendo que una disminución en los niveles de BDNF confería susceptibilidad a los trastornos relacionados con el estrés, en paralelo a lo descrito en humano.

El aumento de BDNF tanto a nivel proteico, como en la expresión a nivel de mRNA (Nibuya et al, 1995; Russo-Neustadt & Chen, 2005), así como de su receptor TrkB (Duman & Monteggia, 2006; Nestler et al, 2002) como consecuencia del tratamiento crónico con antidepresivos, se debe a un incremento de los niveles de monoaminas, que tras unirse a sus receptores, incrementan la vía del adenosín monofosfato cíclico (*cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) (D'Sa et al, 2005; Duman et al, 1997), activándose consecuentemente el factor de transcripción CREB, lo que induce la expresión de sus genes diana, entre los que se encuentra el BDNF (Blendy, 2006; Duman et al, 1997). El tratamiento agudo con el antidepresivo de acción rápida ketamina, también produce activación de la vía de BDNF en cerebro de roedores, apoyando la importancia de este factor trófico en la respuesta antidepresiva (Autry & Monteggia, 2012; Castren & Rantamaki, 2010a; Castren & Rantamaki, 2010b).

A mediados de los años 60 del siglo XX, se describió la neurogénesis en cerebro adulto en el giro dentado del *hipocampo* (Altman & Das, 1965), en contra de lo que se creía hasta la fecha. Este tipo de neuroplasticidad cerebral ha ido con los años adquiriendo importancia tanto en la patofisiología de la depresión, como en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos. Así, la hipótesis neurotrófica de la depresión, también propone como la exposición a estrés, tanto agudo como crónico, induce la disminución de la proliferación y neurogénesis hipocampales (fig. 1) (Duman et al, 1999; Malberg & Duman, 2003; Warner-Schmidt & Duman, 2006). Este descenso en la formación de nuevas neuronas, se postuló como una posible causa en la etiología del trastorno depresivo (Duman et al, 2000; Jacobs et al, 2000), y surgió tras demostrarse mediante estudios morfométricos y morfológicos del *hipocampo* de pacientes deprimidos, una reducción en su volumen (Bremner et al, 2000; Sheline et al, 1996), asociándose así la pérdida y atrofia neuronal con el trastorno. Por el contrario, tratamientos crónicos con SSRIs como la fluoxetina (Encinas et al, 2006), subcrónicos con el agonista parcial del receptor 5-HT<sub>4</sub> (Pascual-Brazo et al, 2012), o incluso tratamientos no farmacológicos como el silenciamiento mediante moléculas de ácido ribonucleico pequeño de interferencia (*small interference RNA*, siRNA) del transportador de serotonina (5-HTT) en *el núcleo dorsal del rafe* (Ferres-Coy et al, 2013b), aumentan tanto la proliferación, como la neurogénesis hipocampal.

A pesar de los numerosos estudios en relación a esta hipótesis, su implicación no ha sido plenamente establecida, y aún se sabe poco sobre qué factores están implicados en la

deficiencia proliferativa asociada a las enfermedades psiquiátricas. En este sentido, el 77% de los estudios en los que se elimina la neurogénesis hipocampal tanto en animales *naïve*, como en modelos animales de depresión, no es suficiente para mostrar una conducta de tipo ansioso/depresivo (Petrik et al, 2012). Sin embargo, en el resto se observa una correlación, lo que anima a seguir profundizando en el campo de la neurogénesis hipocampal y su papel en la susceptibilidad o resistencia en la enfermedad depresiva (Petrik et al, 2012).

A medida que el conocimiento en el campo avanzaba, otros procesos neuroplásticos a través de los cuales el cerebro percibe, adapta y responde a una variedad de estímulos internos y externos, fueron adquiriendo importancia. Por ello, además de la proliferación neuronal, otros tipos de neuroplasticidad como la plasticidad sináptica, que también se regula por los tratamientos antidepresivos (Chen et al, 2001a; Thome et al, 2000), fueron propuestos en la biología de la depresión (Duman et al, 1999). Junto con el *hipocampo*, la *corteza prefrontal* (*prefrontal cortex*, PFCx) es una región muy sensible al estrés, el cual induce cambios como la reducción del número y longitud de las espinas dendríticas en las neuronas piramidales de esta área (Cook & Wellman, 2004; Penzes et al, 2011; Radley et al, 2004). Estas modificaciones plásticas reflejarían una vulnerabilidad a padecer episodios depresivos (Blugeot et al, 2011).

### 1.3.3. HIPÓTESIS GLUTAMATÉRGICA

La mayoría de las investigaciones sobre el trastorno depresivo y su tratamiento se han fundamentado en los sistemas monoaminérgicos. Las limitaciones que presenta la teoría clásica de la enfermedad, han obligado a ampliar el estudio a otros sistemas de neurotransmisión para tratar de dar una mejor explicación a la etiopatogenia de la depresión, y buscar nuevas dianas terapéuticas, con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes. Recientes estudios apuntan al sistema glutamatérgico como un buen candidato (Abdallah et al, 2015; Papakostas & Ionescu, 2015).

El glutamato, principal neurotransmisor excitatorio del SNC, es liberado en sinapsis por todo el cerebro, donde participa activamente en procesos de neuroplasticidad como la sinaptogénesis (Hayashi et al, 2000). En la patología depresiva se han descrito diversas alteraciones del sistema glutamatérgico, como niveles elevados del neurotransmisor en el plasma, líquido cefalorraquídeo y cerebro de pacientes con depresión (Sanacora et al,

2008). Las células gliales regulan la concentración sináptica de glutamato, por lo que la reducción en la densidad de células gliales que se ha observado en PFCx de pacientes deprimidos podrían contribuir a la patología depresiva (Gosselin et al, 2009; Miguel-Hidalgo et al, 2000; Ongur et al, 1998). Esto conlleva un aumento en las concentraciones de glutamato (Sanacora et al, 2004), provocando daño neuronal como consecuencia del efecto excitotóxico causado por una hiperactivación de los receptores NMDA (Olney et al, 1989; Olney et al, 1991). En línea con lo observado en humanos, existen trabajos realizados en modelos animales donde se muestra como el estrés crónico produce una conducta de tipo depresivo, asociado a un daño en astrocitos corticales (Banasz et al, 2010; Cotter et al, 2002; Cotter et al, 2001a; Cotter et al, 2001b), así como en otras áreas importantes en la patología como la *amígdala* (Bowley et al, 2002). La administración crónica de antidepresivos clásicos como imipramina o citalopram en ratón, provocan cambios sostenidos en el *binding* de los receptores NMDA (Skolnick et al, 1996), apoyando la implicación de este receptor en el efecto antidepresivo.

La administración aguda parenteral de ketamina, antagonista del receptor NMDA, produce la mejoría en pacientes diagnosticados de depresión y resistentes a los antidepresivos convencionales, pocas horas después de la administración (Berman et al, 2000; Zarate et al, 2006). Este hecho provocó el interés por el glutamato en el mecanismo antidepresivo de acción rápida, implicando otros componentes del sistema glutamatérgico como el receptor del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), que promueve la modulación del factor neurotrófico BDNF, y la vía de la diana de rapamicina en células de mamífero o mTOR (*mammalian target of rapamycin*), favoreciendo finalmente los procesos de plasticidad sináptica. Esto muestra como las diferentes hipótesis propuestas sobre la enfermedad no son mutuamente excluyentes, encontrándose en muchos casos estrechamente ligadas, como en este caso las hipótesis glutamatérgica y la neurotrófica/neuroplástica.

Sin embargo, otros mecanismos de acción complementarios a la activación de la vía de mTOR, han sido propuestos para los compuestos con acción antidepresiva a través del antagonismo del receptor NMDA. Estos mecanismos incluyen la regulación de la señalización a través de monoaminas (Tan et al, 2012), opioides (Williams & Schatzberg, 2016), sistemas inflamatorios (Dale et al, 2012), o incluso mecanismos epigenéticos (Choi et al, 2015), aunque son necesarios más estudios para poder extraer conclusiones de los

procesos que subyacen en el efecto de estos compuestos basados en la neurotransmisión glutamatérgica.

A pesar de su rapidez de acción, la ketamina produce una serie de efectos adversos como síntomas psicotomiméticos y/o disociativos, a la par que un fuerte potencial adictivo (Krystal et al, 2013). Para tratar de solventar estos inconvenientes, se están llevando a cabo un gran número de investigaciones sobre los mecanismos de acción de moléculas que actúan sobre el sistema glutamatérgico, para identificar alternativas más seguras. Entre ellas encontramos los antagonistas del receptor metabotrópico de glutamato mGlu2/3 (Fukumoto et al, 2016), los antagonistas de la subunidad GluN2B del receptor NMDA (Gerhard et al, 2016), los antagonistas del sitio de unión para glicina en la subunidad GluNR1 del receptor NMDA (Murrrough et al, 2017), o las ampaquinas, moduladores alostéricos positivos del receptor AMPA (Krystal et al, 2013; Mendez-David et al, 2017). Otras estrategias de eficacia antidepressiva rápida como el uso de cannabidiol (Linge et al, 2016) o la estimulación cerebral profunda (*deep brain stimulation*, DBS) en PFCx (Jimenez-Sanchez et al, 2016) también median su efecto antidepressivo a través de la modulación de los niveles extracelulares de glutamato.

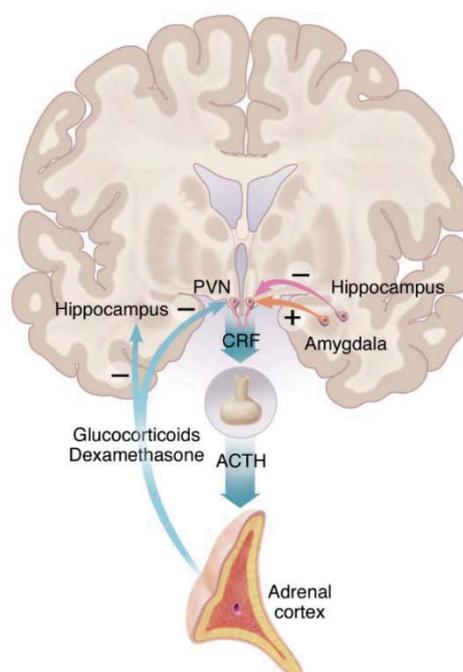
En la actualidad no se ha aprobado para la clínica ningún compuesto glutamatérgico. La complejidad del sistema, el gran número de isoformas de las subunidades que conforman los receptores, así como las numerosas vías de señalización que pueden regular, continúan siendo las principales limitaciones de los compuestos basados en el sistema glutamatérgico.

#### **1.3.4. HIPÓTESIS NEUROENDOCRINA**

Los datos más robustos en relación a estudios neuroendocrinos, son aquellos que relacionan los trastornos del estado del ánimo con una desregulación del eje *hipotálamo-hipófisis (pituitaria)-corteza adrenal* (HPA) (Boyer, 2000). El funcionamiento del eje (fig. 2) se inicia con la secreción del factor liberador de corticotropina (*corticotropin releasing factor*, CRF) en el *núcleo paraventricular del hipotálamo*, lo que estimula la síntesis y la liberación de la hormona adrenocorticotropina (*adrenocorticotropic hormone*, ACTH) por parte de la *glándula pituitaria*, en la *hipófisis*. Una vez en la *corteza adrenal*, la ACTH promueve la liberación de glucocorticoides como el cortisol o la corticosterona, que actúan

regulando negativamente la secreción de CRF y ACTH como mecanismo adaptativo (Herman & Cullinan, 1997).

La alteración de la regulación negativa del eje, junto con el incremento de CRF, determinan el estado de hiperactividad del eje HPA, sugiriéndose su normalización como una forma de remitir la enfermedad (Pariante & Lightman, 2008). Dicha hiperactividad se refleja en el aumento de los niveles de CRF observados por primera vez en el líquido cefalorraquídeo de pacientes diagnosticados de depresión mayor (Nemeroff et al, 1984), así como en saliva, plasma y orina (Nemeroff & Vale, 2005), junto con la hipertrofia de las *glándulas adrenales y pituitaria*. El aumento de los niveles de CRF está asociado a la desensibilización de los receptores de CRF observada en *hipocampo, amígdala y corteza frontal* (Boyer, 2000; Nemeroff et al, 1988). Es más, se ha encontrado una elevada comorbilidad de depresión en pacientes que sufren del síndrome de Cushing o hipercortisolismo (Sonino & Fava, 2002).



**Figura 2.** Eje *hipotálamo-pituitaria-adrenal* y regulación negativa mediada por el *hipocampo* y el PVN. PVN, *núcleo paraventricular del hipotálamo*; CRF, *factor liberador de corticotropina*; ACTH, *adrenocorticotropina*. Tomado de Nestler et al. (2002).

Por el contrario estudios en pacientes con depresión mayor revelaron una reducción de los niveles de CRF en LCR tras el tratamiento con SSRI (De Bellis et al, 1993), o la terapia electroconvulsiva (Nemeroff et al, 1991), así como una disminución en los niveles de cortisol tras el tratamiento con antidepresivos clásicos, litio, terapia electroconvulsiva y estimulación magnética transcraneal (McKay & Zakzanis, 2010).

La importancia de la relación entre la desregulación del eje HPA y depresión, es evidenciado en modelos animales de esta enfermedad, que se basan en diferentes protocolos de estrés (Gao et al, 2017; Marcilhac et al, 1997; van Oers et al, 1998). Por otro lado, el modelo animal de depresión basado en la administración crónica de corticosterona (Gourley et al, 2009; Krishnan & Nestler, 2008), simulando la hiperactividad del eje HPA, muestra anhedonia y otras conductas relacionadas con la depresión, las cuales son revertidas por la administración crónica de fármacos antidepresivos (Gourley & Taylor, 2009). Estos modelos animales también presentan los cambios neuroquímicos y morfológicos propios de la enfermedad, como déficits en proliferación y neurogénesis hipocampales (Gourley et al, 2008a; Murray et al, 2008), que son revertidos por el tratamiento de fármacos antidepresivos que potencian la actividad monoaminérgica (Murray et al, 2008). Estos datos sirvieron para relacionar el aumento de los glucocorticoides, con la disminución de la neuroplasticidad hipocampal (Duman et al, 1997; Haynes et al, 2004; Wong & Herbert, 2006), demostrando una vez más la estrecha relación entre las hipótesis postuladas.

### 1.3.5. HIPÓTESIS NEUROINFLAMATORIA

En los últimos años se ha propuesto una nueva teoría neuroinflamatoria para explicar la enfermedad. Esta hipótesis se basó en observaciones como la de que pacientes con depresión mayor presentan elevados los niveles de citoquinas proinflamatorias, así como los de sus receptores (Maes, 1999; Miller et al, 2009), lo que promovería una reducción de los niveles de monoaminas como la serotonina (Zhu et al, 2010). El incremento de citoquinas proinflamatorias conlleva una conducta “enferma” (*sickness behaviour*), con síntomas paralelos a los observados en pacientes de depresión (ansiedad, desánimo, pérdida de apetito, etc.) (Silverman et al, 2005). Además, diversos estudios sugieren una asociación entre polimorfismos de genes que codifican para ciertas citoquinas

como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) o la interleucina 1 (IL-1), y la susceptibilidad a padecer el trastorno (Fertuzinhos et al, 2004; Jun et al, 2003; Rosa et al, 2004).

## 2. SISTEMA SEROTONÉRGICO

El sistema serotonérgico se encuentra asociado a un número elevado de procesos fisiológicos como la regulación endocrina, el control de la temperatura, el apetito, la conducta sexual, la nocicepción, la actividad motora, los ritmos circadianos, y el control de procesos de memoria y aprendizaje, participando de forma directa o indirecta (Meyer-Bernstein & Morin, 1998; Morin & Blanchard, 1991; Pace-Schott & Hobson, 2002; Rosen et al, 1999). Además, alteraciones de este sistema de neurotransmisión poseen un papel importante en las patologías psiquiátricas como la depresión mayor entre otras (Graeff et al, 1996; Mann, 1999).

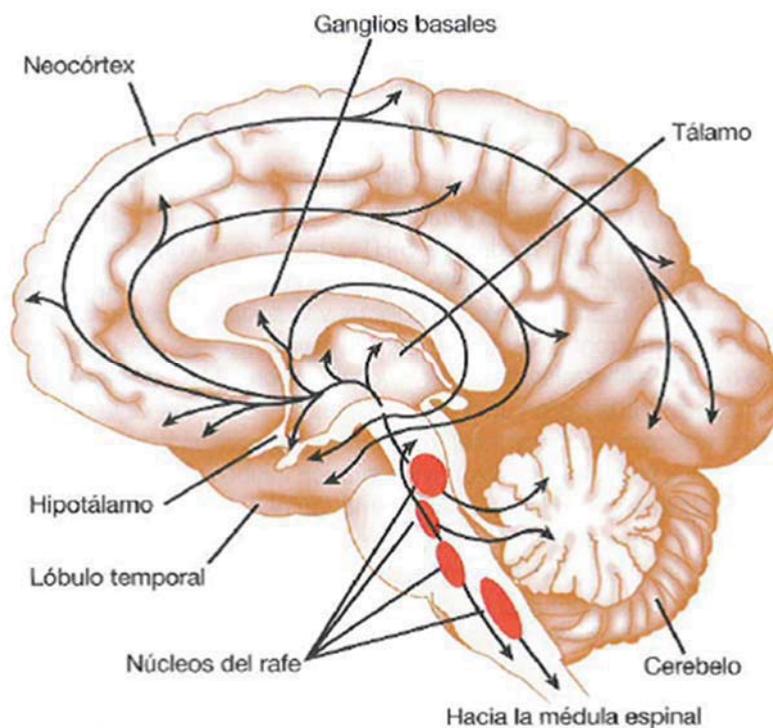
Las neuronas serotonérgicas presentes en los *núcleos del rafe* actúan como moduladoras de su propia actividad, gracias a la existencia de sinapsis a nivel somatodendrítico. Este mecanismo de regulación, llevado a cabo por los autorreceptores es de vital importancia fisiológica y/o farmacológica en la patología, lo que se comentará en detalle más adelante. Aunque los *núcleos del rafe* poseen una elevada proporción de neuronas serotonérgicas, una gran cantidad de tipos celulares están presentes en esta estructura como las neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas o dopaminérgicas (Adell et al, 2002). Además, estos núcleos reciben proyecciones de diferentes áreas cerebrales, llegando hasta ellos terminaciones glutamatérgicas, colinérgicas, GABAérgicas y noradrenérgicas (Artigas, 2013a; Artigas, 2013b), lo que demuestra la elevada complejidad de este sistema de neurotransmisión cerebral. Gracias a la complejidad y diversidad de la comunicación entre las neuronas serotonérgicas y otros tipos celulares del SNC, así como a su presencia en el sistema nervioso periférico, participa en una gran variedad de funciones.

## 2.1. NEUROANATOMÍA DEL SISTEMA SEROTONÉRGICO

Las neuronas serotonérgicas, aquellas que sintetizan, almacenan, liberan y degradan serotonina, fueron descritas por primera vez en los años 60 del siglo XX, gracias a técnicas de inmunofluorescencia (Dahlstrom & Fuxe, 1964). Los cuerpos de estas neuronas se encuentran en la región medial y paramedial, a lo largo del *mesencéfalo*, la *protuberancia* y el *bulbo*, en los denominados *núcleos del rafe*. Los somas de las neuronas serotonérgicas se dividen en 9 grupos de neuronas (B1-9), las cuales envían sus proyecciones prácticamente a todo el SNC (Jacobs & Azmitia, 1992) (fig. 3). Las principales vías serotonérgicas que se proyectan a partir de estos grupos son las siguientes:

- 1. Vía ascendente ventral:** los cuerpos o somas de estas neuronas se sitúan en el *núcleo central superior de Bechterev* (B6-B8) y en el *núcleo dorsal del rafe* (B7). Algunas de sus proyecciones atraviesan el *mesencéfalo* y alcanzan el *núcleo peduncular* y la *sustancia negra*; otras alcanzan a los *núcleos habenulares* y los *centros talámicos medial, parafascicular* y de la *línea media*; y otras fibras logran extender sus proyecciones hasta el *hipotálamo lateral*, el *cuerpo mamilar*, el *núcleo caudado*, el *putamen* y el *neocórtex*. Por delante del *hipotálamo*, esta vía se divide en varias proyecciones que inervan diversas estructuras del sistema límbico como el *hipocampo*, la *amígdala* o la *corteza entorrinal*.
- 2. Vía ascendente dorsal:** estas neuronas nacen en el *núcleo magno del rafe* (B3), en los *núcleos pontinos del rafe* (B5) y en el *núcleo central superior del rafe* (B6). Sus proyecciones se dirigen principalmente hacia el área posterior del *hipotálamo* y hacia la *sustancia gris periacueductal*, aunque la *superficie endimaria* y los *plexos coroideos* también reciben conexiones de estas células.
- 3. Vía cerebelosa:** tiene su origen en los *núcleos* B5 y B6 e inerva los *núcleos profundos* y la *corteza del cerebelo*.
- 4. Vía descendente propiobulbar:** estas neuronas proyectan a otros núcleos del tronco como son el *locus coeruleus*, la *formación reticular, bulbar y pontina*, el *núcleo tegmental dorsal* y el *complejo olivar* desde los *núcleos* B6 a B8 y desde B3 a B5.
- 5. Vía descendente bulboespinal:** desde los *núcleos oscuros, magno y ambiguo del rafe* (B1 a B3), desciende por los cordones anteriores y laterales de la *médula*

finalizando en las *astas anteriores* y *posteriores* de la *médula*, y en el *núcleo intermediolateral*.



**Figura 3.** Principales vías serotoninérgicas cuyo origen se localiza en los *núcleos del rafe*, y sus diversas y complejas proyecciones. Modificado de Flórez & Pazos (2014).

## 2.2. NEUROQUÍMICA DEL SISTEMA SEROTONÉRGICO

La 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT), junto con el resto de catecolaminas, forma parte de la familia de aminas biógenas. Tras ser aislada e identificada (Rapport et al, 1948), se reveló su estructura química observándose que estaba formada por un anillo indólico y una cadena lateral etilamino. Este neurotransmisor se sintetiza tanto en las neuronas serotoninérgicas del SNC, como a nivel periférico en las células enterocromafines del intestino a partir del aminoácido L-triptófano procedente de la dieta. Este aminoácido esencial, en el primer paso limitante de la síntesis de la 5-HT, es hidroxilado por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), que lo transforma en 5-hidroxitriptófano (5-HTP). En el siguiente paso, el 5-HTP es descarboxilado a través de la enzima L-aminoácido descarboxilasa (LAD) que lo convierte en 5-HT, la cual es rápidamente almacenada en

vesículas mediante su propio transportador, evitando así ser degradada por la enzima monoaminoxidasa (MAO) de localización intracelular. De esta forma, el neurotransmisor está preparado para su liberación a la hendidura sináptica tras producirse la despolarización en la terminación nerviosa con la respectiva entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula. La 5-HT liberada puede: i) actuar sobre receptores específicos, ii) difundir al espacio extrasináptico, o iii) ser recaptada al interior celular por los transportadores de 5-HT (5-HTT), sistema específico y de elevada afinidad localizado en la terminación nerviosa. Una vez en el interior de la neurona serotonérgica, la 5-HT puede ser acumulada de nuevo o ser degradada, principalmente mediante una desaminación oxidativa catalizada por la MAO (esencialmente por la isoforma A). Seguidamente, sufre un proceso oxidativo por la acción de la enzima aldehído deshidrogenasa, para transformarse en su principal metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) que se difunde al espacio extracelular y al líquido cefalorraquídeo.

## 2.3. RECEPTORES SEROTONÉRGICOS

La serotonina ejerce sus acciones a través de al menos catorce subtipos de receptores específicos, divididos en siete familias: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>. Con la excepción de los receptores 5-HT<sub>3</sub> que son canales iónicos activados por ligando (Derkach et al, 1989), todos los receptores serotonérgicos forman parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (*G protein coupled receptors*, GPCRs) (Millan et al, 2008). A continuación, se describen aquellos subtipos de receptores serotonérgicos con más importancia para este trabajo de tesis.

### ***Receptor 5-HT<sub>1A</sub>***

Este subtipo de receptor, se encuentra dentro de la familia de receptores 5-HT<sub>1</sub> y posiblemente sea uno de los receptores serotonérgicos más estudiados y caracterizados. El receptor 5-HT<sub>1A</sub> en muestras humanas y en modelos animales, muestra una elevada implicación tanto en el origen, como en el tratamiento de la patología depresiva (Akimova et al, 2009; Hirvonen et al, 2008; Le Francois et al, 2008; Strobel et al, 2003). Este receptor, tras su activación, se acopla a proteínas Gi/o, modulando un gran número de cascadas de

señalización intracelulares, incluyendo la inhibición de la producción de cAMP, la inactivación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación de canales de  $\text{K}^+$  (Barnes & Sharp, 1999).

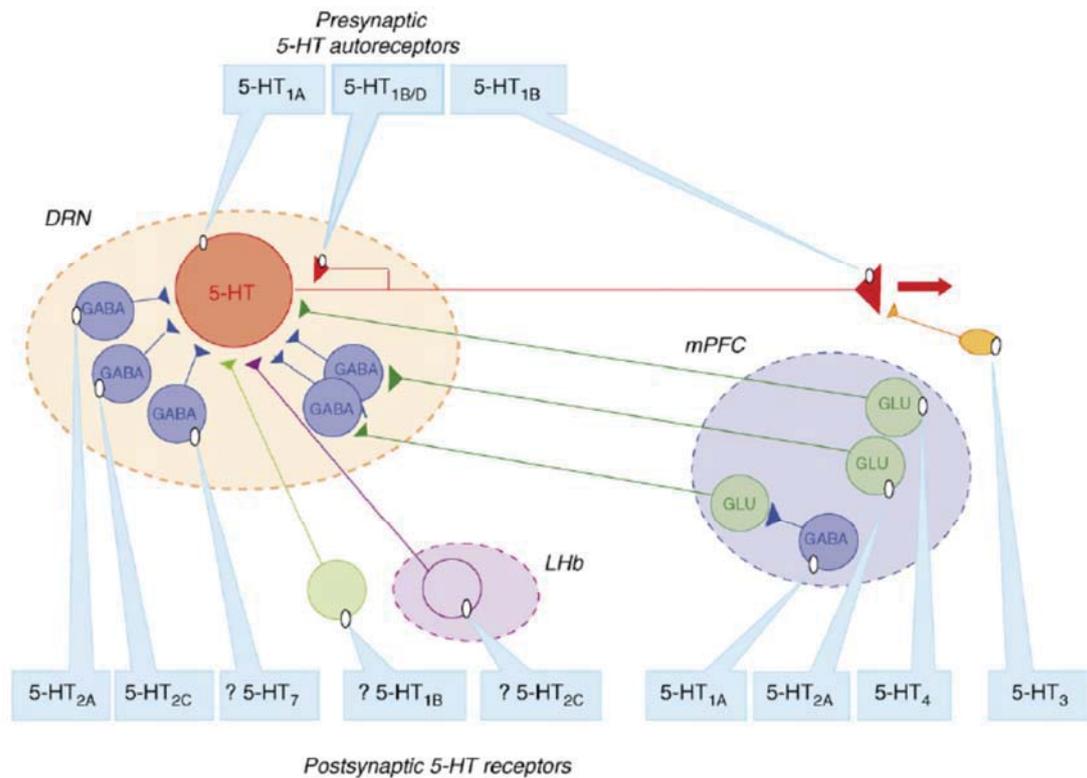
La distribución de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en el SNC es extensa y variada, encontrándose en mayor densidad en los *núcleos del rafe*, tanto *dorsal* como *medial* (DRN, MRN), áreas del *septo lateral*, el *hipocampo* y en la *corteza entorrinal* (Khawaja, 1995; Pazos & Palacios, 1985). Este receptor está presente también en otras regiones del SNC correspondiendo a los *ganglios basales* y el *tronco del encéfalo* donde a excepción de los *núcleos del rafe*, se encuentran en menor densidad (Hall et al, 1997).

Atendiendo a la ubicación de los receptores con respecto a las neuronas que constituyen el sistema serotoninérgico central existen dos subpoblaciones. Los heterorreceptores, de localización postsináptica en áreas de proyección las cuales reciben inervación serotoninérgica, y los autorreceptores, que se localizan en el soma y en las dendritas de las neuronas serotoninérgicas localizadas en los *núcleos del rafe* (fig. 4).

Los heterorreceptores se localizan principalmente en neuronas piramidales y en interneuronas GABAérgicas (Artigas et al, 2006; Azmitia et al, 1996; Palchoudhuri & Flugge, 2005; Santana et al, 2004). Su activación en las neuronas piramidales de *hipocampo*, *amígdala* o *corteza prefrontal*, produce una respuesta hiperpolarizante en las neuronas piramidales en respuesta a la serotonina liberada, tras acoplarse a las subunidades G $\alpha$ o y G $\alpha$ i3, dependiendo de la estructura cerebral donde se produce la activación (Andrade et al, 1986; Hamon et al, 1990; Mannoury la Cour et al, 2006).

Por otro lado, la activación somatodendrítica de los autorreceptores, hiperpolariza y disminuye la frecuencia de descarga de las neuronas serotoninérgicas, lo que provoca un descenso de los niveles extracelulares de 5-HT en áreas de proyección (Hjorth & Sharp, 1991; Meller et al, 1990; Sprouse & Aghajanian, 1986). Debido a ello, la liberación local de 5-HT en las inmediaciones de los *núcleos del rafe*, actúa como mecanismo regulador negativo de la liberación del neurotransmisor (Adell et al, 1991; Artigas et al, 1996; Bang et al, 2012). Algunos trabajos sugieren que los mecanismos de señalización intracelulares inducidos por la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados en los *núcleos del rafe*, son diferentes a los activados en otras áreas, estando mediados por el acople a las subunidades G $\alpha$ i3 de la proteínas G, lo que provoca una inhibición parcial de la enzima

adenilato ciclasa (*adenilil cyclase*, AC) (Marazziti et al, 2002; Palego et al, 1999; Valdizan et al, 2010a).



**Figura 4.** Esquema de la localización de los auto- y heterorreceptores serotoninérgicos implicados en el control de la frecuencia de descarga de diferentes poblaciones neuronales dentro del SNC. Los autorreceptores se sitúan tanto en los cuerpos de las neuronas serotonérgicas, dentro del *núcleo dorsal del rafe* (5-HT<sub>1A</sub>), como en los axones terminales (5-HT<sub>1B</sub>). Los heterorreceptores, localizados en neuronas no serotonérgicas, controlan la función de éstas, activando o inhibiendo su actividad. El control de la funcionalidad del *núcleo dorsal del rafe* se ejerce en parte por las conexiones que provienen de la *corteza prefrontal medial*. DRN, *núcleo dorsal del rafe*; LHb, *núcleo lateral de la habénula*; mPFC, *corteza prefrontal medial*; 5-HT, neuronas serotonérgicas; Glu, neuronas glutamatérgicas; GABA, neuronas GABAérgicas. Tomado de Sharp et al. (2007).

### **Receptor 5-HT<sub>1B</sub>**

Este miembro de la familia de receptores 5-HT<sub>1</sub>, se acopla a las proteínas G del tipo Gi/Go tras su activación (Hamblin & Metcalf, 1991; Maroteaux et al, 1992), disminuyendo los niveles de cAMP (Bouhelal et al, 1988). Otros autores han propuesto mecanismos alternativos por los que estos receptores 5-HT<sub>1B</sub> podrían estar actuando dentro del SNC. Estos mecanismos van desde la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) (Pullarkat et al, 1998), a la modulación de la

proteína quinasa B o Akt, la activación de la óxido nítrico sintasa neuronal (*nitric oxide synthase*, NOS) y las fosfolipasas C y D (*phospholipase C*, PLC y *phospholipase D* PLD), la inhibición de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación de canales de  $\text{K}^{+}$  (Raymond et al, 2001).

Estudios de fijación de radioligandos selectivos y no selectivos para el receptor 5-HT<sub>1B</sub>, permitieron mediante autorradiografía localizar las estructuras del SNC donde se expresa este receptor. Las densidades mayores correspondieron a los *ganglios basales*, concretamente al *globo pálido* y la *sustancia negra*; densidades intermedias se observaron en el *hipocampo*, los *colículos*, la *sustancia gris periacueductal* o el *núcleo entopeduncular*; y las densidades más bajas se localizaron en *hipotálamo*, *amígdala* y *corteza* (Bonaventure et al, 1997; Bruinvels et al, 1993; Pazos & Palacios, 1985; Varnas et al, 2001).

El receptor 5-HT<sub>1B</sub> funciona como autorreceptor en neuronas serotoninérgicas, o como heterorreceptor en neuronas no serotoninérgicas contribuyendo a la regulación de la liberación de los diferentes neurotransmisores (Barnes & Sharp, 1999; Sari, 2004) (fig. 4).

Diversos estudios han descrito la disminución en la liberación de 5-HT producida por la activación de los autorreceptores 5-HT<sub>1B</sub> tras la administración sistémica o local de agonistas selectivos contra este subtipo en áreas de proyección como el *hipocampo* (Bosker et al, 1995; Martin et al, 1992a), la *corteza frontal* (Sleight et al, 1989), o el *hipotálamo* (Moret & Briley, 2000). Además, se ha descrito que la activación de los autorreceptores localizados perisomáticamente en DRN y MRN, inhiben la frecuencia de descarga de estas neuronas así como la liberación de 5-HT en estos núcleos (Adell et al, 2001).

En referencia a la activación de los heterorreceptores, la literatura muestra efectos inhibitorios en la liberación de diferentes neurotransmisores y en diferentes estructuras cerebrales, apoyando la presencia de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> en neuronas no serotoninérgicas. En este sentido, estudios *in vitro*, han descrito la disminución de la liberación de acetilcolina en *hipocampo* de rata (Cassel et al, 1995; Maura & Raiteri, 1986), y la reducción en la liberación del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (*gamma-aminobutyric acid*, GABA) (Johnson et al, 1992; Stanford & Lacey, 1996). De manera contraria, la activación de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> favorece la liberación de dopamina en áreas de proyección como la *corteza prefrontal* (Iyer & Bradberry, 1996) o el *estriado* (Benloucif et al, 1993; Galloway et al, 1993), indicando la localización del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en interneuronas GABAérgicas (Alex & Pehek, 2007; Fink & Gothert, 2007).

### ***Receptor 5-HT<sub>4</sub>***

Este subtipo de receptor serotoninérgico también pertenece a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G. Este receptor se une a proteínas Gs, activando la AC e incrementando por tanto los niveles de cAMP intracelulares (Hoyer et al, 2002). El incremento de este segundo mensajero conduce a la activación de la proteína quinasa A (*protein kinase A*, PKA) dependiente de cAMP (Andrade & Chaput, 1991; Eglen et al, 1995; Fagni et al, 1992), y posteriormente a la inhibición de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje. Aunque también se ha propuesto que la activación del receptor 5-HT<sub>4</sub> puede modular señales intracelulares por medio de mecanismos independientes de proteínas G, como por ejemplo, a través de la activación de MAPK (Barthet et al, 2007). Los procesos resultantes de la activación del receptor 5-HT<sub>4</sub>, implican aumento de la excitabilidad neuronal, lo que favorece la liberación de neurotransmisores.

La publicación de la estructura del gen que codifica para el receptor en humano reveló la existencia de 10 isoformas diferentes (a-i) (Bach et al, 2001; Bender et al, 2000; Blondel et al, 1997; Mialet et al, 2000; Van den Wyngaert et al, 1997). De todas ellas, las variantes a y b son las mejor caracterizadas, debido a que son las más abundantes en SNC (Vilaro et al, 2005). Los receptores 5-HT<sub>4</sub> presentan una amplia distribución en el cerebro, expresándose en forma de heterorreceptores en áreas de proyección, principalmente en *corteza prefrontal, hipocampo y amígdala, y ganglios basales (caudado-putamen y pálido ventral)* (Vilaro et al, 1996; Vilaro et al, 2005; Waeber et al, 1994). Diversos estudios neuroquímicos y del comportamiento han sugerido que, en estas áreas, el receptor 5-HT<sub>4</sub> posee un papel importante regulando la liberación de varios tipos de neurotransmisores como acetilcolina, GABA, DA y 5-HT, potenciando la transmisión en el cerebro. De esta manera promueve excitabilidad neuronal en las células piramidales del *hipocampo* (Roychowdhury et al, 1994), y en las neuronas serotoninérgicas del DRN, aumentando su frecuencia de descarga regulada desde la *corteza frontal* (Lucas & Debonnel, 2002) (fig. 4).

## 2.4. SISTEMA SEROTONÉRGICO EN DEPRESIÓN MAYOR

Tras el descubrimiento fortuito de los primeros antidepresivos, la investigación sobre las bases etiológicas del trastorno, así como la síntesis de nuevos antidepresivos se focalizaron en gran medida sobre el sistema serotoninérgico. La disminución en el *binding* de [<sup>3</sup>H]imipramina en cerebro *postmortem* de pacientes deprimidos se halla entre las primeras evidencias que relacionaban una hipofuncionalidad del sistema serotoninérgico con la patogenia de la enfermedad (Perry et al, 1983; Stanley et al, 1982). También fueron descritas alteraciones en el receptor 5-HT<sub>2</sub>, como incrementos de su densidad en la *corteza frontal* de pacientes diagnosticados de depresión (Arango et al, 1990; Arora & Meltzer, 1989; D'Haenen et al, 1992; Mann et al, 1986). Estos resultados parecían indicar posibles mecanismos adaptativos a la hipofuncionalidad monoaminérgica propuesta, aunque resultados discordantes no tardaron en aparecer, revelando una ausencia de cambios (Meyer et al, 1999), o reducciones de los niveles de 5HT<sub>2</sub> en *corteza frontal* (Yatham et al, 1999).

Además de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, la implicación de los otros subtipos de receptores serotoninérgicos y su participación en la etiopatología del trastorno depresivo, también han sido estudiados por un gran número de investigadores. A continuación, se describen los hallazgos más relevantes en relación a los receptores estudiados en este trabajo de tesis.

### ***Receptor 5-HT<sub>1A</sub>***

El receptor 5-HT<sub>1A</sub>, está alterado en pacientes diagnosticados de depresión mayor y trastornos del estado de ánimo. Los estudios realizados mediante técnicas de neuroimagen y en cerebro *postmortem* a través del uso de [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT en autorradiografía de receptores indican que en la depresión mayor existe un aumento en los niveles del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> en DRN de pacientes deprimidos suicidas (Boldrini et al, 2008; Stockmeier et al, 1998), mientras que se describe una reducción en la expresión de estos receptores en áreas de proyección (Arranz et al, 1994; Boldrini et al, 2008; Cheetham et al, 1990; Dillon et al, 1991; Joyce et al, 1993; Parsey, 2010). Debido a la naturaleza inhibitoria del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, un incremento en los niveles de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en los *núcleos del rafe* produce una disminución de la frecuencia de descarga de estas neuronas y una reducción de la liberación de serotonina en áreas de proyección. Sin embargo, otros

estudios muestran una disminución en el *binding* del autorreceptor (Drevets et al, 1999; Drevets et al, 2007; Meltzer et al, 2004).

El papel de los heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> dentro de la patología depresiva también ha sido evaluado. Los análisis muestran una disminución en la densidad de estos receptores en áreas corticales y subcorticales, a través de estudios PET (*Positron Emission Tomography*, PET) en pacientes depresivos tratados y no tratados, así como en pacientes en remisión sin tratar (Bhagwagar et al, 2004; Drevets et al, 2000; Drevets et al, 2007; Sargent et al, 2000). Esta disminución en funcionalidad de los heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> que regulan cognición y emoción (Albert et al, 2014), estaría asociada en parte con la alteración de estas funciones en los pacientes diagnosticados de depresión. Por otro lado, existen trabajos en desacuerdo con los anteriores donde se aprecia un incremento de la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> presentes en áreas de proyección (Arango et al, 1995; Parsey et al, 2006), o ausencia de cambios (Lowther et al, 1997; Meltzer et al, 2004; Stockmeier et al, 1997). Los estudios en humano, especialmente en cerebros *postmortem*, incluyen variables como el género, variedad de tratamientos farmacológicos, estado de la muestra, etc., que pueden dificultar la obtención de resultados homogéneos, favoreciendo las controversias observadas.

Las aproximaciones preclínicas realizadas en relación al receptor 5-HT<sub>1A</sub> apoyan el papel del receptor en los trastornos del estado del ánimo. En modelos animales de estrés, se ha descrito una reducción de la funcionalidad de los heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>, en áreas como el *hipocampo*, *corteza* e *hipotálamo* (Hensler et al, 2007; Karten et al, 1999; Lopez et al, 1998; McKittrick et al, 1995; Watanabe et al, 1993). Animales *knockout* para este receptor presentan un fenotipo ansioso (Heisler et al, 1998; Parks et al, 1998; Ramboz et al, 1998), sin alteraciones en los niveles del neurotransmisor 5-HT determinados mediante experimentos de microdiálisis *in vivo* en áreas como *hipocampo*, *estriado*, *corteza frontal* o *núcleos del rafe* (Bortolozzi et al, 2004; Guilloux et al, 2006; Knobelmann et al, 2001). Sin embargo, estos animales no presentan un notable comportamiento de tipo depresivo, aunque sí una respuesta exagerada al estrés agudo (Van Bogaert et al, 2006). La expresión del heterorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> en ausencia de los autorreceptores (Gross et al, 2002), revierte la conducta ansiosa revelada en los animales *knockout*, sugiriendo que la conducta ansiosa es modulada en parte por los receptores 5-HT<sub>1A</sub> postsinápticos (Akimova et al, 2009; Goodfellow et al, 2009; Gross & Hen, 2004). Resultados contrarios se han descrito en un

estudio donde se determina la implicación de los auto y heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> de manera independiente en la conducta ansiosa, asociando el receptor 5-HT<sub>1A</sub> presináptico con ese tipo de comportamiento (Richardson-Jones et al, 2011). Otros modelos animales como los ratones *knockout* para el receptor del sistema endocannabinoide CB1, que presentan una conducta de tipo depresivo, también muestran asociada una menor funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el área CA1 del *hipocampo* (Mato et al, 2007).

Adicionalmente, un elevado número de trabajos clínicos y básicos asocian al receptor 5-HT<sub>1A</sub> al efecto de los fármacos antidepresivos. En este sentido, como consecuencia de su papel en la regulación negativa de la liberación de 5-HT, los autorreceptores condicionan el incremento inicial de los niveles extracelulares del neurotransmisor inducido por la administración de SSRI (Hervas et al, 2000; Hjorth & Auerbach, 1994; Hjorth et al, 1996). Este hecho se ha propuesto como el causante del retraso en la aparición del efecto de los fármacos antidepresivos convencionales (Artigas et al, 1996; Blier & De Montigny, 1983; Gardier et al, 1996). Esto incluye en el mecanismo de acción de estos fármacos, la necesidad de la desensibilización de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> (Dawson & Nguyen, 2000), permitiendo así el restablecimiento de la frecuencia de descarga y que los niveles de 5-HT en el espacio sináptico se incrementen (Blier & De Montigny, 1983; El Mansari & Blier, 2005).

### ***Receptor 5-HT<sub>1B</sub>***

Evidencias preclínicas asocian a este receptor con la patología depresiva aunque existen controversias con respecto a su implicación (Ruf & Bhagwagar, 2009; Sari, 2004). Se ha descrito que los niveles del mRNA del receptor 5-HT<sub>1B</sub> se encuentran disminuidos en muestras *postmortem* de pacientes diagnosticados de depresión mayor, en paralelo a una reducción del mRNA de la proteína S100A10 o p11, que interacciona con el receptor 5-HT<sub>1B</sub>, incrementando la localización de este receptor en la superficie de la membrana celular (Svenningsson et al, 2006), cambios que parecen ser dependientes del área cerebral (Anisman et al, 2008). Estudios en ratones *knockout* en los que se eliminó la proteína p11, mostraron una disminución de la densidad y de la funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub>, acompañado de un fenotipo de tipo depresivo representado por un estado anhedónico y mayores tiempos de inmovilidad en el test de suspensión de la cola (Svenningsson et al,

2006). Sin embargo, otros estudios en cerebro humano *postmortem* no muestran diferencias en el *binding* del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en la *corteza prefrontal* (Huang et al, 1999). Además, estudios de los SNPs G861 y C129T en el gen del receptor 5-HT<sub>1B</sub> no han mostrado una correlación entre su frecuencia y esta patología (Arango et al, 2003; Huang et al, 1999).

Estudios preclínicos del receptor 5-HT<sub>1B</sub>, demuestran como la funcionalidad a través de este receptor puede modular tanto la conducta ansiosa como la de tipo depresivo. Así, su activación produce un efecto ansiogénico (Lin & Parsons, 2002; Sari, 2004), dependiendo de su localización anatómica (Sari, 2004). En concreto, la sobreexpresión del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en DRN, induce un fenotipo más susceptible a la ansiedad en animales expuestos previamente a estrés, hecho que no se observa en los animales no expuestos, mostrando la relevancia de la sobreactivación de los autorreceptores 5-HT<sub>1B</sub> en la respuesta al estrés (Clark et al, 2002). Por otro lado, su activación en el *hipocampo* inhibe la liberación de acetilcolina (Maura & Raiteri, 1986), lo que se ha asociado con un fenotipo ansioso como el observado tras antagonizar los receptores nicotínicos y muscarínicos en dicha estructura cerebral (File et al, 1998).

El receptor 5-HT<sub>1B</sub> también se ha asociado con el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos, aunque esta relación no está tan estudiada como en el caso del receptor 5-HT<sub>1A</sub>. Tras la administración crónica de SSRIs, se ha observado una desensibilización de los autorreceptores 5-HT<sub>1B</sub> en las terminaciones nerviosas (Blier et al, 1988; O'Connor & Kruk, 1994), facilitando así la neurotransmisión serotoninérgica. Estos efectos no se han descrito en otros estudios (Auerbach & Hjorth, 1995; Bosker et al, 1995; Gobbi et al, 1997). Paralelamente, tratamientos crónicos con antidepresivos como la fluoxetina y la paroxetina, producen una regulación a la baja del mRNA de este subtipo 5-HT<sub>1B</sub> en el DRN (Anthony et al, 2000).

Los heterorreceptores 5-HT<sub>1B</sub> inicialmente no se asociaron con cambios en respuesta a la administración crónica de antidepresivos (Neumaier et al, 2002). Sin embargo, estudios posteriores en ratón describieron que el efecto antidepresivo de los SSRIs, en parte es mediado por estos heterorreceptores ya que, el efecto antidepresivo no se observaba tras el antagonismo farmacológico de estos receptores (Chenu et al, 2008). En este sentido, la sobreexpresión de la proteína p11 en ratón, conlleva la hiperfuncionalidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en *sustancia negra*, y una disminución en la conducta de tipo depresivo (Svenningsson et al, 2006).

El hecho más relevante en referencia a este subtipo de receptor y la depresión mayor, es la posibilidad de que la coadministración de un antagonista del receptor 5-HT<sub>1B</sub>, junto con un SSRI, pueda lograr un efecto antidepresivo de acción rápida. Evidencias preclínicas apoyan esta idea (Adell et al, 2005; Hughes et al, 2007; Moret & Briley, 2000), pero todavía queda mucho por conocer.

### ***Receptor 5-HT<sub>4</sub>***

La asociación de este subtipo de receptor serotoninérgico con la modulación de los estados del ánimo, los procesos cognitivos y la ansiedad, parámetros alterados en la patología depresiva, se describió hace ya más de una década (Lucas et al, 2007; Manuel-Apolinar et al, 2005; Matsumoto et al, 2001; Vidal et al, 2009; Vidal et al, 2010). Su implicación en la etiopatología depresiva fue más evidente tras la publicación de trabajos realizados en cerebro humano. El primero de ellos, describe como existe un aumento en la densidad de este subtipo de receptor serotoninérgico en la *corteza frontal* y en el *núcleo caudado* (Rosel et al, 2004) de pacientes suicidas con depresión mayor. El segundo trabajo, describe la asociación entre niveles disminuidos del receptor 5-HT<sub>4</sub> en el *estriado* de individuos sanos, que tienen algún miembro de su familia con depresión mayor, asociándose así estos bajos niveles de 5-HT<sub>4</sub> estriatal al riesgo familiar a padecer el trastorno (Madsen et al, 2014), apoyando así el importante papel de este receptor en las bases neurobiológicas del trastorno depresivo.

Los tratamientos crónicos con antidepresivos clásicos también regulan los receptores 5-HT<sub>4</sub>. En este sentido se ha descrito como los SSRI y SNRI inducen una disminución de la densidad de los receptores en áreas subcorticales como el *hipocampo* y el *estriado*, hecho que no se observa en los receptores 5-HT<sub>4</sub> corticales (Vidal et al, 2009; Vidal et al, 2010). Además, su implicación en la modulación de la conducta ansioso/depresiva, así como la necesidad de la activación de este receptor para obtener los efectos de la fluoxetina en determinados paradigmas conductuales se ha descrito en profundidad en una reciente publicación (Amigo et al, 2016). Es más, la administración subcrónica del agonista parcial del receptor 5-HT<sub>4</sub> RS67,333, produce un efecto antidepresivo rápido (Lucas et al, 2007; Pascual-Brazo et al, 2012), ampliando las bases

moleculares para la síntesis de nuevos compuestos con acción antidepresiva basados en el sistema serotoninérgico.

A pesar de que su implicación tanto en la neurobiología de la depresión como en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos, es bastante clara, se requiere de más estudios en el ámbito clínico y preclínico, para así poder conocer con más exactitud la elevada complejidad molecular de este receptor en relación a la patología depresiva y poder confirmar el potencial que sus agonistas selectivos parecen poseer.

### 3. NEUROGÉNESIS Y NEUROPLASTICIDAD

La neurogénesis en cerebro adulto de mamíferos se limita a dos regiones bien definidas: la zona subventricular (*subventricular zone*, SVZ), donde se generan nuevas neuronas cuyo destino final es el *bulbo olfatorio*, y la zona subgranular (*subgranular zone*, SGZ) del giro dentado del *hipocampo*, cuyas nuevas neuronas se incorporan a la capa granular del giro dentado (Henn & Vollmayr, 2004).

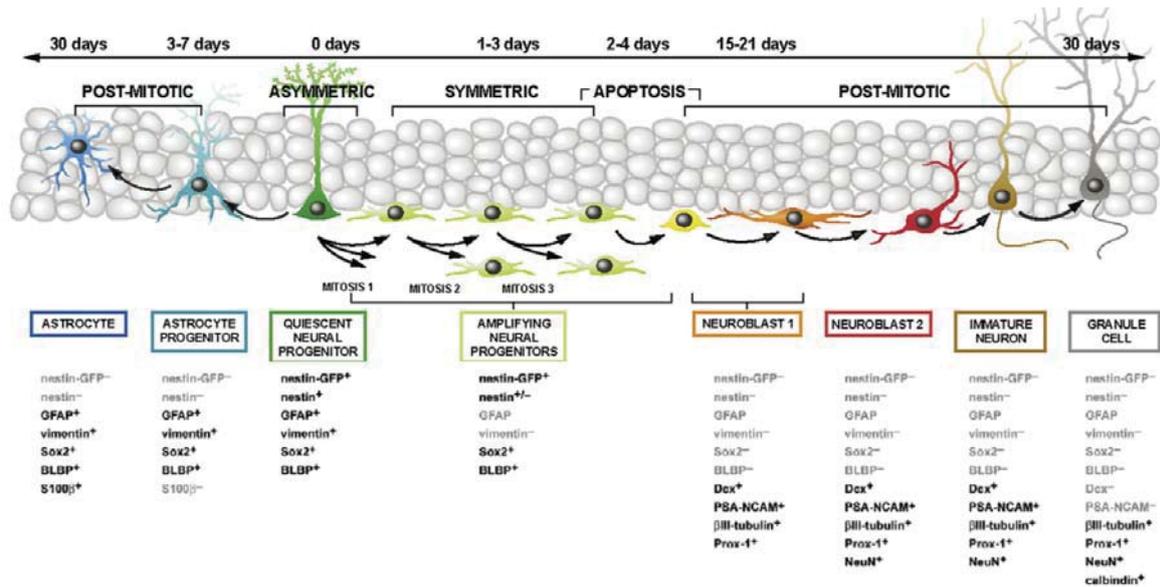
#### 3.1. PROLIFERACIÓN HIPOCAMPAL

La zona subgranular está situada entre la capa granular y el hilus del giro dentado del *hipocampo*, y proporciona un microambiente único para las células madre neurales (*neural stem cells*, NSC). Este entorno conocido como nicho neurogénico, permite la proliferación de las NSCs, y fomenta su especificación y diferenciación celular (Kempermann et al, 2015). Las nuevas neuronas que se generan a partir de las NSCs, pasan durante su desarrollo por diversas etapas consecutivas antes de ser funcionalmente integradas en la circuitería hipocampal (fig. 5).

Las células madre del giro dentado del *hipocampo* o progenitoras neurales quiescentes (*quiescent neural progenitors*, QNPs), presentan una baja tasa de proliferación (Encinas et al, 2011), poseen características morfológicas de astrogliá, y expresan marcadores característicos de los astrocitos, entre ellos la proteína fibrilar ácida de la glía (*glial fibrillary acid protein*, GFAP) o la vimentina (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009) (fig. 5). Estas células también se han denominado astrocitos radiales (*radial astrocytes*),

células radiales tipo glía (*radial glial-like cells*) o células tipo 1 (*type 1 cells*) (Eckenhoff & Rakic, 1984; Kempermann et al, 2004; Kronenberg et al, 2003; Mignone et al, 2004). Existen otro tipo de células progenitoras neurales, también localizadas en la SGZ del *hipocampo*, y caracterizadas por no expresar la proteína GFAP, que poseen mayor tasa de proliferación que las QNPs. Este tipo celular se ha definido como células progenitoras neurales amplificadoras (*amplifying neural progenitor*, ANPs), las cuales descienden de las QNPs (fig. 5) (Encinas et al, 2011). Las ANPs también se denominan células de tipo 2 (*type 2 cells*) (Goncalves et al, 2016; Kempermann et al, 2015). Una vez las ANPs salen del ciclo celular y se diferencian, van adquiriendo características de neurona, denominándose neuroblastos (*neuroblasts*, NB) o células de tipo 3 (*type 3 cells*), las cuales no presentan actividad sináptica espontánea (Esposito et al, 2005), pero son tónicamente activadas por interneuronas GABAérgicas (Ge et al, 2006). Estos neuroblastos sufren un largo proceso de maduración hasta que se diferencian a neuronas, periodo durante el cual expresan el marcador específico de las neuronas inmaduras doblecortina (*doublecortin*, DCX) (Brandt et al, 2003; Couillard-Despres et al, 2005; Rao & Shetty, 2004). Durante el proceso de maduración los NBs, a la par que experimentan cambios en los procesos dendríticos a través de la capa granular del giro dentado, van perdiendo el marcador DCX y empiezan a expresar la proteína nuclear neuronal específica NeuN (*neuronal nuclei*). Una vez las neuronas alcanzan la madurez, presentan ya propiedades electrofisiológicas similares a las neuronas ya existentes en la circuitería (Encinas et al, 2006; Lucassen et al, 2010a; Vivar & van Praag, 2013).

Dentro de la neurogénesis adulta, existen dos hipótesis bien diferenciadas. Una de ellas propone una división asimétrica de las células madre neurales (Encinas et al, 2011), donde las células QNPs se dividen de forma asimétrica en células ANPs y QNPs. Estas QNPs van lentamente consumiéndose a lo largo de las divisiones, resultando finalmente en la transformación de las QNPs en astrocitos (Encinas et al, 2011). La otra hipótesis, postula la existencia de divisiones asimétricas, así como de divisiones simétricas gracias a las cuales existiría una renovación ilimitada de estas células QNPs (denominadas por estos autores como células madre radiales gliales o *radial glia-like stem cells*, RGLs) (Bonaguidi et al, 2011).



**Figura 5.** Representación esquemática del proceso de división y diferenciación en la capa subgranular del giro dentado del hipocampo. Las QNPs tras varias divisiones generan las ANPs, que a su vez se dividen, y tras salir del ciclo celular generan neuroblastos. Éstos evolucionan hacia neuronas inmaduras que se diferencian a neuronas maduras que se integran en la capa granular. Destacar que las diferentes poblaciones pueden ser diferenciadas a nivel morfológico, proliferativo, y a través de los marcadores específicos que se expresan en cada estadio. GFAP, *glial fibrillary acid protein*; Sox2, *Sex determining region (Y-box 2)*; BLBP, *brain lipid-binding protein*; SB100 $\beta$ , *S100 Ca<sup>2+</sup>-binding protein B*; PSA-NCAM, *polysialylated-neural cell adhesion molecule*; Prox1, *prospero-related homeobox gene*; DCX, *doublecortin*. NeuN: *neuronal nuclei*. Tomado de Encinas et al. (2011).

### 3.2. VÍAS IMPLICADAS EN PROLIFERACIÓN Y PLASTICIDAD

En los últimos años se han propuesto varias vías de señalización implicadas en la proliferación y la plasticidad sinápticas, cuya actividad se encuentra disminuida en la patología depresiva, y aumentada tras el tratamiento crónico con fármacos antidepresivos de uso habitual en clínica, o nuevas moléculas con acción antidepresiva rápida (Pilar-Cuellar et al, 2014; Vidal et al, 2011). Dos de estas vías de señalización más estudiadas, y que se estudian en este trabajo, se presentan a continuación.

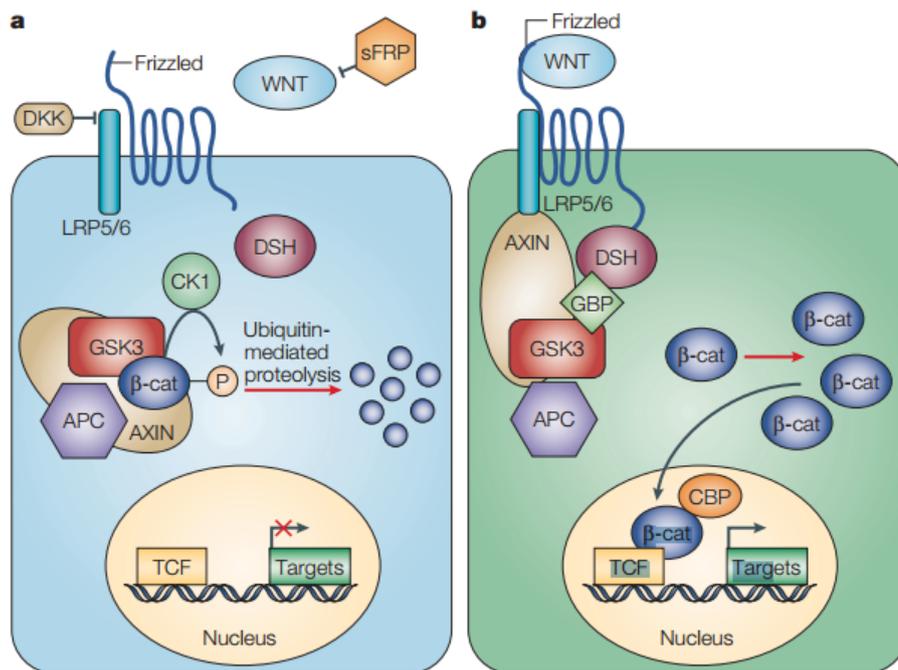
#### 3.2.1. VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA

Esta vía de señalización se describió por primera vez en *Drosophila* con el nombre de Wingless/Armadillo (Peifer et al, 1993). Desde entonces, numerosos estudios han

comprobado su implicación en la regulación génica de un amplio rango de procesos fisiológicos y patofisiológicos como son la formación sináptica (Bamji et al, 2003), la orientación axónica (Purro et al, 2008; Zagherro et al, 2007), la morfogénesis dendrítica (Gao et al, 2007; Yu & Malenka, 2003), la formación hipocampal (Galceran et al, 2000; Zhou et al, 2004), la supervivencia celular (Moon et al, 2002), y la proliferación y diferenciación de las NSCs durante el desarrollo neural (Ciani & Salinas, 2005; Li et al, 2005; Lyashenko et al, 2011).

La vía canónica de señalización de Wnt, dependiente de  $\beta$ -catenina (fig. 6), se activa tras la unión de los ligandos Wnt a los receptores Frizzled y a las lipoproteínas de baja densidad relacionadas con el receptor (*low density lipoprotein receptor-related protein*, LRP5/6) que actúan como co-receptores. El receptor Frizzled recluta a la proteína citoplasmática Dishevelled (Dsh) (Moon et al, 1997), que junto al complejo Frizzled-LRP5/6 forman el complejo de señalización Wnt (Bilic et al, 2007). Este complejo a través de Dsh, se une al complejo de destrucción axin/APC/GSK-3 $\beta$  (*Adenomatous Polyposis Coli; Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* ), inhibiendo así la actividad de GSK-3 $\beta$  (Zeng et al, 2008), lo que permite la estabilización de  $\beta$ -catenina en el citoplasma y su posterior translocación al núcleo, paso esencial para la activación de la vía (Logan & Nusse, 2004). Una vez la proteína ha alcanzado el núcleo, forma complejos con los factores de transcripción de células T y el factor potenciador linfóide (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*, TCF/LEF) para inducir la expresión de los genes diana de la vía.

Por otro lado, en ausencia de ligandos Wnt, la forma libre de  $\beta$ -catenina en el citoplasma tiene una vida muy corta, ya que rápidamente es “secuestrada” y su funcionalidad bloqueada por el complejo de destrucción formado por Axin, APC, GSK-3 $\beta$  y la quinasa CK1 $\alpha$  (*casein kinase 1 $\alpha$* ) (Yost et al, 1996), que fosforila  $\beta$ -catenina en la serina 45 (Ser45) para su degradación en el proteosoma (Aberle et al, 1997; Li et al, 1999). Posteriormente GSK-3 $\beta$ , fosforila a la proteína en los residuos de serina 33 y 37, y en la tirosina 41, todos ellos localizados en el extremo amino terminal (Nt) (Valenta et al, 2012; Xing et al, 2003). Una vez la proteína ha sufrido dichas fosforilaciones, es liberada del complejo de destrucción y reconocida por  $\beta$ -TrCp presente en la maquinaria de ubiquitinación donde  $\beta$ -catenina es degradada por el proteosoma 26S (Hart et al, 1999).



**Figura 6.** Señalización de la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina. a) La ausencia de ligandos Wnt conlleva la degradación de  $\beta$ -catenina por el proteosoma. b) La activación de la vía induce la estabilización de  $\beta$ -catenina, su translocación al núcleo, y la posterior expresión de genes específicos de la vía. APC, *adenomatous polyposis coli*;  $\beta$ -cat,  $\beta$ -catenina; CBP, *CREB-binding protein*; CK, caseína quinasa; DKK, Dickkopf; DSH, Dishevelled; GSK-3 $\beta$ , glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$ ; GBP, *GSK3-binding protein*; LRP, *LDL receptor-related protein*; sFRP, *secreted Frizzled-related protein*; TCF, *T-cell factor*. Tomado de Moon et al. (2004).

## $\beta$ -catenina

$\beta$ -catenina, el principal efector de la vía canónica de Wnt, realiza dos funciones: i) una reguladora en el citoplasma y núcleo, y ii) otra funcional a nivel de membrana mediado por su interacción con las cadherinas (Sadot et al, 1998). Por ello su regulación debe ser muy ajustada.

En humano,  $\beta$ -catenina es una proteína formada por 781 aminoácidos, presentando una parte central rígida formada por 12 repeticiones imperfectas de la proteína Armadillo. Además de dos dominios flexibles amino ( $N_t$ ) y carboxilo ( $C_t$ ) terminales, también posee una hélice de secuencia conservada (*helix-C*) en la parte amino del dominio  $C_t$ , la cual es necesaria para que la proteína sea funcional en su papel regulador, pero no necesaria para su función estructural (Xing et al, 2008). En las repeticiones (R) de la proteína Armadillo R3-R9, se encuentran los lugares de unión de las diversas proteínas que interactúan con  $\beta$ -catenina en forma mutuamente excluyente. Las principales proteínas que interactúan con

$\beta$ -catenina son las cadherinas, los factores de transcripción TCF/LEF, o la proteína APC (Valenta et al, 2012). Así, dependiendo de la conformación de la proteína  $\beta$ -catenina, las diversas proteínas con las que interactúa tendrán la opción de unirse o no (Gottardi & Gumbiner, 2004).

#### ***a) Papel de $\beta$ -catenina en señalización celular***

Después de la activación de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, y la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma, esta proteína se transloca al núcleo para poder ejercer sus funciones como efectora de la vía. A pesar de no poseer señales de localización nuclear o de exportación al núcleo, la proteína se ha dotado de diversos mecanismos, entre ellos, la interacción con complejos proteicos del poro nuclear que median su entrada y salida del núcleo (Jamieson et al, 2012; Shitashige et al, 2008).

La vía de señalización de Wnt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenina es uno de los principales moduladores de la neurogénesis en la SGZ hipocampal (Lie et al, 2005; Wexler et al, 2009) y en la SVZ (Adachi et al, 2007). En estos nichos neurogénicos se ha demostrado la presencia de proteínas Wnt, que podrían estar jugando un papel autocrino, regulando así desde el propio nicho neurogénico la proliferación, empleando para ello la vía canónica de Wnt (Lie et al, 2005; Wexler et al, 2009). En los últimos años se ha conocido más en profundidad la participación de la vía en las diferentes etapas que conforman la neurogénesis como son la autorenovación, proliferación, diferenciación, maduración e integración neuronal (Hussaini et al, 2014), indicando la importancia de su efector principal,  $\beta$ -catenina, en los procesos neurogénicos y neuroplásticos.

#### ***b) Papel de $\beta$ -catenina en adhesión celular***

Aparte de la función como reguladora de la expresión de genes específicos de la vía de Wnt, varios trabajos describen el papel de la  $\beta$ -catenina a nivel de membrana, a través de su interacción con las cadherinas, participando así en el remodelaje del citoesqueleto (Gumbiner, 1996). Las cadherinas son las principales moléculas dependientes de Ca<sup>2+</sup> responsables de las uniones célula-célula, hecho importantísimo en el reconocimiento y organización celular durante el desarrollo (Gumbiner, 1996).

Sólo cuando  $\beta$ -catenina se encuentra en conformación abierta es capaz de unirse a  $\alpha$ -catenina formando heterodímeros (Drees et al, 2005; Yamada et al, 2005), y favoreciendo así su unión con moléculas de adhesión (Brembeck et al, 2004). A pesar de que esta unión

está favorecida por la alta afinidad entre estas moléculas, capturando así a  $\beta$ -catenina del citoplasma hacia la membrana (Heuberger & Birchmeier, 2010), la unión N-cadherina/ $\beta$ -catenina es muy dinámica. De esta manera,  $\beta$ -catenina se libera de los complejos de adhesión celular, favoreciéndose así su función como molécula señalizadora de la vía de Wnt, dependiendo de las demandas biológicas (Maretzky et al, 2005; Reiss et al, 2005). Es de destacar la presencia de los complejos N-cadherina/ $\beta$ -catenina en el ensamblaje sináptico, donde interviene en el reclutamiento de las vesículas sinápticas aproximándolas a la zona de liberación de los neurotransmisores (Bamji et al, 2003; Iwai et al, 2002; Jungling et al, 2006). A nivel de arborización dendrítica, el complejo N-cadherina/ $\beta$ -catenina también está implicado tanto en la regulación de la morfología de las espinas, como en la función sináptica hipocampal (Okuda et al, 2007), por lo que  $\beta$ -catenina juega un importante papel en la modulación de procesos de neuroplasticidad sináptica en cerebro adulto, como aprendizaje y memoria (Maguschak & Ressler, 2008).

### **$\beta$ -catenina y los trastornos del estado del ánimo**

Varias enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas presentan alteraciones en la actividad de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina (Hussaini et al, 2014). Concretamente, estudios en muestras *postmortem* de *corteza frontal* de pacientes deprimidos mostraron una reducción en los niveles de  $\beta$ -catenina (Karege et al, 2012b; Pilar-Cuellar et al, 2014). La presencia de alteraciones en los efectores de la vía, se apoya también en estudios preclínicos. Modelos animales de depresión, como los basados en estrés crónico, muestran un aumento en la actividad GSK-3 $\beta$  (Liu et al, 2012), y una disminución de  $\beta$ -catenina en dos de las áreas cerebrales más estudiadas en relación a la patología, la *corteza prefrontal medial* (Chen et al, 2012), y el *hipocampo* (Liu et al, 2012), en línea con lo observado en los cerebros de sujetos deprimidos.

Aproximaciones genéticas que intentan simular la disminución de los niveles de  $\beta$ -catenina existentes en humano o en modelos animales de la enfermedad, como los ratones *knockout* condicionales para  $\beta$ -catenina en cerebro anterior adulto, muestran un comportamiento de tipo depresivo (Gould et al, 2008). Además, animales que sobreexpresan GSK-3 $\beta$ , y que por tanto tienen la activación de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina disminuida, también muestran una conducta de tipo depresiva (Polter et al, 2010). El

bloqueo de la inhibición de GSK-3 $\beta$  está asociado además a una disminución en la proliferación en la SGZ del giro dentado del *hipocampo*, del factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), pero no del BDNF (Eom & Jope, 2009). Además, tras la administración crónica de antidepresivos, el aumento de la neurogénesis hipocampal como consecuencia del tratamiento está atenuado (Eom & Jope, 2009).

Por el contrario, en los últimos años se ha demostrado como el efecto antidepresivo está mediado, en parte, por la activación de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina. Diferentes tratamientos como la terapia electroconvulsiva (*electroconvulsive therapy*, ECT) (Madsen et al, 2003), la administración crónica de fármacos antidepresivos (Liu et al, 2012; Mostany et al, 2008; Pascual-Brazo et al, 2012), o el tratamiento subcrónico con el agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub> RS67,333 (Pascual-Brazo et al, 2012), incluso el tratamiento con estabilizadores del ánimo (Wexler et al, 2008), promueven un incremento de los niveles de  $\beta$ -catenina en la SGZ del giro dentado del *hipocampo*. Este incremento de  $\beta$ -catenina se corresponde con la inhibición de la proteína GSK-3 $\beta$  (Gould et al, 2004b; Kaidanovich-Beilin et al, 2004; Madsen et al, 2003; Wada, 2009). Las células inmunopositivas para  $\beta$ -catenina colocalizan en la SGZ del *hipocampo* con marcadores de proliferación (Madsen et al, 2003; Mostany et al, 2008; Pascual-Brazo et al, 2012), correlacionándose la hiperactivación de la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina tras tratamientos con fármacos antidepresivos, con un aumento en la proliferación hipocampal (Garza et al, 2012; Mostany et al, 2008; Pascual-Brazo et al, 2012).

En animales transgénicos, la expresión de la forma constitutivamente activa de  $\beta$ -catenina en cerebro adulto produce efectos antidepresivos (Gould et al, 2007), de forma paralela a lo descrito tras la inhibición de GSK-3 $\beta$  por Li<sup>+</sup> (Gould et al, 2004a; Kaidanovich-Beilin et al, 2004; Klein & Melton, 1996), sugiriendo ser un factor importante en la supervivencia celular relacionada con los estabilizadores del ánimo (Jope & Bijur, 2002).

La mayoría de trabajos que se centran en el estudio tanto del estado de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina en la patofisiología, como en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos, lo hacen a través del análisis de  $\beta$ -catenina y su principal inhibidor GSK-3 $\beta$ . No debemos olvidar que cualquier otro componente que regule de forma directa o indirecta la actividad de la vía, puede encontrarse alterado en la patología confiriendo

susceptibilidad, o por el contrario, resistencia a esta. Por ello, está adquiriendo gran importancia el estudio de los distintos efectores de la vía. De hecho, ya se empiezan a conocer los efectos antidepresivos de la sobreexpresión de Wnt2 y Wnt3 en *hipocampo* (Zhou et al, 2016), o cómo la inducción del antagonista de la vía Dickkopf-1 (Dkk-1) está implicado en el daño hipocampal inducido por estrés (Matrisciano et al, 2011). Estos datos demuestran por un lado la importancia de la vía en la patología depresiva, y por otro, cómo dentro de esta cascada de señalización mediada por Wnt, existen diferentes puntos potenciales de intervención terapéutica.

### 3.2.2. VÍA DE mTOR

En los últimos años se ha descrito la implicación de la vía de señalización de mTOR, como mediadora en el efecto antidepresivo rápido de la ketamina (Li et al, 2010a; Li et al, 2011). Esta vía está implicada en la regulación del crecimiento, la proliferación y la plasticidad sináptica, principalmente regulando la traducción de proteínas (Hay & Sonenberg, 2004).

mTOR es una proteína quinasa de serina/treonina, descrita por primera vez en levaduras como la diana farmacológica del microbicida rapamicina (Heitman et al, 1991). En mamíferos, existen al menos dos complejos multiproteicos diferentes, mTORC1 y mTORC2 (Guertin & Sabatini, 2007), evolutivamente conservados desde levaduras a mamíferos (Loewith et al, 2002), y que controlan varios aspectos de la fisiología celular. mTORC1, la principal diana de la rapamicina, se ha relacionado con la regulación positiva del crecimiento, proliferación y supervivencia celular a nivel de traducción proteica, modulación de la energía y de la autofagia en respuesta a estrés, mitógenos o factores de crecimiento (Harwood et al, 2008; Laplante & Sabatini, 2009; Takahara et al, 2006). En cambio, mTORC2 se relaciona más con la organización del citoesqueleto (Jacinto et al, 2004), aunque también está implicada en la regulación del ciclo celular, metabolismo y proliferación a través de la activación de Akt (Laplante & Sabatini, 2009; Sarbassov et al, 2004).

Dentro del SNC, varios estudios demuestran como la vía de mTOR es un punto de conjunción muy importante en la señalización intracelular, ya que se encuentra regulada por un amplio número de mecanismos (Swiech et al, 2008). No es pues de extrañar su

implicación tanto en procesos fisiológicos como patológicos del sistema nervioso central. En las neuronas, la activación de mTORC1 desencadena la fosforilación de varios efectores por debajo en la vía, como la proteína p70S6K (*ribosomal S6 kinase 1*), o la proteína 4EBP1 (*eukariotic translation initiation factor 4E-binding protein*) (Hoeffler & Klann, 2010) (fig. 7). En cultivos celulares procedentes de *hipocampo*, estas proteínas se han localizado en el cuerpo o soma celular, en las dendritas y de forma específica, en las sinapsis, donde colocaliza con la proteína PSD95 (*postsynaptic density protein-95*), sugiriendo una localización postsináptica de la vía (Tang et al, 2002). Las proteínas sintetizadas tras la activación de la vía de mTOR, como las proteínas postsinápticas PSD95, la subunidad GluR1 del receptor AMPA, y las proteínas de localización presináptica sinapsina 1, o la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*, Arc) (Duman & Voleti, 2012; Gong et al, 2006; Li et al, 2010a), participan en procesos de plasticidad sináptica como la formación, maduración y funcionalidad de las nuevas espinas dendríticas (Li et al, 2010a), procesos de memoria (Hoeffler & Klann, 2010), o potenciación a largo plazo (*long term potentiation*, LTP) (Cammalleri et al, 2003; Tang et al, 2002).

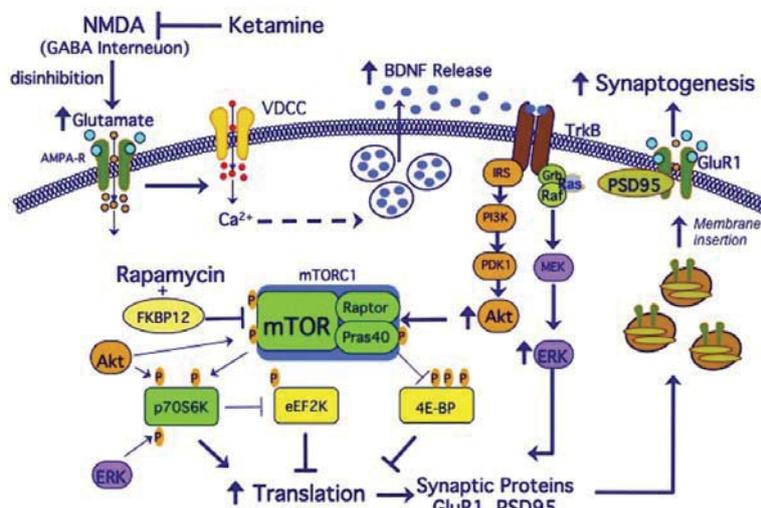
Actualmente, la señalización a través de la vía de mTOR está considerada como una nueva diana terapéutica para el tratamiento de los trastornos afectivos. La administración de ketamina en pacientes resistentes a los tratamientos antidepresivos convencionales, mostraron una mejoría rápida de los síntomas depresivos, tras solo 2 horas de la administración, que se mantuvo en el tiempo (Berman et al, 2000; Murrough et al, 2013; Zarate et al, 2006). Estos resultados abrieron el camino hacia nuevas dianas terapéuticas en base a las cuales diseñar nuevos fármacos antidepresivos más rápidos y eficaces que los actuales. Este efecto antidepresivo de acción rápida y sostenida de los antagonistas del receptor NMDA de glutamato como la ketamina, está mediado por la activación de la vía de mTOR, ya que el efecto desaparece tras la administración previa de rapamicina, inhibidor específico de la vía (Li et al, 2010a). De forma contraria, la administración subcrónica de rapamicina en ratones, también muestra efectos antidepresivos (Cleary et al, 2008). La participación de la vía de mTOR en las bases neurobiológicas de la patología depresiva se describió en un estudio en cerebro humano *postmortem* de sujetos diagnosticados de depresión, donde se mostró una disminución de los niveles de mTOR y

de sus principales efectores (p70S6K y eIF4B, *eukaryotic translation initiation factor 4B*) en la PFCx (Jernigan et al, 2011).

En los últimos años, una gran variedad de compuestos reguladores de la neurotransmisión glutamatérgica y de su homeostasis, se han utilizado para esclarecer los mecanismos de la acción antidepresiva rápida dependiente de mTOR. Entre ellos encontramos otros antagonistas del receptor NMDA, como los compuestos Ro 25-6981 (Li et al, 2010a) o MK-801 (Yoon et al, 2008), y antagonistas de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II (mGlu2/3) como MGS0039 y LY341495 (Koike et al, 2011).

En la búsqueda de los mecanismos que subyacen al efecto antidepresivo rápido, se ha demostrado que la activación de la vía de mTOR, requiere de la actividad del receptor AMPA tanto en animales como en humano (Hashimoto, 2009; Li et al, 2010a; Maeng et al, 2008; Zanos et al, 2016; Zhou et al, 2014). De hecho como se comentó previamente, los moduladores positivos de este receptor, el cual posee un importante papel en la plasticidad sináptica (Turrigiano, 2011), presentan un elevado potencial antidepresivo, encontrándose un compuesto modulador AMPA en fase II del desarrollo clínico en humanos (Nations et al, 2012). Otros resultados apuntan que el BDNF también juega un papel muy importante en esta respuesta antidepresiva rápida (Autry et al, 2011). Además, en animales que presentan el polimorfismo en el gen del factor neurotrófico Val66Met, los efectos antidepresivos y sinaptogénicos de la ketamina no se observan (Chen et al, 2006), apoyando la importancia del factor trófico BDNF en la respuesta antidepresiva de estos compuestos.

Juntando las evidencias anteriores, el mecanismo de acción postulado a través del cual la ketamina, es capaz de inducir un efecto antidepresivo rápido y sostenido asociado a un aumento de la sinaptogénesis es el siguiente (fig. 7): el bloqueo de los receptores NMDA en interneuronas GABAérgicas (Homayoun & Moghaddam, 2007), provorúa una desinhibición de la transmisión glutamatérgica. Esta liberación de glutamato estimularía los receptores AMPA, que a su vez activarían los canales de calcio dependientes de voltaje (*voltage dependent calcium channels*, VDCCs), permitiendo la entrada de calcio al interior de la célula, y la posterior liberación de BDNF (Hoeffler & Klann, 2010). La unión de esta neurotrofina a su receptor TrkB, conlleva la activación de diferentes vías de señalización cuyos efectores Akt o ERK pueden fosforilar y activar a mTOR, iniciando la síntesis de proteínas sinápticas (Hoeffler & Klann, 2010; Jourdi et al, 2009; Slipczuk et al, 2009; Takei et al, 2004).



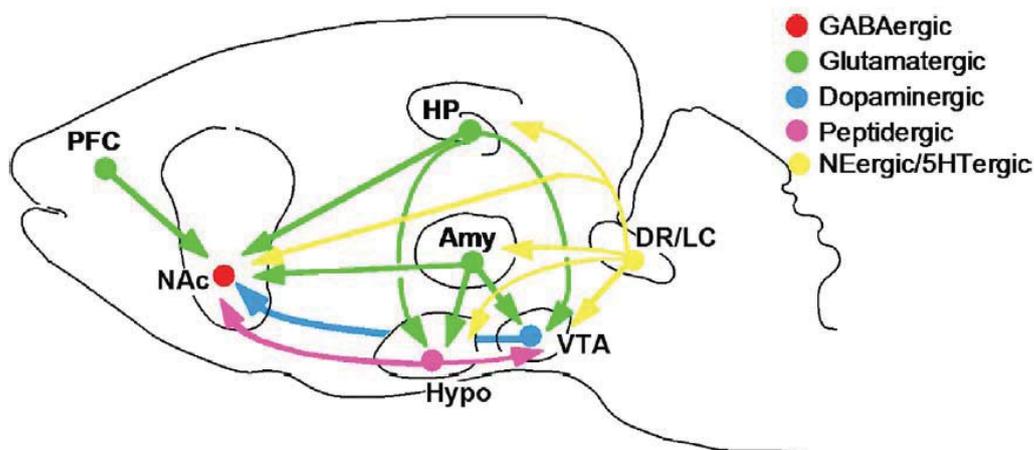
**Figura 7.** Mecanismo propuesto de la acción antidepresiva de la ketamina. La neurotransmisión y señalización intracelular tras el antagonismo del receptor NMDA, estimula mTOR y promueve la sinaptogénesis. Tomado de Duman & Voleti (2012).

## 4. CIRCUITOS CEREBRALES IMPLICADOS EN DEPRESIÓN MAYOR

La circuitería neuronal que regula los estados de ánimo (fig. 8) es una compleja red de neuronas agrupadas en diversas áreas. Estas diferentes regiones tienen que ser consideradas como un todo ya que su información y funcionalidad, finamente reguladas por cambios sinápticos (Zhang & Poo, 2001), se encuentran altamente solapadas e interconectadas.

Las técnicas de neuroimagen más utilizadas en la actualidad, con el objetivo de detectar anomalías de la actividad a nivel de circuitería, son la imagen por resonancia magnética funcional (*functional magnetic resonance imaging*, fMRI), la fMRI de secuencias BOLD (*blood-oxygen level dependent*) o dependiente del nivel de oxígeno, la electroencefalografía (EEG) y la magnetoencefalografía (MEG). Por otro lado, la MRI es más utilizada para determinar cambios en la morfología y composición del área de estudio.

Tradicionalmente, las regiones más estudiadas por su implicación en los procesos afectivos, de memoria o de cognición, han sido las regiones frontales de la *corteza cerebral*, el *hipocampo*, y la *amígdala* (Otte et al, 2016). Los resultados obtenidos describiendo el incremento de la conectividad y activación de la *amígdala* (Hamilton et al, 2012) son los más reproducibles dentro de la depresión mayor.



**Figura 8.** Circuitería neuronal de la depresión. La imagen muestra de forma simplificada, la circuitería neuronal propuesta que modula el estado de ánimo y las áreas que han sido foco de estudio por encontrarse alteradas en este trastorno. PFC, *corteza prefrontal*; NAc, *núcleo accumbens*; HP, *hipocampo*; Amy, *amígdala*; VTA, *área tegmental ventral*; Hypo, *hipotálamo*; DR; *rafe dorsal*; LC, *locus coeruleus*; NEérgico, sistema noradrenérgico; 5-HTérgico, sistema serotoninérgico. Tomado de Nestler (2015).

Alteraciones a nivel celular como atrofia dendrítica, pérdidas neuronales y/o gliales en la PFCx, se han asociado a los trastornos del estado de ánimo tanto en humano como en modelos animales (Krishnan & Nestler, 2008; Pittenger & Duman, 2008). En relación a estos datos, a través de estudios de neuroimagen, se ha observado en pacientes diagnosticados con depresión, una disminución en la actividad de esta área (Price & Drevets, 2010). Los efectos que la ketamina tiene en esta región cerebral, son opuestos a los déficits como la disminución y funcionalidad de las espinas dendríticas que se observan tras la exposición al estrés, contribuyendo así al efecto antidepresivo (Li et al, 2010a). La gran mayoría de estudios preclínicos, realizados en torno a la acción antidepresiva de la ketamina y otros compuestos reguladores de la transmisión glutamatérgica, se centran en la mPFCx. La importancia de la *corteza infralímbica*, parte ventral de la mPFCx, en el

efecto antidepresivo, se había descrito previamente tras su elección como una de las regiones para el uso de la DBS (Hamani et al, 2010; Veerakumar et al, 2014). Además, Fuchikami y colaboradores (2015), describen como el efecto antidepresivo rápido y sostenido tras la administración local de ketamina o la estimulación mediante optogenética, no es característico de toda la mPFCx, sino de la *corteza infralímbica*, no observándose efectos antidepresivos en la *corteza prelímbica*.

El trabajo de Veerakumar *et al.* (2014), muestra como la estimulación crónica de la *corteza infralímbica* induce una reversión de la plasticidad sináptica del *núcleo dorsal del rafe* de los animales, la cual había disminuido tras la inducción de un modelo animal de depresión (*chronic social defeat*) (Veerakumar et al, 2014). Estos resultados son un claro ejemplo de las comunicaciones existentes entre las diversas estructuras implicadas en la patología. Concretamente, el eje mPFCx-DRN, que tiene una regulación compleja (Celada et al, 2001; Kumar et al, 2013; Varga et al, 2003; Varga et al, 2001; Warden et al, 2012), es de gran interés por la fuerte implicación de ambas áreas en la patofisiología del trastorno depresivo y en los mecanismos de acción antidepresiva.

Por otra parte, estudios preclínicos muestran cómo el *hipocampo*, de la misma forma que la PFCx, es altamente susceptible al estrés, debido a su elevada implicación en procesos de neuroplasticidad, y su directa relación con los glucocorticoides, donde sus receptores están altamente expresados (Banasr & Duman, 2007; Gould & Tanapat, 1999; Sapolsky, 1990). Estudios de neuroimagen revelan, en pacientes deprimidos, una disminución del volumen hipocampal (Campbell et al, 2004; McKinnon et al, 2009). Este hecho se ha asociado con la enfermedad, más que con un marcador de vulnerabilidad, debido a la correlación existente entre la disminución de volumen, y la duración y número de episodios (Campbell et al, 2004; Frodl et al, 2008; Kronmuller et al, 2008; MacQueen et al, 2003; McKinnon et al, 2009). Por otro lado, otros estudios asocian volúmenes reducidos con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (MacMaster et al, 2008). Esto obliga a la realización de más estudios para concretar si las variaciones del volumen hipocampal serían un marcador de la enfermedad, o de riesgo a padecer la enfermedad.

Entre el *hipocampo* y la *corteza prefrontal* existen conexiones directas (Rosene & Van Hoesen, 1977; Swanson, 1981), e indirectas (Bokor et al, 2002; Dillingham et al, 2015; Nazari-Serenjeh et al, 2011; Vertes, 2006). La vía directa *hipocampo*-PFCx juega un papel muy importante en el procesamiento cognitivo (Sigurdsson et al, 2010), y su

disfuncionalidad parece estar asociada a la patología depresiva (Andrews & Thomson, 2009). Esta red neuronal es de gran interés para el estudio de las limitaciones cognitivas y emocionales presentes de manera más evidente en algunos grupos de pacientes. Estos síntomas pueden coexistir con otros como la anhedonia, la disminución de la motivación y/o la energía. Es por ello que estructuras límbicas y sus conexiones, que constituyen y regulan el sistema cerebral de la recompensa, también han captado la atención de los investigadores por su estrecha relación con la depresión y los trastornos relacionados con el estrés (Nestler, 2015)

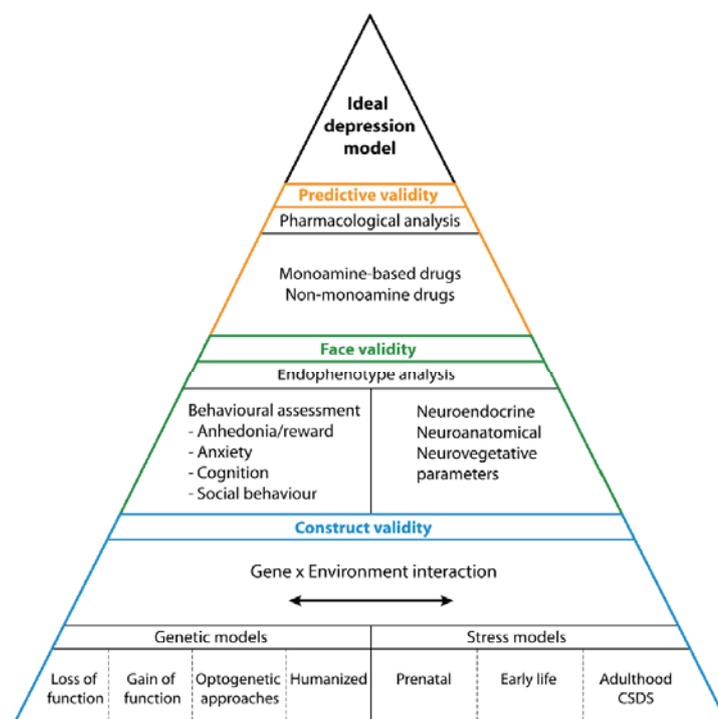
## 5. MODELOS ANIMALES DE DEPRESIÓN

Uno de los principales problemas en investigación básica dentro de los trastornos mentales es la falta de modelos animales apropiados (Nestler & Hyman, 2010). Mientras en clínica se diagnostica la patología mediante un amplio espectro de síntomas presentes en los pacientes, muchos de ellos subjetivos, en los modelos animales sólo podemos analizar objetivamente un pequeño número signos. Actualmente, se está produciendo una transición desde los modelos clásicos a modelos genéticos basados en los hallazgos procedentes de la investigaciones básica, pretendiendo modelar los endofenotipos presentes en los pacientes (Slattery & Cryan, 2014). Estos enfoques están permitiendo un mejor entendimiento de las bases neurobiológicas y genéticas de estos trastornos, a la vez que proporcionan una mejor traslacionalidad de dichos modelos, facilitando así el hallazgo de nuevas dianas terapéuticas.

Un buen modelo animal de enfermedad psiquiátrica ha de poseer las siguientes características (fig. 9) (Dedic *et al.*, 2011):

- i) validez etiológica o de constructo:* con ella se consigue representar en el animal las posibles causas genéticas, ambientales o la interacción entre ellas, asociadas al desarrollo de la patología. Este punto es complicado debido a la ausencia de factores de riesgo genéticos consistentes en humanos.
- ii) validez aparente:* donde el animal ha de reflejar de manera conductual o fisiológica, lo observado en el trastorno que se intenta modelar.

iii) *validez predictiva*: sólo si el animal refleja eficientemente los efectos que los fármacos presentan en la condición humana alcanzará esta característica.



**Figura 9.** Modelos animales en investigación preclínica. Características propuestas para generar un modelo animal de depresión ideal. Estas incluyen validez de constructo, validez aparente y validez predictiva. Tomado de Dedic et al. (2011).

A pesar de lo descrito anteriormente, actualmente se siguen utilizando modelos animales clásicos de depresión debido a su elevada validez predictiva. Entre ellos podemos encontrar:

- **Test de la natación forzada (*Forced Swimming Test, FST*) y test de la suspensión de la cola (*Tail Suspension Test, TST*):** mediante estos modelos se determina la desesperación del animal cuando es sometido a una situación estresante inevitable. El animal en esta situación adopta una postura inmóvil la cual disminuye tras la administración aguda de un fármaco o compuesto con actividad antidepresiva (Porsolt et al, 1977; Thierry et al, 1986).
- **Modelo por estrés crónico suave impredecible (*Chronic Unpredictable Mild Stress, CUMS*):** este modelo se originó tras observar que la aplicación de

diferentes tipos de estrés severo en animales, provocaba un estado anhedónico (Katz et al, 1981). Disminuyendo la severidad y aumentando el tiempo de exposición al estrés, se originó el modelo animal del CUMS. El hecho de que los síntomas presentes, normalmente determinados por la anhedonia, se reviertan tras la administración crónica de antidepresivos clásicos, confieren a este modelo una gran utilidad. Recientemente, se ha descrito como la administración aguda de ketamina también revierte el estado de tipo depresivo característico de este modelo (Li et al, 2011).

- **Bulbectomía olfatoria:** la eliminación de los bulbos olfatorios provoca alteraciones tanto neuroquímicas como conductuales (Cryan et al, 2002), siendo la hiperactividad locomotora en el test de campo abierto el rasgo más característico. La administración crónica de fármacos antidepresivos clásicos revierte estos cambios, aunque otros agonistas serotoninérgicos, como el agonista 5-HT<sub>4</sub> RS67,333, revierten el fenotipo en tratamientos subcrónicos (Lucas et al, 2007; Mnie-Filali et al, 2011).
- **Administración crónica de corticosterona:** este modelo, a través de la administración crónica de corticosterona en el agua de bebida (David et al, 2009), simula la hiperactividad del eje HPA observada en sujetos diagnosticados de depresión mayor o en modelos animales de estrés crónico. El modelo induce cambios conductuales de tipo depresivo y anhedonia, los cuales son revertidos tras la administración crónica de antidepresivos (David et al, 2009).

Como ya hemos comentado anteriormente, mediante manipulación genética se han diseñado diferentes modelos animales de depresión para diseñar modelos con mejor validez de constructo, basándose en el estudio de ciertos síntomas clínicos como la anhedonia. Estudiar un trastorno heterogéneo como la depresión, mediante el análisis individualizado de sus diferentes componentes, ayuda a comprender de forma más precisa las bases neurobiológicas que subyacen a los síntomas de la enfermedad, así como el tratamiento de sus síntomas específicos. Esto sin embargo, puede resultar en aproximaciones terapéuticas novedosas que no sean fácilmente trasladables a la clínica por su elevada especificidad de endofenotipo (Cryan et al, 2002; Hasler et al, 2004). Por otro lado, las aproximaciones genéticas presentan la desventaja de carecer del factor ambiental, importantísimos en algunas ocasiones para desarrollar la enfermedad. En este sentido, es importante combinar

el modelo genético con la exposición a estrés, con el objetivo de reflejar de manera más precisa la situación presente en la clínica (Slattery & Cryan, 2014).

Mediante todos los avances conseguidos durante los años de estudio, y a pesar de las dificultades que presentan los modelos animales, gracias a ellos se han descubierto nuevos procesos moleculares que contribuyen al avance en el estudio de la patología depresiva. Algunos de ellos incluyen alteraciones de la funcionalidad sináptica (Duman & Aghajanian, 2012), y neurogénesis (Chattarji et al, 2015), mecanismo epigenéticos (Sun et al, 2013), mecanismos inmunes (hipótesis neuroinflamatoria) (Hall & Lothrop, 1934; Miller & Raison, 2016) o de la microbiota sobre el eje intestino-cerebro (Cryan & Dinan, 2012).

## **6. PANORAMA ACTUAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

El objetivo principal de la investigación biomédica en depresión mayor es la búsqueda de mejores tratamientos para los pacientes. Es indiscutible que tras décadas de trabajos fructíferos en referencia a la neurobiología de la depresión, así como a los mecanismos de acción de los fármacos antidepresivos, menos de un 10% de los pacientes, a nivel mundial, no reciben el tratamiento adecuado (Gureje et al, 2007; Patel et al, 2016).

La heterogeneidad de la enfermedad y sus características clínicas comunes a otras enfermedades psiquiátricas, puede resultar en un diagnóstico erróneo por lo que posiblemente, el tratamiento no será efectivo. Definiendo el diagnóstico en base a criterios genéticos, de neuroimagen, o las experiencias vividas por el sujeto (ambientales) entre otros, además del diagnóstico clínico, se conseguiría distinguir los diferentes endofenotipos patológicos que engloba la enfermedad pudiendo así realizar un tratamiento más específico.

Como ya se comentó, la investigación farmacológica en el trastorno depresivo, actualmente se centra en el sistema glutamatérgico. El estudio en profundidad de las nuevas hipótesis etiológicas como es la inflamatoria, y sus posibles conexiones con las teorías más clásicas de esta enfermedad, favorecerá la aparición de nuevas dianas terapéuticas sobre las cuales poder trabajar y por qué no, poder diseñar nuevos compuestos con potencial antidepresivo más eficaz que los que existen actualmente en clínica.



## **II. OBJETIVOS**



La depresión mayor es una enfermedad de causa aún desconocida, habiéndose postulado como mecanismos asociados a su etiopatogenia la desregulación de sistemas de neurotransmisión como los monoaminérgicos, y de la proliferación/neuroplasticidad. Los factores neurotróficos, entre ellos el BDNF, así como diversas vías de señalización intracelulares como Wnt/ $\beta$ -catenina y mTOR, han comenzado a ser estudiados en profundidad con el objetivo de caracterizar tanto su papel en modelos animales de depresión, como su modulación por los tratamientos con antidepresivos. Dado que la principal limitación de los antidepresivos actuales es su retraso en el efecto, la búsqueda de nuevas dianas moleculares en base a las cuales diseñar fármacos antidepresivos más rápidos y eficaces que los actuales, es uno de los grandes retos de la Neuropsicofarmacología. En este sentido, las vías implicadas en proliferación y plasticidad neuronal presentan un gran potencial.

Este trabajo pretende investigar en detalle el papel de las vías de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina y de mTOR en la patología depresiva. Para ello hemos eliminado o estabilizado la actividad de estas vías, en áreas biológicamente relevantes en la etiopatogenia de la depresión, así como en el efecto antidepresivo. El estudio de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, se realizó en el *hipocampo*, estructura en la que se han descrito modificaciones de los niveles de  $\beta$ -catenina asociados tanto a la enfermedad, como al tratamiento antidepresivo. Por otro lado, el estudio de la vía de mTOR se realizó en la *corteza prefrontal medial*, y específicamente en la *corteza infralímbica* por poseer un papel crucial en esta patología, y en el efecto de antidepresivos rápidos. En ambos casos, se estudió no solo el efecto conductual sobre parámetros de ansiedad/depresión, sino sus efectos sobre proliferación/neurogénesis, y sobre el sistema serotoninérgico.

Los objetivos concretos de este trabajo de tesis fueron:

1. Estudiar el efecto conductual, molecular y neuroquímico de la eliminación de  $\beta$ -catenina en la capa subgranular del giro dentado del *hipocampo*, incluyendo:
  - a. Caracterización conductual en paradigmas de depresión y ansiedad.
  - b. Evaluación de marcadores de proliferación y plasticidad hipocampales.
  - c. Estudio de diferentes elementos del sistema serotoninérgico.

- d. Estudio del efecto del tratamiento con fármacos antidepresivos sobre este animal.
2. Estudiar el efecto conductual, molecular y neuroquímico de la estabilización de  $\beta$ -catenina en la capa subgranular del giro dentado del *hipocampo*, mediante:
  - a. Caracterización conductual en paradigmas de depresión y ansiedad.
  - b. Evaluación de marcadores de proliferación y plasticidad hipocampales.
  - c. Estudio de diferentes elementos del sistema serotoninérgico.
  - d. Estudio del efecto conductual sobre este animal en un modelo de depresión.
3. Caracterizar conductual, neuroquímica y molecularmente los resultados del silenciamiento de mTOR en *corteza infralímbica*. Esta caracterización incluye:
  - a. Caracterización conductual en paradigmas de depresión y ansiedad.
  - b. Evaluación de marcadores de proliferación y plasticidad hipocampales, y activación neuronal.
  - c. Estudio de elementos del sistema serotoninérgico.
4. Evaluar el estado de la vía de mTOR en muestras humanas *postmortem* de *corteza frontal* de pacientes diagnosticados de depresión, sin y con tratamiento.
  - a. Estudio de los niveles de proteínas de la vía de mTOR, así como de su nivel de activación.
  - b. Estudio de los niveles de expresión del mRNA de componentes de la vía de mTOR.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. ANIMALES Y MUESTRAS *POSTMORTEM* HUMANAS**

Los animales empleados en este trabajo, fueron estabulados en grupo y mantenidos en condiciones estándar (ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad,  $22\pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura, humedad relativa del 60-70%), con acceso *ad libitum* tanto a bebida como a comida, exceptuando el día previo a la realización del test conductual *novelty suppressed feeding*. El cuidado y los procesos experimentales se realizaron de acuerdo con la normativa vigente nacional (Real decreto 531/2013 y Ley 32/2007) y del Consejo Directivo de la Comunidad Europea en la Protección animal para el uso experimental y otros propósitos (86/609EEC y la actualmente vigente 2010/63/UE). Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados con el objetivo de obtener muestras tisulares.

### **1.1. RATONES TRANSGÉNICOS CONDICIONALES PARA $\beta$ -CATENINA**

Para los estudios relacionados con la proteína  $\beta$ -catenina, se utilizaron dos líneas de animales transgénicos condicionales: animales en los que se eliminó  $\beta$ -catenina (cKO) y animales en los que se estabilizó esta proteína (cST). Los animales utilizados fueron machos, de dos a tres meses de edad, y 25-30 g de peso.

#### **1.1.1. GENERACIÓN DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS**

Los animales transgénicos GLAST-Cre, donde la expresión de la recombinasa Cre se limita, en cerebro adulto, a células astrogiales por la influencia del promotor GLAST (transportador de glutamato/aspartato en astrocitos), fueron obtenidos originalmente de la Prof. Magdalena Götz (Universidad de Munich, Alemania) (Mori et al, 2006), y mantenidos como heterocigotos en la cepa C57BL/6. La deleción específica de lugar está mediada por la enzima Cre recombinasa, que reconoce y corta en regiones específicas loxP. En nuestro caso está expresada bajo la acción del promotor GLAST (Mori et al, 2006), provocando que nuestro gen de interés pueda inactivarse o expresarse de manera específica en el tejido deseado. Esta enzima está fusionada a su vez a un dominio mutado de unión de hormona

del receptor de estrógenos (ER), por lo que el transgénico condicional también se controla en el tiempo, induciendo el sistema CreER mediante la administración del análogo de estrógenos tamoxifeno (TMX) (Feil et al, 2009).

Para la generación de los animales cKO para  $\beta$ -catenina, se utilizaron ratones con el gen de la  $\beta$ -catenina flanqueado por secuencias loxP (*Ctnnb1*<sup>lox/lox</sup>) (The Jackson Laboratory, Maine, EEUU), y fueron cruzados con ratones C57BL/6 durante al menos 10 generaciones y mantenidos como una colonia separada. Estos animales poseen los sitios loxP localizados dentro de los intrones 1 y 6 del gen que codifica para  $\beta$ -catenina.

Por otro lado, los animales que expresan  $\beta$ -catenina de forma estable constitutivamente (cST) (*Ctnnb1*<sup>(ex3)Fl/Fl</sup>), fueron generosamente cedidos por el Prof. Makoto Mark Taketo (Universidad de Kyoto, Japón). En estos animales el exón 3 del gen de la  $\beta$ -catenina (*Ctnnb1*) —donde se localizan los sitios de fosforilación para GSK-3 $\beta$ , residuo que marca a  $\beta$ -catenina para su degradación—, se encuentra flanqueado por sitios loxP (Hallpike & Rawdon-Smith, 1934; Harada et al, 1999). La recombinación inducida de GLAST-Cre conduce a la pérdida de este exón en las células progenitoras hipocampales y por consiguiente a la estabilización de la proteína imitando la señalización constitutiva de la vía de Wnt (Barth et al, 1997).

Los animales con los sitios loxP (*Ctnnb1*<sup>lox/lox</sup> y *Ctnnb1*<sup>(ex3)Fl/Fl</sup>) fueron cruzados con los animales GLAST-Cre. Para la generación de los animales transgénicos condicionales (cKO y cST), se administró tamoxifeno 1 mg/día (disuelto en aceite de maíz a 37°C), dos veces al día, durante 5 días (Mori et al, 2006), con el objetivo de inducir la expresión de la enzima Cre recombinasa. Los animales control recibieron aceite de maíz. Tras la inducción del animal transgénico condicional, se esperó un periodo de 4 semanas hasta el comienzo de las pruebas conductuales o neuroquímicas. Mediante esta estrategia, se obtienen animales en los que se eliminó (cKO) o se estabilizó (cST)  $\beta$ -catenina en células positivas para la proteína GLAST.

Ratones portadores del alelo reportero R26R LacZ se utilizaron para comprobar la eficiencia de la recombinación inducible de la Cre recombinasa en el cerebro de los ratones GLAST-Cre (Soriano, 1999).

## 1.1.2. GENOTIPADO

### EXTRACCIÓN DE DNA

El DNA de los animales para realizar el genotipado, se obtuvo cortando 1 cm del extremo de la cola del animal. Este tejido se mezcló con 400  $\mu$ l de *tail buffer* (Tris 10 mM pH=8,3, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, SDS 0,5%) y 15  $\mu$ l de proteinasa K. La mezcla se incubó durante toda la noche a 55°C y al día siguiente, se añadieron 330  $\mu$ l de *tail buffer* mezclándose manualmente la solución durante 2 min, tras los cuales se añadieron 250  $\mu$ l de NaCl 6M y se volvieron a mezclar manualmente durante unos segundos. A continuación, las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 min a 15.700 x g. 750  $\mu$ l del sobrenadante se mezclaron con 500  $\mu$ l isopropanol durante 2 min volviéndose a centrifugar durante 10 min a 4°C y 15.700 x g. Descartamos el sobrenadante y añadimos 1 mL de etanol al 70%. Esta mezcla se centrifugó durante 5 min a 4°C a 15.700 x g. Tras la centrifugación, eliminamos completamente el etanol y las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente, se añadieron 500  $\mu$ l de *TE buffer* (Tris 10 mM pH=8,3 y EDTA 1 mM), dejando incubar la mezcla a 55°C durante 20 min, tras los cuales el DNA extraído se almacenó a -20°C hasta su utilización.

### AMPLIFICACIÓN POR PCR

La amplificación selectiva de los fragmentos de DNA correspondientes a nuestros genes diana, se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR), y fueron detectados según su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se especifican los protocolos que se siguieron para cada una de las líneas utilizadas en esta tesis.

#### a) Ratones GLAST-Cre

En estos animales se determinó la expresión de GLAST mediante los siguientes *primers*: GLAST (*forward*): 5'-GAGGCACTTGGCTAGGCTCTGAGGA-3' y GLAST (*reverse*): 5'-GAGGAGATCCTGACCGATCAGTTGG-3'. Por otro lado, para la amplificación de Cre se utilizó el *primer*: 5'-GGTGTACGGTCAGTAAATTGGACAT-3'. El resultado de la amplificación proporciona una banda de 700 pares de bases (pb) correspondiente a los animales *wildtype* (-/-) y dos productos de amplificación, de 700 y 400 pb, para el animal transgénico (+/-). Cada mezcla de PCR contenía: 0,3  $\mu$ l de cada *primer* (0,4  $\mu$ M), 7,5  $\mu$ l DreamTAQ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific,

Massachusetts, EEUU) (que contiene la Taq polimerasa, 0,4 mM de cada uno de los dNTPs, MgCl<sub>2</sub> 4 mM), 1 µl del DNA extraído y 4,7 µl de agua extrapura Milli-Q®. La reacción tuvo lugar en un termociclador (2720 Applied Biosystems, California, EEUU), bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo de 2 min a 94°C; un segundo ciclo (x 35 repeticiones) de 2 s a 94°C, 20 s a 55°C y 30 s a 72°C; por último, un tercer ciclo de 5 min a 72°C manteniendo las muestras a 4°C tras su finalización.

**b) Ratones *Ctnnb1*<sup>flox/flox</sup>**

En este caso, para la comprobación de los productos de PCR procedentes del DNA de animales en los que se encuentra el gen de la β-catenina flanqueado por sitios loxP, se utilizaron los siguientes *primers*: 5'-AAGGTAGAGTGATGAAAGTTGTT-3' (*forward*) y 5'-CACCATGTCCTCTGTCTATTC-3' (*reverse*). El producto de interés tiene 350 pb y corresponde al transgénico homocigoto (f/f). Las condiciones específicas de PCR fueron las siguientes: 0,75 µl de cada primer (1 µM), 7,5 µl DrealTAQ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) (que contiene la Taq polimerasa, 0,4 mM de cada uno de los dNTPs, MgCl<sub>2</sub> 4 mM), 1 µl del DNA extraído y 5 µl de agua extrapura Milli-Q®. La reacción tuvo lugar en un termociclador (2720 Applied Biosystems, California, EEUU), bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo de 1,5 min a 94°C; un segundo ciclo (x 35 repeticiones) de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C; por último, un tercer ciclo de 2 min a 72°C manteniendo las muestras a 4°C tras su finalización.

**c) Ratones *Ctnnb1*<sup>(ex3)<sup>Fl</sup>/Fl</sup>**

Estos animales son aquellos ratones que contienen el exón 3 del gen de la β-catenina localizado flanqueado por dos secuencias loxP. Los *primers* empleados para genotiparlos fueron los siguientes: 5'-GACACCGCTGCGTGGACAATG-3' (*forward*) y 5'-GTGGCTGACAGCAGCTTTTCTG-3' (*reverse*) siendo el producto de interés de la amplificación de 700 pb correspondiente al animal transgénico (f/f). A continuación, se muestran las condiciones en las que se realizaron las amplificaciones de los fragmentos diana: 0,3 µl de cada *primer* (0,4 µM), 7,5 µl DreamTAQ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) (que contiene la Taq polimerasa, 0,4 mM de cada uno de los dNTPs, MgCl<sub>2</sub> 4 mM), 1 µl del DNA extraído y 5,9 µl de agua extrapura Milli-Q®. La reacción tuvo lugar en un termociclador (2720 Applied Biosystems, California, EEUU) bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo de 5 min a 95°C; un segundo ciclo

(x 35 repeticiones) de 60 s a 95°C, 60 s a 60°C y 60 s a 72°C seguido de un tercer ciclo, de 10 min a 72°C manteniendo las muestras a 4°C tras su finalización.

#### **d) Ratones Rosa26/lacZ**

En el proceso de genotipado de los animales Rosa26/lacZ, se utilizaron los *primers* 5'-ACCCTGGCGTTACCCAACTT-3' (*forward*) y 5'-CTGTCCCCGTAACCGAC-3' (*reverse*). El animal heterocigoto (+/-) presenta el producto de amplificación de interés formado por 450 pb. Las características específicas para amplificar nuestro gen diana fueron: 0,3 µl de cada primer (0,4 µM), 7,5 µl DreamTAQ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) (que contiene la Taq polimerasa, 0,4 mM de cada uno de los dNTPs, MgCl<sub>2</sub> 4 mM), 0,3 µl de MgCl<sub>2</sub> 1 mM, 1 µl del DNA extraído y 5,9 µl de agua extrapura Milli-Q®. La reacción tuvo lugar en un termociclador (2720 Applied Biosystems, California, EEUU) bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo de 90 s a 94°C; un segundo ciclo (x 35 repeticiones) de 30 s a 94°C, 45 s a 52°C y 45 s a 72°C seguido de un tercer ciclo, de 10 min a 72°C manteniendo las muestras a 4°C tras su finalización.

#### **DETECCIÓN DE LOS FRAGMENTOS**

Después del proceso de amplificación, 15 µl del producto de la reacción se comprobaron introduciéndolos en un gel de agarosa 1-1,5% TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM). Para la visualización de los productos de PCR los geles fueron teñidos con 5 µl 1×SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) y las imágenes digitales obtenidas a través del sistema Image quant 350 (General Electric, Connecticut, EEUU).

### **1.2. RATONES PARA EL SILENCIAMIENTO DE mTOR**

En los estudios en los que se realizó el silenciamiento de mTOR mediante la administración de siRNAs específicos, se utilizaron ratones C57/BL6 macho de 10-14 semanas de vida, suministrados por *Charles River* (Lyon, Francia).

### 1.3. MUESTRAS HUMANAS *POSTMORTEM*

Las autopsias de pacientes diagnosticados de depresión víctimas de suicidio, tratados con antidepresivos y sin tratar, y las de sus respectivos controles macheados (tabla 1), fueron realizadas en el Instituto Vasco de Medicina Legal, Bilbao, España y el University Center of Legal Medicine, Ginebra, Suiza. El estudio se realizó según la política del Comité de Ética e Investigación sobre muestras de cerebro humano *postmortem* del Instituto Vasco de Medicina Legal y del Departamento de Psiquiatría de la Universidad de Ginebra. La *corteza frontal* (Área de Bradman 9) se diseccionó macroscópicamente en tejido fresco y fue almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**Tabla 1.** Relación de las características de los sujetos diagnosticados de depresión mayor y sus respectivos controles, utilizados para el estudio de la vía de mTOR. Los cerebros fueron obtenidos de autopsias de 15 víctimas de suicidio que fueron macheados con 15 sujetos controles por sexo, edad y tiempo transcurrido hasta la realización de la autopsia.

CASO	SEXO (F/M)	EDAD <sup>1</sup> (años)	PM <sup>2</sup> (h)	CAUSA DE LA MUERTE	TRATAMIENTO <sup>3</sup> (formulado en la autopsia)	FÁRMACO EN SANGRE <sup>4</sup> (mg ml <sup>-1</sup> ) Se considera tto +/-
Caso 1	F	35	39	Intoxicación cáustica	TMT, SMZ	Negativo -
Control 1	F	33	44	Accidente vehículo a motor		Negativo -
Caso 2	M	73	60	Herida de bala	ATD, BDZ	CIT (0.1) +
Control 2	M	79	66	Accidente vehículo a motor		Negativo -
Caso 3	F	72	49	Salto desde altura	Untreated	Negativo -
Control 3	F	79	39	Accidente vehículo a motor		Negativo -
Caso 4	M	65	30	Intoxicación por fármacos	ATD, BDZ	IMI (0.17); TIA (13); SUL (3.3) terbinafina (1.17); EtOH (2 g l <sup>-1</sup> ) +
Control 4	M	65	50	Accidente vehículo a motor		Negativo -

Tabla 1 (continuación).

CASO	SEXO (F/M)	EDAD <sup>1</sup> (años)	PM <sup>2</sup> (h)	CAUSA DE LA MUERTE	TRATAMIENTO <sup>3</sup> (formulado en la autopsia)	FARMACO EN SANGRE <sup>4</sup> (mg ml <sup>-1</sup> ) Se considera tto +/-
Caso 5	F	58	27	Ahorcado	ATD, BDZ	Negativo -
Control 5	F	58	37	Accidente vehículo a motor	BDZ, PC	Negativo -
Caso 6	M	42	20	Salto desde altura	APS, ATD	Clotiapina; BDZ, Metamizol -
Control 6	M	41	19	Accidente laboral		Negativo -
Caso 7	F	88	9	Salto desde altura	ATD, BDZ	SER (0.03) +
Control 7	F	81	19	Paro cardíaco		Negativo -
Caso 8	F	68	25	Salto desde altura	ATD	SER (0.4) +
Control 8	F	68	38	Accidente vehículo a motor	ASA	Negativo -
Caso 9	F	64	27	Salto desde altura	ATD, BDZ	MIA; CIT +
Control 9	F	66	16	Accidente vehículo a motor		Negativo -
Caso 10	F	64	25	Salto desde altura	APS,ATD, BDZ	CIT +
Control 10	F	67	35	Paro cardíaco		Negativo -
Caso 11	F	71	19	Salto desde altura	TEO, ASA	TEO, AAS -
Control 11	F	70	18	Accidente vehículo a motor		Negativo -
Caso 12	F	73	18	Salto desde altura	LIT, BDZ	No realizado
Control 12	F	74	19	Accidente vehículo a motor		Paracetamol
Caso 13	M	43	34	Ahorcado	ATD, BDZ	CIT, BDZ +
Control 13	M	44	21	Accidente vehículo a motor		Negativo -
Caso 14	M	43	15	Salto a las vías del tren	ATD, BDZ	BDZ -
Control 14	M	43	10	Accidente vehículo a motor		Negativo -
Caso 15	M	73	17	Ahogado	APS, ATD,	AMI; NOR; Trazodona; BDZ Ibuprofeno +
Control 15	M	71	14	Explosión		No realizado

**Tabla 1 (continuación).**

<sup>1</sup> Edad en el momento de la muerte.

<sup>2</sup> PM: postmortem; tiempo pasado hasta la autopsia.

<sup>3</sup> Tratamiento, codificado como: trimetoprima (TMT), sulfametoxazol (SMZ), antidepresivos (ATD), piroxicam (PC), antipsicóticos (APS), ácido acetilsalicílico (ASA), teofilina (TEO), benzodiazepinas (BDZ) y litio (LIT).

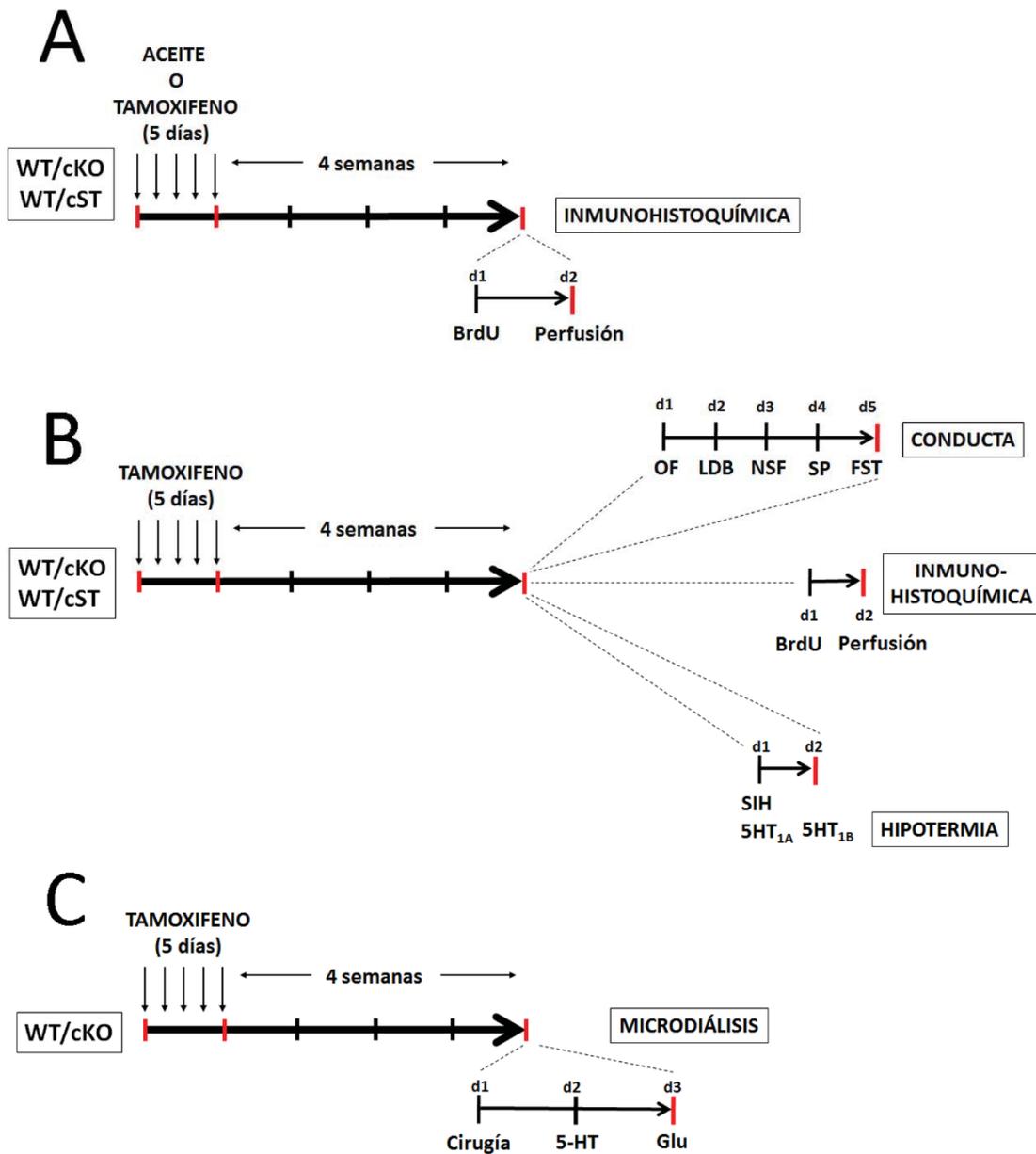
<sup>4</sup> Niveles de fármaco en sangre, codificados como: citalopram (CIT), imipramina (IMI), tiaprida (TIA), sulpirida (SUL), sertralina (SER), mianserina (MIA), benzodiazepines (BDZ), amitriptilina (AMI), nortriptilina (NOR).

## **2. GRUPOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS**

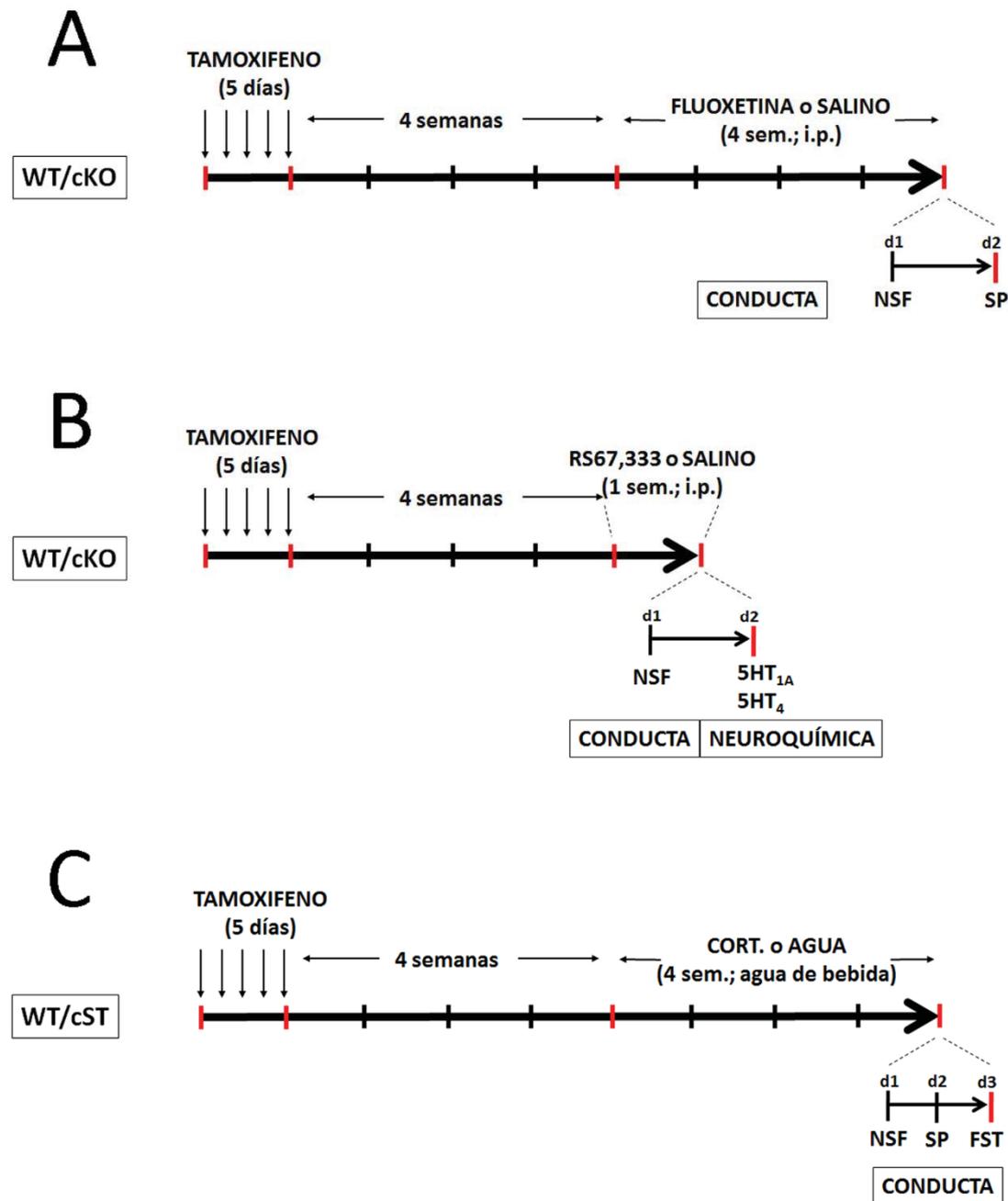
Los grupos experimentales fueron diseñados de acuerdo con los objetivos para cada tipo de estudio (detallados en cada experimento). El número de animales utilizado en cada uno de los estudios se indica en el apartado de resultados.

### **2.1. ESTUDIOS SOBRE $\beta$ -CATENINA**

La caracterización neuroquímica de los animales cKO y cST para  $\beta$ -catenina se realizó 4 semanas después de la inducción del animal transgénico mediante la administración de tamoxifeno (TMX), y sus respectivos controles (vehículo, aceite de maíz). Los grupos experimentales para los ratones cKO fueron: WT aceite, WT TMX, cKO aceite, y cKO TMX; mientras que para los animales cST fueron: WT aceite, WT TMX, cST aceite y cST TMX (fig. 10A).



**Figura 10.** Representación del curso temporal de la generación y experimentación con los animales transgénicos condicionales para  $\beta$ -catenina. A) Inducción de los transgénicos para  $\beta$ -catenina (cKO y cST) y posteriores estudios inmunohistoquímicos (BrdU, Ki67 y  $\beta$ -catenina). B) Inducción de los animales transgénicos para  $\beta$ -catenina (cKO y cST), y posteriores estudios conductuales, inmunohistoquímicos (DCX) e hipotermia inducida por agonistas 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub>. C) Generación del animal cKO  $\beta$ -catenina y posteriores estudios de microdiálisis *in vivo* para determinar los niveles de serotonina (5-HT) y glutamato (Glu). WT: *wildtype*, cKO: *conditional knockout*, cST: *conditional stabilized*, OF: *open field test*, LDB: *light/dark box test*, NSF: *novelty suppressed feeding test*, SP: *sucrose preference test*, FST: *forced swimming test*, SIH: *stress-induced hyperthermia*,



**Figura 11.** Representación del curso temporal de la generación y experimentación con los animales transgénicos condicionales para  $\beta$ -catenina. A) Generación del animal cKO para  $\beta$ -catenina, tratamiento crónico con fluoxetina y posteriores test conductuales. B) Generación del animal cKO para  $\beta$ -catenina, tratamiento subcrónico con el agonista parcial del receptor 5-HT<sub>4</sub> RS67,333, y posteriores estudios conductuales y neuroquímicos. D) Generación del animal cST para  $\beta$ -catenina, inducción del modelo animal de depresión por administración crónica de corticosterona, y posteriores test conductuales. WT: *wildtype*, cKO: *conditional knockout*, cST: *conditional stabilized*, OF: *open field test*, LDB: *light/dark box test*, NSF: *novelty suppressed feeding test*, SP: *sucrose preference test*, FST: *forced swimming test*, SIH: *stress-induced hyperthermia*, CORT: corticosterona.

En el resto de los estudios de caracterización (conductuales, neuroquímicos y moleculares; figs. 10 y 11), se utilizaron solamente los animales cKO y cST y sus respectivos animales *wildtype*, a los que se administró tamoxifeno. Los animales cKO y sus respectivos WT fueron sometidos a los siguientes tratamientos farmacológicos:

- **Fluoxetina** (10 mg/kg/día, i.p.), disuelta en suero salino y administrada durante 28 días. Los animales control recibieron suero salino (fig. 11A).
- **RS67,333** (1,5 mg/kg/día, i.p.). Este compuesto agonista parcial de los receptores 5-HT<sub>4</sub> se disolvió en suero salino, y fue administrado durante 7 días. Los animales control recibieron suero salino (fig. 11B).

En los animales cST para  $\beta$ -catenina y sus respectivos WT, se realizó el **modelo de administración crónica de corticosterona**. Después de 4 semanas de la administración de tamoxifeno, a la mitad de los animales se les administró corticosterona (4-pregnen-11beta, 21-diol-3, 20-dione 21- hemisuccinate) (Steraloids Inc., Rhode Island, EEUU) en el agua de bebida a un rango de dosis entre 7-10 mg/kg/día, durante 4 semanas, siguiendo el protocolo descrito con anterioridad (Gourley & Taylor, 2009). Los animales control recibieron agua (fig. 11C).

## 2.2. ESTUDIOS SOBRE mTOR

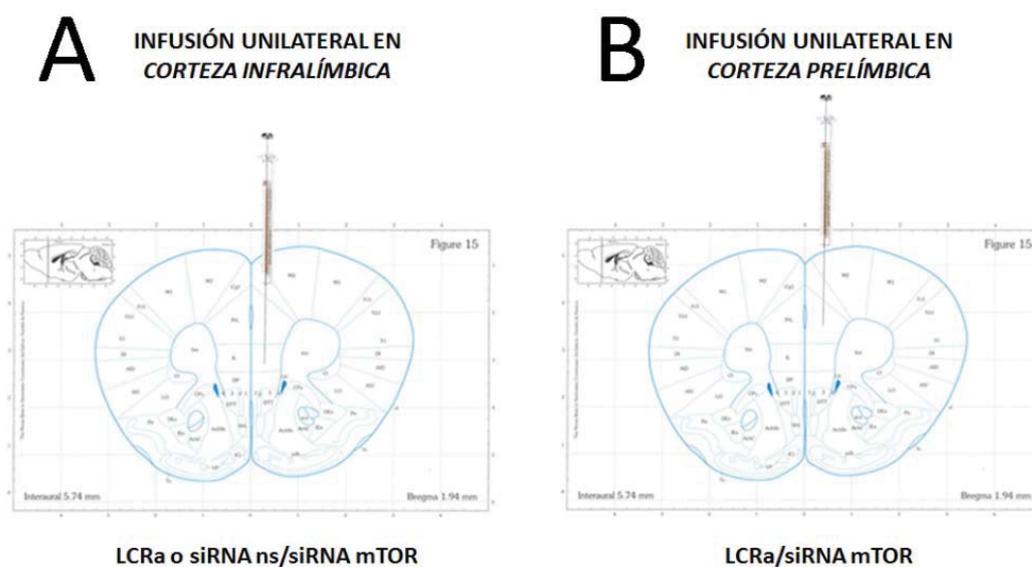
### 2.2.1. SILENCIAMIENTO AGUDO DE mTOR

Para los experimentos agudos, se realizó una única infusión unilateral de las moléculas de ARN interferente pequeño (*small interference RNA*, siRNA) específicas contra mTOR (siRNA mTOR), tanto en la *corteza infralímbica* (IL) como en la *corteza prelímbica* (PL) (fig. 12). Para cada una de estas áreas cerebrales, se utilizaron además grupos experimentales control, que fueron infundidos con líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa). En *corteza infralímbica*, se utilizó además como control un grupo al que se le administró un siRNA *non-sense* (siRNA ns).

Los siRNAs utilizados fueron una mezcla de dos secuencias diferentes, siRNA-mTOR 1 y siRNA-mTOR 2 (NM\_020009.2; Microsynth, Balgach, Suiza), cuyas secuencias específicas son respectivamente: 5'GAA GGU CAC UGA GGA UUU ATT 3'

y 5'ACC CGG GCG UGA UCA AUA ATT 3'. Los siRNAs se disolvieron en líquido cefalorraquídeo artificial (NaCl 125 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 1,18 mM, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 1,26 mM y glucosa 5%). Para cada infusión se administraron 40 µg de siRNA (20 µg de cada uno) disueltos en un volumen final de 1 µl. Como control se infundió a los animales LCRA y siRNA ns.

Para la infusión intracerebral de las moléculas de siRNA contra mTOR, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p) y colocados a continuación en un aparato estereotáxico (David Kopf instruments, California, EEUU). Se practicó una incisión longitudinal en la parte superior de la cabeza y se separó la piel para dejar el cráneo al descubierto. Las coordenadas se calcularon de acuerdo al atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001). Dependiendo del grupo experimental, la infusión de los siRNAs o LCRA para los controles, se realizó en *corteza prefrontal infralímbica* (IL; AP (+2,2), L (-0,2), DV (-3,4)), o *corteza prefrontal prelímbica* (PL; AP (+2,0), L (-0,2), DV (-2,0)).



**Figura 12.** Esquema de las áreas en las que se realizó el silenciamiento de mTOR: A) *corteza infralímbica*, B) *corteza prelímbica*.

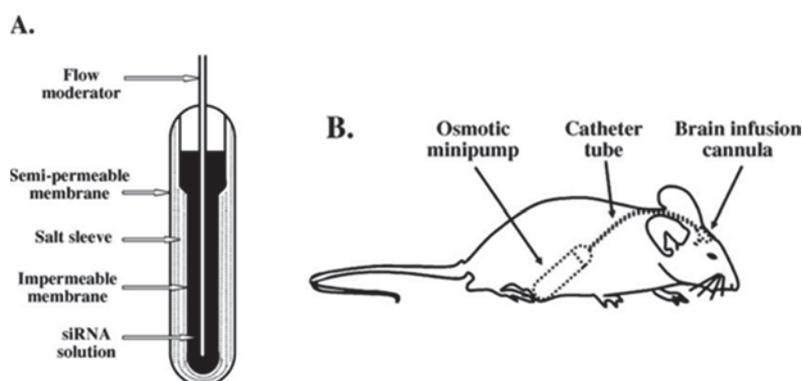
En el tratamiento agudo, se infundió unilateralmente el pool de moléculas de siRNA en la *corteza* IL y en la *corteza* PL, mediante una jeringa Hamilton<sup>®</sup> de 10 µl (Sigma-

Aldrich, Missouri, EEUU) acoplada a una bomba de infusión (KDS 310 Plus Nano Legacy, KD Scientific Inc, Massachusetts, EEUU). Como grupos controles, además de LCRA, también se administró en *corteza IL*, una molécula de siRNA *nonsense* (siRNA ns, 10  $\mu\text{g}$ ) cuya secuencia es 5'AGU ACU GCU UAC GAU ACG GTT 3'. Los animales fueron sacrificados 48 horas después de la infusión mediante dislocación cervical.

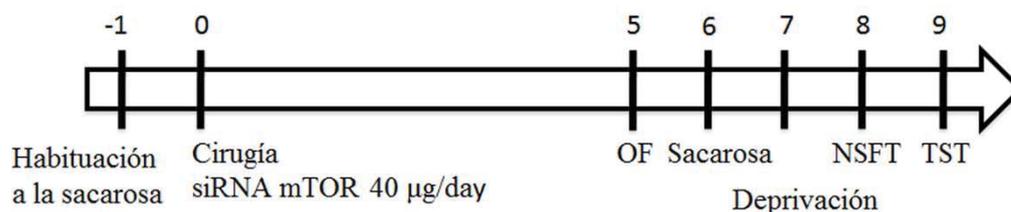
### 2.2.2. SILENCIAMIENTO SUBCRÓNICO DE mTOR

En el tratamiento subcrónico se utilizaron mini-bombas osmóticas (Modelo 1007D, Alzet<sup>®</sup>, California, EEUU) (fig. 13), que fueron pretratadas y cargadas siguiendo el protocolo que describe la casa comercial. Brevemente, las minibombas se rellenan completamente con la solución de trabajo evitando la formación de burbujas que puedan provocar fluctuaciones en la dosis administrada. Estas minibombas se activan incubándolas en solución salina durante toda la noche a 37°C.

En este estudio, los animales fueron infundidos únicamente en la *corteza IL*. Se administró el *pool* de siRNAs específicos para mTOR a una dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{día}$ , concentración 3,33  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , flujo constante de 12  $\mu\text{L}/\text{día}$ , durante 7 días (fig. 13). Los animales control recibieron LCRA. El esquema de trabajo seguido se detalla en la figura 14. 48 horas después del último día de infusión los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical.



**Figura 13.** Esquema gráfico de las minibombas osmóticas Alzet (A), y su colocación en el animal (B).



**Figura 14.** Diagrama de trabajo que se siguió durante el silenciamiento subcrónico de mTOR en corteza IL. Los animales fueron habituados a la sacarosa 24 h antes de la cirugía. Los diferentes test conductuales se realizaron entre los días 5 y 9 después de la cirugía. Tras 5 h del último test, los grupos experimentales se sacrificaron para posteriores estudios neuroquímicos y moleculares. OF: *open field test*, NSFT: *novelty suppressed feeding test*, TST: *tail suspension test*.

### 3. FÁRMACOS Y REACTIVOS

**Tabla 2.** Reactivos utilizados.

REACTIVOS	PROVEEDOR
(±)8-OH-DPAT	Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido
(+)8-OH-DPAT	Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido
[ $\alpha$ - <sup>33</sup> P]-dATP (desoxiadenosina trifosfato)	Perkin Elmer, Massachusetts, EEUU
[ <sup>35</sup> S]-GTP $\gamma$ S (guanosina 5'-[ $\gamma$ -tio] trifosfato)	Perkin Elmer, Massachusetts, EEUU
Aceite de maíz	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
Ácido bórico	Panreac, Barcelona, España
Ácido cítrico	Merck, New jersey, EEUU
Ácido clorhídrico	Scharlab S.L., Barcelona, España
Acrilamida 40% /solución Bis, 37.5:1	Bio-Rad, California, EEUU
Adenosina deaminasa (ADA)	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
Agarosa	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
AMPC ELISA Kit competitivo	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU

<b>REACTIVOS</b>	<b>PROVEEDOR</b>
<b>Antipaina</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Aprotinina</b>	Affymetrix - USB® Products, Ohio, EEUU
<b>Bromodesoxiuridina (BrdU)</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Panreac, Barcelona, España
<b>Cantaridina</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Chaps</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Citalopram</b>	Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido
<b>Citrato sódico</b>	Panreac, Barcelona, España
<b>Citrato sódico tribásico dihidratado</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Cloroformo</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Corticosterona</b>	Steraloids, Inc., Rhode Island, EEUU
<b>CP94,253</b>	Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido
<b>DAB Substrate Kit</b>	Vector Laboratories, California, EEUU
<b>DC™ Protein Assay</b>	Bio-Rad, California, EEUU
<b>Deoxicolato de sodio</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Dietilpirocarbonato (DEPC)</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>DPX de montaje</b>	BDH Prolabo/VWR, Tingalpa, Australia
<b>Drean TAQ Green PCR Master Mix</b>	Fischer Scientific S.L., Madrid, Spain
<b>DTT</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>E-6410</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>EDTA</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>EGTA</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Eosina</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Esperma de salmón</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Etanol</b>	Scharlab S.L., Barcelona, España
<b>Ficoll</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Fluoxetina</b>	Guinama, Valencia, España
<b>Formamida</b>	Scharlab S.L., Barcelona, España

<b>REACTIVOS</b>	<b>PROVEEDOR</b>
<b>Fosfato de sodio</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Fosfocreatina</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>GDP</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Glicina</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>GTP<math>\gamma</math>S</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Guanidina hidrociorada</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Hepes</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>IBMX</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Igepal</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Isopropanol</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>KCl</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Leupeptina</b>	Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido
<b>Líquido de centelleo</b>	Perkin Elmer, Massachusetts, EEUU
<b>Metanol</b>	Scharlab S.L., Barcelona, España
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Scharlab S.L., Barcelona, España
<b>Miokinasa</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>NaCl</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Nescofilm</b>	Bando Chemical Ind., Kobe, Japan
<b>Paraformaldehído</b>	Affymetrix, Ohio, EEUU
<b>Pentobarbital sódico</b>	Boeringher Ingelheim, Alemania
<b>Pepstatina</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Peróxido de hidrógeno</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Persulfato amónico (APS)</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Pronasa</b>	Calbiochem, California, EEUU
<b>Proteinasa K</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Quimostatina</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU

<b>REACTIVOS</b>	<b>PROVEEDOR</b>
<b>Rojo fenol</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>RS67,333</b>	Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido
<b>Sacarosa</b>	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España
<b>Sarcosil</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>SDS (docecil sulfato de sodio)</b>	Fischer Scientific S.L., Madrid, Spain
<b>Suero de burro</b>	EMD Millipore, Massachusetts, EEUU
<b>Sulfato de dextrano</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>SybrGreen Master Mix</b>	Fischer Scientific S.L., Madrid, España
<b>SYBR® safe DNA gel stain</b>	Fischer Scientific S.L., Madrid, Spain
<b>Tamoxifeno</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>TEMED</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Transferasa terminal (TdT)</b>	Promega Biotech Ibérica S.L., Madrid, España
<b>Tris-HCl</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>TRI Reagent®</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Triton X-100</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Urea</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Vanadato sódico</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Vectastain ABC HRP Kit</b>	Vector Laboratories, California, EEUU
<b>WAY100,635</b>	Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido
<b>Xileno</b>	Scharlab S.L., Barcelona, España
<b>Zacoprida</b>	Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido

#### **4. ESTUDIOS CONDUCTUALES**

En la realización de todos los test conductuales, los animales fueron trasladados desde su sala de estabulación a la zona de evaluación del comportamiento en sus propias jaulas, permitiéndoles habituarse al nuevo entorno durante al menos una hora antes de la

prueba. En este trabajo, los animales fueron sometidos a las siguientes pruebas comportamentales:

#### **4.1. *OPEN FIELD TEST (OFT) O TEST DE CAMPO ABIERTO***

El test de campo abierto consiste en evaluar la conducta del animal en un recinto cuadrado (50 x 50 x 30 cm) y bajo condiciones aversivas de luminosidad (400 luxes en experimentos con transgénicos condicionales para  $\beta$ -catenina, y 40-50 luxes para experimentos de silenciamiento de mTOR). El test se realizó como se ha descrito previamente (Amigo et al, 2016), evaluándose la conducta motora en el centro del recinto iluminado. En cada una de las 3 sesiones de 5 min se analizaron los siguientes parámetros: la distancia total recorrida y el porcentaje del tiempo de permanencia en la zona central. El registro y análisis conductual se realizó utilizando el sistema Any-maze Video-Tracking software (Colorado, EEUU).

#### **4.2. *LIGHT-DARK BOX (LDB) O TEST DE LA CAJA CLARA-OSCURA***

Esta prueba es de gran utilidad para la validación del carácter ansiolítico de diferentes compuestos. El LDB consiste en evaluar la respuesta ansiosa de los animales en un recinto cuadrado (40 x 40x 20 cm) que contiene dos zonas, una clara (60 luxes) y otra oscura (0 luxes aproximadamente) (Crawley & Goodwin, 1980). Ambas zonas se encuentran conectadas por una abertura a nivel del suelo. El test empieza colocando al animal en una de las esquinas del compartimento claro, evaluando durante un periodo de 5 min el tiempo que permanece en cada zona. Los resultados se presentan como el ratio entre el tiempo empleado en la zona clara y el tiempo en la zona oscura. La conducta de los animales fue evaluada con la ayuda del Any-maze Video-Tracking software (Colorado, EEUU).

#### **4.3. *NOVELTY-SUPRESSED FEEDING (NSF) TEST***

Este test se utiliza para evaluar la conducta de tipo ansiosa, y la respuesta al tratamiento crónico con antidepresivos (Bodnoff et al, 1988; Santarelli et al, 2003), por lo

que es de gran utilidad para la comprensión de las acciones terapéuticas de estos fármacos. El tiempo de latencia a comer una pieza de comida situada en el centro iluminado (40-50 luxes en experimentos con transgénicos condicionales para  $\beta$ -catenina, y 1100 luxes para experimentos de silenciamiento de mTOR) de un recinto cuadrado (50 x 50 x 30 cm), fue medido en sesiones de 10 min, previa deprivación de comida durante 24 h. Transcurrido el test, cada animal fue devuelto a su jaula para realizar el post-test donde se analiza para cada animal el consumo de comida durante 5 min. Aquellos animales que no comieron en su jaula durante el post-test fueron excluidos de los resultados. Para los animales que no comieron durante el tiempo de duración del test, se les asignó el valor de 10 min. Los tiempos fueron evaluados con la ayuda del Any-maze Video-Tracking software (Colorado, EEUU).

#### **4.4. PREFERENCIA E INGESTA DE SACAROSA**

La anhedonia, pérdida o incapacidad de reactividad a los estímulos placenteros, se determina en modelos animales mediante una disminución en la ingesta o la preferencia por sustancias apetitosas (solución azucarada), demostrando así un estado de tipo depresivo. De hecho, la anhedonia se utiliza como criterio de la respuesta en modelos animales de estrés crónico y en modelos animales de depresión. A su vez, los compuestos con actividad antidepressiva son capaces de revertir este déficit.

Durante el test, los animales tienen la libertad de escoger entre dos biberones, uno que contiene una solución de sacarosa al 2% y el otro que contiene agua corriente durante un periodo de 24 h. Para evitar posibles efectos de preferencia por la localización del biberón, la posición de los biberones se intercambiaba a las 12 h del inicio del test. Los animales no fueron sometidos a deprivación ni de alimento ni de bebida antes de la realización del test.

El consumo de agua y de la solución con sacarosa se evaluó simultáneamente en los grupos control y experimental mediante el peso de los biberones. La ingesta de sacarosa se determinó mediante la cantidad de sacarosa consumida en mg por g de peso del animal. La preferencia por sacarosa se calculó como porcentaje de solución azucarada consumida con respecto al consumo total de líquido (agua+sacarosa).

#### **4.5. FORCED SWIMMING TEST (FST) O TEST DE LA NATACIÓN FORZADA**

El test de la natación forzada (Porsolt et al, 1977) consiste en evaluar la conducta de los animales cuando éstos son introducidos en un cilindro de vidrio (19 cm de diámetro y 23 cm de altura), dos tercios de los cuales están llenos de agua a 23-25°C. Esta conducta se graba durante 6 min (Any-maze Video Tracking System, Colorado, EEUU), evaluando en los últimos 4 min el tiempo de inmovilidad (flotando en el agua sin luchar, produciendo únicamente aquellos movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua), la natación (*swimming*) y la escalada (*climbing*). Dicha conducta de inactividad o inmovilidad es interpretada como una medida de conducta de tipo depresiva o desesperación del animal (*behavioural despair*), y ha sido usado para evaluar comportamientos de tipo antidepresivo o depresivo en respuesta tanto a tratamientos farmacológicos, como en varios modelos animales (Cryan et al, 2002).

#### **4.6. TAIL SUSPENSION TEST (TST) O TEST DE SUSPENSIÓN DE LA COLA**

El test de suspensión de la cola es ampliamente utilizado para evaluar el potencial antidepresivo de diversos compuestos. El test incluye varias ventajas como rapidez, bajo coste, y elevada validez predictiva para el efecto agudo de compuestos con actividad antidepresiva. Se basa en que, el animal sometido a un evento breve de estrés sin escapatoria al ser suspendido por la cola desarrollará una postura inmóvil (Thierry et al, 1986). En los últimos años también ha sido utilizado para la caracterización conductual de animales modificados genéticamente (O'Leary & Cryan, 2013).

Los animales fueron suspendidos 30 cm por encima de una superficie lisa mediante cinta adhesiva colocada a 1 cm de la punta de la cola del animal. Durante 6 min se contabilizó el tiempo total de inmovilidad de forma manual.

### **5. ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA**

Para los experimentos de inmunohistoquímica, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), y perfundidos por vía transcardíaca con suero salino seguido de una solución fría de paraformaldehído al 4% (PFA) en PBS. Una vez

fijados los tejidos, los cerebros fueron extraídos, postfijados durante 4 h a 4°C en PFA al 4% en PBS, pasados a una solución de sacarosa al 30% en PBS a 4°C durante 24 h, y congelados. Posteriormente, los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 40 µm en series de 6, mediante un criostato (Microm International GmbH, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU), y almacenados a -20°C en solución crioprotectora (25% glicerol, 25% etilenglicol en PBS, pH=7,4) hasta su utilización. Para cada uno de los experimentos de inmunohistoquímica se utilizó una de las seis series. A continuación, se muestran los anticuerpos utilizados en este trabajo y sus concentraciones (tabla 3).

**Tabla 3.** Relación de los anticuerpos empleados, las concentraciones utilizadas y su casa comercial.

ANTICUERPOS (dilución)	PROVEEDOR
Rabbit anti- $\beta$ -catenin (1:1000)	Santa Cruz Technologies, Texas, EEUU
Rabbit anti-Ki67 (1:5000)	Abcam, Cambridge, Reino Unido
Mouse anti-BrdU (1:500)	Roche Diagnostics, Barcelona, España
Rabbit anti c-Fos (1:1000)	Santa Cruz Technologies, Texas, EEUU
Donkey anti-rabbit IgG secondary antibody biotinilado (1:200)	The Jackson Laboratory, Maine, EEUU
Goat anti-mouse fragment IgG secondary antibody biotinilado (1:200)	The Jackson Laboratory, Maine, EEUU

## 5.1. INMUNOHISTOQUÍMICA DE $\beta$ -CATENINA

Para la realización de estos estudios seguimos el protocolo descrito con anterioridad (Mostany et al, 2008). De forma breve, las secciones en *free-floating* fueron lavadas en PBS a temperatura ambiente, incubadas en ácido cítrico 10 mM durante 20 min a 90°C, y se dejaron atemperar durante 20-30 min. Después de lavarlas en PBS, las secciones fueron incubadas en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol durante 30 min, para desactivar la peroxidasa endógena. Tras ser lavadas, las secciones fueron incubadas en PBS/0,2% Triton X-100/5% suero de burro (PBS-TS) durante 30 min, y después incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo anti- $\beta$ -catenina en PBS/0,2% Triton X-100 (PBS-T) durante toda la

noche a 4°C. Tras varios lavados en PBS, se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de *burro anti-conejo biotinilado*, seguido de amplificación con el complejo avidina-biotina (Vectastain ABC HRP kit, Vector Laboratories, California, EEUU). Las células positivas para  $\beta$ -catenina se marcaron mediante incubación con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, Vector Laboratories, California, EEUU) como cromógeno.

## 5.2. INMUNOHISTOQUÍMICA DE BROMODESOXIURIDINA (BrdU)

Con el objetivo de identificar las células en proliferación, se administró el análogo de timidina, bromodesoxiuridina (BrdU). El protocolo consistió en 4 administraciones de BrdU 75 mg/kg i.p., a intervalos de 2 h. 24 h después de la última administración, los animales se anestesiaron profundamente con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) y se perfundieron como se ha indicado anteriormente (apartado 5). La inmunohistoquímica se realizó siguiendo el protocolo de Mostany *et al.* (2008). Las secciones en *free-floating* se incubaron durante 2 h en 50% formamida/2x SSC a 65°C, seguido por lavados en SSC 2x a 37°C, incubación en HCl 2N durante 30 min a 37°C. A continuación, las secciones fueron incubadas durante 10 min en ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 0,1 M a 37°C. Tras varios lavados en PBS y para inactivar la peroxidasa endógena, las secciones se incubaron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% durante 30 min, y se lavaron de nuevo en PBS antes de ser bloqueadas en solución PBS-TS durante 30 min. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario monoclonal *ratón anti-BrdU* (fragmento) durante toda la noche a 4°C en PBS-T. Tras la incubación, se realizaron 5 lavados en PBS, y las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario fragmento Fab de *burro anti-ratón biotinilado* (*biotinylated goat anti-mouse Fab Fragment IgG secondary antibody*) durante 2 h. La señal se amplificó con el complejo avidina-biotina (Vectastain ABC HRP kit, Vector Laboratories, California, EEUU) y se reveló la señal mediante el cromógeno DAB (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, Vector Laboratories, California, EEUU).

### 5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA NUCLEAR Ki67

El protocolo que se siguió para el marcaje de la proteína nuclear Ki-67 fue el siguiente: después de lavar los tejidos a temperatura ambiente con PBS, las secciones en *free-floating* se incubaron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% en metanol durante 10 min para inactivar la peroxidasa endógena. Después de los lavados, se incubaron en solución de desenmascarado (*buffer* citrato 10 mM, pH=9,0) para facilitar la presentación del antígeno, durante 30 min a 80°C, dejándose enfriar durante 20-30 min. Después de nuevos lavados, las secciones se incubaron en solución de bloqueo (Tris 50 mM pH=7,4, NaCl 0,1 M, 5% Triton X-100, 1% suero de burro, 1% albúmina sérica bovina) durante 30 min, y posteriormente se incubaron con el anticuerpo monoclonal *rabbit anti-Ki67* toda la noche a 4°C en solución de bloqueo. Tras varios lavados en PBS las secciones se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h con el anticuerpo secundario *burro anti-conejo biotinilado* en solución de bloqueo seguido de la amplificación con el complejo avidina-biotina durante 30 min. Las células positivas para Ki67 se marcaron con el cromógeno DAB.

### 5.4. INMUNOHISTOQUÍMICA DE c-Fos

Según el protocolo descrito (Felix-Ortiz et al, 2016) las secciones fueron lavadas en PBS, incubadas 10 min en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03% en PBS, lavados en PBS, e incubadas a temperatura ambiente en solución de bloqueo PBS-TS (0,2% Triton X-100/ 2% suero de burro) durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con el anticuerpo primario *rabbit anti-c-Fos* en solución PBS-S (2% suero de burro) durante toda la noche a 4°C. Las secciones fueron lavadas en PBS-T (0,2% Triton X-100), e incubadas con el anticuerpo secundario *burro anti-conejo biotinilado* durante 2 horas en la solución de bloqueo a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se lavaron, se amplificó la señal incubando con el complejo avidina-biotina (Vectastain ABC HRP kit, standard peroxidase, Vector Laboratories, California, EEUU) durante 30 min, y se lavaron con PBS. Finalmente, las células c-Fos positivas se visualizaron mediante el cromógeno DAB (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, Vector Laboratories, California, EEUU).

## **6. FUNCIONALIDAD DE RECEPTORES MEDIANTE ESTUDIOS DE FIJACIÓN DE [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S**

### **6.1. BINDING FUNCIONAL: FIJACIÓN DE [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>1A</sub>**

Los experimentos de cuantificación del nivel de activación de proteínas G mediante la incorporación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S tras la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en homogeneizados de *corteza* (Cx) de ratón, se llevaron a cabo siguiendo las condiciones descritas por Pilar-Cuéllar *et al.* (2016) con ligeras modificaciones.

#### **6.1.1. PREPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS**

Las muestras de Cx se homogeneizaron en 10 volúmenes (p/v) del tampón de homogeneización 1 (Tris-HCl 50 mM, pH=7,6, sacarosa 0,32 M), empleando un homogeneizador (Polytron Ultraturrax<sup>®</sup> T-25, Carolina del Norte, EEUU) a velocidad máxima (800 r.p.m.), 3 veces durante 10 s a 4°C. El homogeneizado se centrifugó a 900 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 48000 x g durante 25 min a 4°C, y el *pellet* conseguido se resuspendió en 10 volúmenes de tampón de homogeneización 2 (Tris-HCl 50 mM pH=7,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, EGTA 1mM, DTT 1mM). El homogeneizado obtenido se incubó durante 15 min a 37°C, de este modo conseguimos eliminar los neurotransmisores endógenos, y se dejó enfriar a 4°C. Seguidamente este homogeneizado se centrifugó a 48000 x g durante 25 min a 4°C. El *pellet* obtenido se guardó a -80°C hasta el momento de su utilización.

#### **6.1.2. ENSAYOS DE BINDING FUNCIONAL: FIJACIÓN DE [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>1A</sub>**

Las alícuotas de homogeneizado de Cx obtenidas, se descongelaron y se resuspendieron en un volumen final de 250  $\mu$ L/tubo (20-40  $\mu$ g/mL de proteína) en tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, pH=7,4, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NaCl 100 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, GDP 300  $\mu$ M, adenosina deaminasa 10 mU/mL). La concentración de proteína presente se determinó utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar, aplicando

el método Lowry modificado (DC™ Protein Assay, BioRad), y cuantificando a 620 nm de longitud de onda, en un lector de placas Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). Las muestras procedentes de los homogeneizados de membrana se utilizaron en las siguientes condiciones experimentales:

- Fijación basal: [<sup>35</sup>S]GTPγS 0,1 nM
- Fijación inducida por el agonista 5-HT<sub>1A</sub>: [<sup>35</sup>S]GTPγS 0,1 nM + (±) 8-OH-DPAT (10<sup>-9</sup>-10<sup>-4</sup> M)
- Fijación no específica: [<sup>35</sup>S]GTPγS 0,1 nM + GTPγS 10<sup>-5</sup> M

Después de incubar las diferentes condiciones durante 30 min a 30°C, se procedió a separar el radioligando unido a la fracción de membranas de aquel que permanece libre mediante 3 filtraciones rápidas de 5 min con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH=7,4). El proceso se realiza mediante vacío, utilizando un sistema de filtrado simultáneo (Cell Harvester M-24R, Maryland, EEUU) a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B), pretratados en tampón de lavado. Una vez realizados los lavados, los filtros se dejaron secar y se colocaron en viales de plástico que contenían 2 mL de líquido de centelleo (Ultima Gold XR, Perkin Elmer, Massachusetts, EEUU). Por último, se cuantificó la radioactividad retenida en los filtros, empleando un contador de centelleo líquido (Packard Tri-Carb 2200, California, EEUU).

### 6.1.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA

La interacción de un ligando con su receptor responde a la ley de acción de masas, debido a que esta interacción no es lineal con respecto a la concentración del ligando, concentración de proteína (receptores) o el tiempo de interacción. Por ello, el análisis mediante una regresión no lineal, es el método matemático más preciso de análisis en este tipo de ensayos.

La fijación de radioligando obtenida en la condición *no específica* se restó del resto de las condiciones. El efecto del agonista se representó como el porcentaje de estimulación específica de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS sobre el valor de fijación basal, para cada concentración del agonista (±) 8-OH-DPAT. Estos valores se ajustaron a una curva concentración-respuesta mediante un análisis de regresión no lineal realizado con la ayuda del programa informático *GraphPad Prism 6*® (GraphPad Software, California, EEUU). A

partir de este ajuste se obtuvieron los parámetros farmacológicos de potencia, expresado como logaritmo negativo de la concentración eficaz 50 (pEC<sub>50</sub>) y de eficacia (porcentaje de estimulación máxima, % E<sub>max</sub>).

## **6.2. AUTORADIOGRAFÍA FUNCIONAL: FIJACIÓN DE [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> Y 5-HT<sub>1B</sub>**

La autorradiografía funcional nos permite conocer la localización y el nivel de activación de un receptor por un agonista específico. Esto nos proporciona información sobre la eficacia del acoplamiento entre el receptor y la proteína G, primer paso intracelular en la cascada de señalización después de la activación del receptor.

### **6.2.1. PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS**

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, los cerebros se sacaron rápidamente, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización. Mediante un criostato (Microm International GmbH, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU), se obtuvieron cortes coronales de 14  $\mu$ m de grosor, de los niveles anatómicos relevantes para los diferentes estudios, de acuerdo con el atlas de ratón de Paxinos y Franklin (2001). Dichas secciones se dispusieron sobre portaobjetos Superfrost Plus<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU), y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

### **6.2.2. METODOLOGÍA DEL MARCAJE AUTORADIOGRÁFICO CON [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S TRAS ESTIMULACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>1A</sub>**

La autorradiografía se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente (Castro et al, 2003) con ligeras modificaciones. Inicialmente las secciones fueron preincubadas a 25°C durante 30 min en tampón de preincubación (Tris-HCl 50 mM, pH=7,4, EGTA 0,2 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, GDP 2 mM, DTT 1 mM). Seguidamente se realizó una incubación de 2 h a 25°C en el mismo tampón añadiéndole

adenosina deaminasa 10 mU/mL y el radioligando [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S 0,05 nM en ausencia (fijación basal) o presencia (fijación específica) del agonista selectivo del receptor 5-HT $_{1A}$  ( $\pm$ ) 8-OH-DPAT. Para determinar la fijación inespecífica del radioligando, se incubó otra serie de secciones con GTP $\gamma$ S 10  $\mu\text{M}$  no marcado radiactivamente. Tras la incubación se realizaron dos lavados de 15 min a 4°C con el tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH=7,4), seguido de un aclarado en agua destilada a la misma temperatura. Para finalizar, los cortes se dejaron secar por medio de una corriente de aire frío. Una vez secos se procedió a la exposición de las secciones tisulares a *films* sensibles a  $^{35}\text{S}$  (Biomax MR, Kodak, Madrid, España), en chasis herméticos a la luz durante 3 días a -20°C. Para visualizar la señal del radioligando, la película fotográfica se reveló durante 5 min a temperatura ambiente en revelador LX24 (Kodak, Madrid, España), y se fijó durante 5 min mediante el fijador AL4 (Kodak, Madrid, España), finalizando con un lavado en agua y posterior secado.

### **6.2.3. METODOLOGÍA DEL MARCAJE AUTORADIOGRÁFICO CON [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S TRAS LA ESTIMULACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT $_{1B}$**

El procedimiento utilizado en el marcaje autorradiográfico tras la estimulación del receptor 5-HT $_{1B}$ , se realizó de igual modo que en el apartado anterior, pero utilizando para la condición de estimulación específica, el agonista selectivo para el receptor 5-HT $_{1B}$  CP94,253. En este caso, la composición del tampón de incubación fue similar al utilizado para el estudio del receptor 5-HT $_{1A}$ , pero conteniendo una concentración de GDP 1 mM. Tras la realización del experimento autorradiográfico, la exposición para la visualización de la funcionalidad del receptor 5-HT $_{1B}$  fue de 2 días.

### **6.2.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS AUTORADIOGRAMAS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Los autorradiogramas se digitalizaron utilizando un escáner (SNAPSCAN 1236, AGFA, Mortsel, Bélgica). La cuantificación de los autorradiogramas se realizó mediante densitometría óptica utilizando el programa informático de imagen digital gratuito ImageJ (National Institute of Mental Health, NIMH, Maryland, EEUU). ImageJ permite cuantificar los niveles de gris en el área anatómica a analizar, y transformarlos en nCi/g de tejido. Esto

se consigue exponiendo junto con los tejidos una serie de estándares de  $^{14}\text{C}$  formados por un polímero sintético que posee las mismas características de peso específico que el tejido cerebral y constan de bandas que contienen diferentes concentraciones conocidas de radiactividad. De este modo podemos generar una curva de calibración en base a la cual poder transformar los valores de densidad óptica.

Los valores de la fijación específica de  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  tras estimulación de los receptores, se calcularon sustrayendo los valores de la fijación no específica a las condiciones de fijación basal y estimulación específica. Estos valores se expresaron como, porcentaje de estimulación específica sobre la actividad basal (100%).

## **7. MEDIDA DE LA TEMPERATURA CORPORAL**

Los experimentos se llevaron a cabo en una habitación termostatazada  $21,0\pm 0,5^\circ\text{C}$  entre las 10 y las 14 h. La medida de la temperatura corporal se realizó mediante la introducción de una sonda termosensible (2 cm) acoplada a un termómetro digital, en el recto del animal, tomando la medida de la temperatura cuando ésta fue estable o pasados 15 s.

### **7.1. STRESS-INDUCED HYPERTHERMIA (SIH) O HIPERTERMIA INDUCIDA POR ESTRÉS**

La prueba evalúa los incrementos de temperatura en respuesta a un estrés agudo, controlado por el sistema nervioso autónomo. La hipertermia inducida por estrés es fácil de medir, reproducible y estable a lo largo del tiempo. Este test posee una excelente validez predictiva, de hecho, muchos fármacos ansiolíticos han mostrado una reducción dosis dependiente de esta hipertermia inducida por estrés (Bouwknicht et al, 2007).

Para la evaluación de la hipertermia inducida por estrés se siguió el protocolo previamente descrito (Vinkers et al, 2008), con ligeras modificaciones. Las medidas de temperatura se realizaron a tiempo 0 ( $T_1$ ), y tras 15 min ( $T_2$ ), la temperatura inducida por el estrés se obtuvo de la diferencia entre  $T_1$  y  $T_2$  ( $\text{SIH} = T_2 - T_1$ ). El factor estresante se considera la propia toma de temperatura (Bouwknicht et al, 2007).

## **7.2. MEDIDA DEL EFECTO HIPOTÉRMICO INDUCIDO POR LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> Y 5-HT<sub>1B</sub>**

Para la realización de los experimentos nos basamos en el protocolo previamente descrito (Zazpe et al, 2006) con ligeras modificaciones. Las temperaturas basales fueron determinadas como promedio de tres medidas realizadas a intervalos de 15 min. Posteriormente se les administró a los animales, dependiendo del grupo experimental, los agonistas selectivos del receptor 5-HT<sub>1A</sub> ((±) 8-OH-DPAT, 0,5 y 0,18 mg/kg, i.p.), del receptor 5-HT<sub>1B</sub> (CP94,253, 10 mg/kg, i.p.), o suero salino como vehículo, y se tomaron medidas de temperatura a intervalos de 15 min hasta el minuto 90 después de la administración.

El efecto sobre la temperatura corporal inducido por los diferentes agonistas o por la administración del vehículo, se expresó como la diferencia entre la temperatura obtenida en cada punto y el promedio de los basales obtenidos previa administración del agonista en °C (promedio±S.E.M.). Los valores para el tiempo 0 se obtuvieron sustrayendo al promedio de los basales de todos los animales del grupo experimental, el promedio de cada animal en concreto.

## **8. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>4</sub> EN *ESTRIADO***

La adenilato ciclasa (AC) es una proteína implicada en la transducción de señales en el interior de la célula, constituyendo el siguiente paso intracelular tras la activación del receptor y su correspondiente proteína G. Esta enzima cataliza la transformación del ATP para originar el segundo mensajero AMP cíclico (cAMP). La actividad de la AC puede estar regulada por dos subtipos de proteínas G: las proteínas G<sub>s</sub> o estimuladoras, por lo que tras su activación se induciría la producción de cAMP; y las proteínas G<sub>i</sub> o inhibitorias, tras la activación de las cuales se inhibiría la actividad de la enzima resultando en una disminución en los niveles de cAMP.

El protocolo utilizado para la evaluación de la actividad adenilato ciclasa tras la estimulación de los receptores 5-HT<sub>4</sub>, fue el descrito previamente (Hall, 1934; Pascual-Brazo et al, 2012; Valdizan et al, 2003) con ligeras modificaciones.

## **8.1. PREPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS**

Las muestras de *estriado* se homogeneizaron en 60 volúmenes (p/v) de tampón de homogeneización 1 (Tris-HCl 20 mM, pH=7,4, sacarosa 0,32 M, EGTA 5 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM y 25 µg/ml de leupeptina), empleando un homogeneizador (Potter-Elvehjem Homogenizers) a velocidad máxima (800 r.p.m.), 3 veces durante 10 s a 4°C. El homogeneizado se centrifugó a 500 x g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y se centrifugó a 13000 x g durante 15 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 60 volúmenes de tampón de homogeneización 2 (Tris-HCl 20 mM, pH=7,4, sacarosa 0,25 M, EGTA 1,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, DTT 3 mM, 25 µg/ml de leupeptina), y se utilizó inmediatamente para el ensayo.

## **8.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA MODULADO POR LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>4</sub>**

Los homogeneizados de *estriado* (25-50 µg de proteína) se preincubaron a 4°C durante 15 min en el tampón de reacción (Tris-HCl 75 mM, pH=7,4, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EGTA 0,3 mM, sacarosa 60 mM, DTT 1mM) en presencia de 3-isobutil-metil-xantina (IBMX) 0,5 mM como inhibidor de fosfodiesterasas; y de fosfocreatina 5 mM, creatina fosfoquinasa 50 U/mL y mioquinasa 5 U/mL como sistema regenerador de nucleótidos cíclicos. Las diferentes condiciones experimentales fueron: actividad basal (sin agonista) y estimulación específica mediada por el receptor 5-HT<sub>4</sub>, mediante el agonista selectivo zacoprida 10 µM. La reacción se inició por la adición de ATP-Mg 0,2 mM, y se incubó durante 10 min a 37°C. A continuación, la reacción se finalizó llevando las muestras a ebullición durante 5 min, tras los cuales se centrifugaron a 14000 x g por 5 min. Finalmente, se determinó el contenido de cAMP en 50 µL de sobrenadante de cada muestra mediante el kit comercial Cyclic AMP competitive ELISA (Thermo Scientific, Massachusetts, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 8.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los valores de cAMP en las diferentes condiciones experimentales fueron obtenidos a partir de una recta de calibración utilizando concentraciones conocidas de cAMP, así como en función del contenido proteico de las muestras, expresándose los resultados en pmol de cAMP/min/mg de proteína. El efecto de la zacoprida se definió como porcentaje del efecto estimulador para cada concentración de zacoprida respecto al valor basal (100%).

## 9. ESTUDIOS DE MICRODIÁLISIS CEREBRAL *IN VIVO*

### 9.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS SONDAS DE MICRODIÁLISIS

La construcción de las sondas de microdiálisis y su uso en ratones se realizó de acuerdo a lo descrito previamente (Adell & Artigas, 1998). La sonda está formada por un tubo de acero inoxidable 25G (diámetro externo: 0,51 mm, y diámetro interno: 0,33 mm) (A-M Systems, Whashington, EEUU) de 1,5 cm de longitud. A través de este tubo se insertan dos tubos de sílica fundida (diámetro externo: 0,11 mm, y diámetro interno: 0,04 mm) (Composite Metal Services Ltd, Harlow, Reino Unido), y se recubren los tubos de sílica que sobresalen por la parte superior con dos tubos de acero inoxidable de 7 mm de longitud y 27G (diámetro externo: 0,41 mm, y diámetro interno: 0,2 mm). Para sellar la unión entre los tubos metálicos de 25G y 27G se usa una mezcla de Araldit<sup>®</sup> (Ciba-Geigy, Basilea, Suiza) y posteriormente, cemento dental TAB 2000<sup>®</sup> (Kerr Company, California, EEUU). Finalmente, se conectan dos tubos de polietileno (diámetro externo: 0,61 mm, y diámetro interno: 0,2 mm) (Portex Ltd., Kent, Reino Unido) a los dos tubos de 27G, protegiendo dicha unión mediante una funda de plástico termofundible. Pasados unos días desde la construcción del esqueleto de la sonda, se corta el tubo de sílica a la medida adecuada (2 mm) y se introduce la membrana de diálisis (Cuprophane Gambro, Lund, Suecia) en el interior del tubo de 25G, de manera que la sílica queda recubierta por ésta. El final de la membrana y el del tubo de 25G se sellan con Loctite<sup>®</sup> gel. La membrana es una fibra hueca de celulosa (diámetro externo: 0,25 mm, y diámetro interno: 0,22 mm) con un tamaño de poro que permite el paso de moléculas de peso inferior a 5 KDa.

## 9.2. IMPLANTACIÓN DE LAS SONDAS DE MICRODIÁLISIS Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la implantación de las sondas de microdiálisis, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p), y colocados en un aparato estereotáxico (David Kopf instruments, California, EEUU). A continuación, se practicó una incisión longitudinal en la parte superior de la cabeza, separando la piel para dejar el cráneo al descubierto. Las coordenadas se calcularon de acuerdo al atlas de cerebro de ratón Paxinos y Franklin (2001). Las sondas de microdiálisis se implantaron en *corteza prefrontal infralímbica* (IL; AP (+2,2), L (-0,2), DV (-3,4)) en los animales cKO  $\beta$ -catenina y sus respectivos controles, y en núcleo dorsal del raphe (DRN; AP (-4,5), L (-1,0), DV (-4,2) con un ángulo de inclinación de 20°), en los animales en los que silenció mTOR de forma aguda. Una vez establecidas las coordenadas, se realizó un agujero en el cráneo sin llegar a romper las meninges. A continuación, se realizaron dos agujeros más en forma triangular para colocar unos tornillos que permitirían el correcto anclaje de la sonda. Finalmente, se procedió a la introducción de la sonda. Para ello, se tomó la coordenada dorsoventral, se rompió la duramadre con ayuda de una aguja y se introdujo la sonda. Una vez alcanzada la coordenada, se fijó la sonda al cráneo con ayuda de cemento dental TAB 2000® (Kerr Company, California, EEUU).

Una vez el animal se recuperó y los niveles alterados de neurotransmisores como consecuencia de la inserción de la sonda se estabilizaron, 24 h después de la cirugía se conectaron las sondas a una bomba de perfusión (flujo constante de 1,65  $\mu$ L/min) (Harvard Apparatus Syringe infusion Pump 22, Massachusetts, EEUU). Esta bomba permite la perfusión de LCRA mediante el uso de jeringas que se conectaron a un tubo de polietileno (diámetro exterior: 0,61; y diámetro interior: 0,28), que a su vez se conectaron con una pieza giratoria o *swivel* (Instech Laboratories, Pensilvania, EEUU) que permite al ratón moverse libremente. Esta pieza estaba conectada a la entrada de la sonda a través de un tubo de polietileno (diámetro interior: 0,12), y un tubo idéntico unía la salida de la sonda con un vial de polietileno (Elkay Products Inc, Massachusetts, EEUU) donde se recogió la muestra.

El sistema se dejó estabilizar durante 180 min, tras los cuales se empezaron a recoger los dializados (~30 µL) cada 20 min. Las 6 primeras fracciones correspondieron a los basales, de los que se tomaron los 4 valores más estables para establecer la línea basal utilizada en el análisis de datos. A continuación, se procedió a la administración de diferentes compuestos por vía intraperitoneal (i.p.) (fluoxetina) o localmente (veratridina, bicuculina), dependiendo del experimento, y se recogieron 6-7 muestras de dializado cada 20 min.

Debido a la elevada eficacia de los sistemas de recaptación de neurotransmisores, los niveles de éstos en el espacio extracelular son generalmente muy bajos, por lo que, de acuerdo con la bibliografía (Adell & Artigas, 1991), se añadió citalopram 1 µM (inhibidor de la recaptación de 5-HT) a la solución de LCRA. En presencia de estos inhibidores se puede medir principalmente el neurotransmisor liberado, sin alterar los patrones de liberación.

Tanto los niveles de serotonina como de glutamato se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector electroquímico o fluorescente respectivamente.

Tras los experimentos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les infundió solución Fast Green (Sigma-Aldrich, Massachussets, EEUU) para así, tras la realización de secciones cerebrales a 14 µm mediante criostato, verificar la correcta colocación de la sonda. Aquellos animales que no presentaban la sonda en la región deseada, fueron excluidos del análisis de datos.

## **10. ESTUDIOS DE NEUROIMAGEN**

Los estudios de neuroimagen permiten conocer la estructura de regiones cerebrales, los circuitos y la actividad funcional por ello, la neuroimagen constituye una de las principales áreas de investigación de las funciones mentales, ya que permite el estudio de regiones cerebrales y su funcionalidad la cual puede estar alterada en diferentes trastornos mentales. La resonancia magnética (RM) se ha convertido probablemente en la principal técnica de neuroimagen para el estudio de la estructura tanto en Neurología, como en Psiquiatría.

## 10.1 OBTENCIÓN DE LAS IMÁGENES

La adquisición de imágenes cerebrales por RM en los animales cKO para  $\beta$ -catenina, y sus correspondientes animales *wildtype*, se realizó en un sistema 9,4 T MR (Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania) con gradientes de 440 mT/m y empleando una antena de volumen para ratón (Neos Biotec, Pamplona, España). Los animales se introdujeron en la “cuna” del escáner donde se encuentra acoplada una mascarilla, permitiendo mantener al animal anestesiado durante todo el proceso, evitando así artefactos producidos por el movimiento del animal. Para ello se utilizó una mezcla de gases con flujo adecuado (O<sub>2</sub> (0,2-0,5 L/min)/N<sub>2</sub> (0,8-1 L/min)) y anestésico (sevoflurano 4%). El animal se monitorizó para controlar la respiración, y se recubrió con una almohadilla térmica para mantener constante la temperatura corporal. Una vez la respiración se estabilizó, se procedió a realizar un *wobble* o sintonización de los canales del emisor y receptor de la antena empleada, con lo que conseguimos que la señal se máxima. En este punto el sistema, automáticamente, realiza una serie de ajustes locales de la zona que se desea estudiar en función de la ganancia detectada tras el ajuste.

Las secuencias empleadas en nuestro estudio por RM fueron las siguientes:

- Un *triplet*, que genera tres imágenes en los planos axial, coronal y sagital que permiten colocar de forma precisa la cabeza del animal en el isocentro del imán.

- Dos secuencias *rare*, con las que conseguimos obtener 14 cortes axiales y 14 cortes coronales de la cabeza del animal y gracias a las cuales podemos previsualizar para seleccionar las zonas específicas que se desean evaluar.

- Imagen con peso T2 (T2-w), potenciando el tiempo de relajación en el eje transversal que depende de la interacción spin-spin. Estas imágenes se obtuvieron programando los siguientes parámetros en el sistema de RM 9,4 T MR:

- TE/TR (ms): 9:9/2500 (12 ecos)
- FOV (*field of view*, mm<sup>2</sup>): 19,2 x 19,2 = 38,4
- *Band Width* (KHz): 75
- *Flip angle*: 180°

- Grosor del corte (mm)/número de cortes: 0,7/18 (orientación axial)
- Resolución: 100  $\mu\text{m}$ /píxel
- Acumulaciones / tiempo de secuencia (minutos): 3/28

Una vez las secuencias finalizaron, se retiró al animal y se le permitió recuperarse en un lugar ventilado colocando una lámpara de calor sobre la jaula. Una vez recuperados los animales se trasladaron al estabulario.

## 10.2 ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES

Después de la obtención de las imágenes, se procedió a la cuantificación de las mismas, para lo que se utilizó el programa informático de imagen digital y de dominio público ImageJ (National Institute of Mental Health, NIMH, Maryland, EEUU). ImageJ nos permitió una delineación de las regiones de interés (ROI) dentro de los cortes. Realizando esta segmentación manual de las imágenes obtenidas, mediante *plugins* específicos desarrollados por el programa, pudimos obtener tanto imágenes cualitativas resultantes de la superposición de los diferentes tiempos de *eco*, como imágenes cuantitativas con mapas de tiempos T2 de cada uno de los cortes.

Para realizar el estudio se contabilizó el volumen de 16 de los 18 cortes que nos proporcionó la resonancia, aquellos más homogéneos entre las dos poblaciones, y se multiplicaron por 0,7 mm (grosor del corte) obteniéndose así el volumen total del cerebro. Para el cálculo del área del *hipocampo*, estructura relevante en el estudio, se realizó el mismo procedimiento en 4 de los cortes obtenidos que contenían esta área cerebral. Los resultados obtenidos se normalizaron, dividiendo el volumen del *hipocampo* entre el volumen total del cerebro.

Además del análisis volumétrico del *hipocampo* por RM, también se realizó una caracterización del tejido de esta estructura mediante su valor de relajación T2, que ha demostrado ser un indicador en otras enfermedades neurológicas como el Alzheimer (Luo et al, 2013). También se utilizó el *software* ImageJ para el análisis, procesado y medida de las imágenes de resonancia.

Las determinaciones de volumen se han llevado a cabo sumando todos los ecos de la secuencia T2, segmentando manualmente el *hipocampo* de los animales y midiendo su

volumen por la relación píxel-mm dada por la secuencia de adquisición. Los mapas T2 fueron calculados ajustando las imágenes obtenidas a una ecuación “ $S = A + \exp^{-TE/T2}$ ” donde TE es el tiempo de eco, parámetro característico de la secuencia utilizada. Además de éstas, fue necesario hacer una colocación de ambas imágenes (suma de ecos y mapa T2) para determinar los valores de T2 en el volumen medido. Para ello, a partir de la suma de ecos se obtuvo una máscara donde el *hipocampo* tiene el valor 1 y el resto de la imagen (cerebro, músculo, piel, etc) tiene un valor 0. Así al multiplicar esta máscara por el mapa T2, los píxeles distintos de cero serán exclusivamente aquellos que queremos medir y así podremos determinar el valor medio de T2 en el *hipocampo*.

## **11. EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* PARA LA DETECCIÓN DEL mRNA DE mTOR Y BDNF.**

La hibridación *in situ* consiste en la visualización de la localización anatómica del ácido ribonucleico mensajero (*messenger ribonucleic acid*, mRNA) que codifica para una proteína en secciones tisulares, basándose en la capacidad de éste para formar híbridos con sondas complementarias a su secuencia de nucleótidos.

### **11.1. PRETRATAMIENTO DE LOS TEJIDOS**

Previo a la realización del experimento de hibridación *in situ*, las secciones fueron tratadas siguiendo el protocolo descrito anteriormente con ligeras modificaciones (Pei et al, 1997).

Las secciones de 14  $\mu\text{m}$  de grosor adyacentes a las utilizadas en los estudios de autorradiografía funcional, y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se atemperaron y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM, NaCl 136 mM, y KCl 2,6 mM) durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente, los portas fueron lavados dos veces en PBS durante 5 min, e incubados durante 2 min en una solución de pronasa predigerida (Calbiochem, California, EEUU) a una concentración final de 24 U/mL en Tris-HCl 50 mM, pH=7,5 y EDTA 5 mM para facilitar el acceso de la sonda al interior de la célula. La actividad proteolítica se interrumpió mediante la inmersión (30 s) de las secciones en una

solución de 2 mg/mL de glicina en PBS. Finalmente se lavaron los tejidos 2 veces durante 30 s con PBS y se deshidrataron mediante un gradiente creciente de etanol (70%, 80%, 90% y 100%) dejándolos secar completamente previa utilización.

## 11.2. PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Para la detección de los mRNA correspondientes a mTOR y BDNF, se emplearon las siguientes sondas de oligonucleótidos antisentido complementarias a mTOR (5'-ACT GCC CTG TAA AAG GCT CCA TCG TGG GTG TCC CGT GGG ATC ATG-3', NM\_020009.2) y BDNF (5'-GGT CTC GTA GAA ATA TTG GTT CAG TTG GCC TTT TGA TAC CGG GAC-3', (Zetterstrom et al, 1998) y se procedió siguiendo el protocolo previamente descrito (Ferres-Coy et al, 2016). Los oligonucleótidos (2 pmol) fueron individualmente marcados en el extremo 3' con [<sup>33</sup>P]α-dATP (>2500 Ci/mmol; Perkin Elmer, Massachusetts, EEUU) en presencia de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (Calbiochem, California, EEUU).

Las sondas marcadas radioactivamente se diluyeron en una solución compuesta por: formamida 50%, 4x SSC, 1x solución de Denhart (ficoll 0,02%, polivinilpirrolidona 0,02%, albúmina sérica bovina 0,02%), sulfato de dextrano 10%, sarcosil 1%, tampón fosfato 20 mM, pH=7,0, 250 µg/mL de tRNA de levadura y 500 µL/mL de DNA de esperma de salmón. Las concentraciones finales de las sondas marcadas radioactivamente en el tampón de hibridación fueron ~1,5 nM. En este punto, las secciones de tejido se incubaron con 70 µL de esta solución y se recubrieron con Nescofilm (Bando Chemical Ind., Kobe, Japan) para evitar la evaporación, incubándose durante toda la noche a 42°C en ambiente húmedo. Para establecer el marcaje no específico, secciones adyacentes fueron incubadas con un exceso de sondas sin marcar (x50), provocando el desplazamiento completo de la sonda radioactiva de sus lugares de hibridación. Al día siguiente se realizaron 4 lavados de 45 min en tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH=7,5, NaCl 0,6 M) a 60°C.

Para visualizar la señal de hibridación, las secciones se expusieron a una película fotográfica Biomax-MR (Kodak, Madrid, España) a -80°C durante 7 días para mTOR, y 2 días para BDNF.

### **11.3. CUANTIFICACIÓN DE LOS AUTORRADIOGRAMAS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Los autorradiogramas se analizaron con la ayuda de un analizador de imágenes asistido por ordenador (MCID, Mering, Alemania). El sistema fue calibrado con microescalas de estándares ( $^{14}\text{C}$ ), pudiéndose así obtener la equivalencia en fmol/mg de proteína. Tras la calibración y la eliminación de las densidades del fondo, las densidades ópticas relativas fueron evaluadas en diferentes estructuras cerebrales, en secciones adyacentes, y por duplicado para cada animal estudiado, realizándose el promedio de las mismas. El programa permite cuantificar los niveles de gris en el área a cuantificar, y los transforma en densidades ópticas. Los resultados se expresan en valores de densidad óptica relativa.

## **12. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE *WESTERN BLOT*.**

### **12.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Las muestras se descongelaron y homogeneizaron (1:15, p/v) en tampón sin detergentes (Hepes 10 mM, pH=7,9, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, conteniendo los siguientes inhibidores de proteasas y fosfatasa: PMSF 1 mM, aprotinina 0,03 mM, leupeptina 0,02 mM, pepstatina 0,01 mM, antipaina 0,02 mM, quimostatina 0,02 mM, NaVO<sub>3</sub> 1 mM, y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM), usando un homogeneizador (Polytron Ultraturax<sup>®</sup> T-25, Carolina del Norte, EEUU) a velocidad máxima (800 r.p.m.). Después se realizó un lisado durante 30 min en hielo, añadiendo tampón con detergentes (Hepes 10 mM, pH=7,9, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Igepal 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%, CHAPS 2,5 mM). Se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min a 4°C y se recogieron las proteínas solubilizadas en el sobrenadante. La cantidad de proteína presente en las muestras se determinó mediante el método propuesto por Lowry (Lowry et al, 1951).

## 12.2. PREPARACIÓN DE LOS GELES DE ACRILAMIDA

Los geles de separación, acordes con los pesos de las proteínas a cuantificar, fueron del 8,5 % y del 15% de acrilamida. La composición total de éstos fue: 40% bisacrilamida, tampón de separación (Tris-HCl 0,4 M, pH=8,8, SDS 2,5%). Para iniciar la polimerización añadimos 10% de APS y TEMED 0,25%. Esta solución se vertió entre los vidrios, añadiendo agua destilada hasta su polimerización. Posteriormente, se eliminó el exceso de líquido de la superficie y se añadió el gel concentrador o *stacking*: 40% bisacrilamida, tampón de concentración (Tris-HCl 0,4 M, SDS 2,5%, pH=6,8, rojo fenol, APS 10% y, para iniciar la polimerización TEMED 0,25%), colocando un peine para la formación de los pocillos en los que posteriormente se dispondrán las muestras.

## 12.3. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS A LA MEMBRANA

Para la migración de las proteínas, se colocaron los geles en tanques con tampón de migración (Tris 20 mM, glicina 0,2 M, SDS 1%). Se cargaron 15 µL de cada una de las muestras, conteniendo 50-75 µg de proteína, y se inició la electroforesis con una primera etapa de 100 V durante 15 min, seguido de 50 min a 160 V. Finalizada la migración, se extrajeron los geles y se sumergieron en tampón de transferencia (Tris 20 mM, glicina 0,2 M y 20% de metanol), durante 30 min. Posteriormente, se realizó la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, California, EEUU), en tampón de transferencia a 100 V, durante 90 min para proteínas con peso molecular mayor de 40 KDa, y para proteínas con peso molecular menor de 40 KDa, 35 min a 400 mA. El proceso de transferencia se realizó a 4°C.

## 12.4. BLOQUEO, INCUBACIÓN Y DETECCIÓN

Con este paso se elimina la unión inespecífica de anticuerpos a la membrana de nitrocelulosa. Para ello, incubamos durante 1 h las membranas con leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (Tris-HCl 50 mM, pH=7,6, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%) a temperatura ambiente. En el caso de las proteínas fosforiladas, las membranas se incubaron

en TBS-T conteniendo 3% de leche desnatada y añadiendo  $\text{NaVO}_3$  1 mM y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 mM como inhibidores de fosfatasa. A continuación, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C, en tampón de incubación (de igual composición que el de bloqueo). La tabla 4 muestra los anticuerpos primarios y secundarios, las diluciones empleadas en los experimentos y sus proveedores.

**Tabla 4.** Relación de anticuerpos y sus respectivas concentraciones, utilizados para la cuantificación de dichas proteínas mediante *western blot*.

<b>ANTICUERPOS (dilución)</b>	<b>PROVEEDOR</b>
<b>Rabbit anti-mTOR (1:1000)</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Rabbit anti-p_mTOR (1:500)</b>	Cell Signaling Technology, Massachusetts EEUU
<b>Rabbit anti-4EBP1 (1:500)</b>	Cell Signaling Technology, Massachusetts, EEUU
<b>Rabbit anti-p_4EBP1 (1:500)</b>	Cell Signaling Technology, Massachusetts, EEUU
<b>Mouse anti-GAPDH (1:20000)</b>	Santa Cruz Technologies, Texas, EEUU
<b>Goat anti-Rabbit IgG–Peroxidase antibody (1:200)</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU
<b>Goat anti-Mouse IgG (Fab)–Peroxidase antibody (1:200)</b>	Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados en TBS-T de 15 min, y posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (tabla 4) en tampón de incubación durante 1 h. Finalmente, se realizaron 3 lavados en TBS-T, y los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano, se detectaron con el kit avanzado ECL (GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Alemania).

## 12.5. CUANTIFICACIÓN DENSITOMÉTRICA

La cuantificación de las bandas se llevó a cabo mediante densitometría con un programa informático de análisis de imagen gratuito ImageJ (National Institute of Mental

Health, NIMH, Maryland, EEUU). Los valores obtenidos con estos anticuerpos se normalizaron con los valores obtenidos con la proteína *house-keeping* gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) para corregir cualquier posible desviación en la carga de proteínas.

### **13. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA: PCR CUANTITATIVA (qPCR)**

Esta técnica es una variante de la PCR diseñada para cuantificar el producto de la amplificación de DNA, de manera simultánea después de cada ciclo de amplificación del gen diana. En nuestro caso se utilizaron las muestras de corteza frontal de cerebros *postmortem* de humano (muestras citadas en apartado 1.3, tabla 1), para determinar el estado de la vía de mTOR (mTOR, 4EBP1 y sus formas fosforiladas, y p70S6K).

#### **13.1. EXTRACCIÓN DE RNA**

El RNA total de las muestras de cerebro *postmortem* se extrajo utilizando TRI Reagent<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU) siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. Brevemente, las muestras de FCx (50-100 mg) se homogeneizaron en 1 mL de TRI Reagent<sup>®</sup> (solución monofásica de fenol y guanidin tiocianato), y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Tras añadir 200 µl de cloroformo, las muestras se invirtieron, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugaron a 12.000 x g a 4°C durante 15 min. De las tres fases obtenidas, se transfirió la fase superior acuosa conteniendo el RNA a otro tubo, se añadieron 500 µl de isopropanol, se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, y se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. El pellet obtenido se lavó con 1 mL de etanol 75%, y se centrifugó de nuevo a 10.000 x g durante 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Finalmente, se resuspendió en H<sub>2</sub>O-DEPC. La calidad y la concentración del RNA en las muestras se analizaron determinando la absorbancia (260-280 nm) mediante el NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU). Las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización.

## 13.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

La retrotranscripción a DNA complementario (cDNA) se realizó utilizando el High cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, California, EEUU), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. De cada muestra, se transcribieron 600 ng de RNA. Los diferentes ciclos del proceso fueron: i) 10 min a 25°C, ii) 120 min a 37°C, iii) 5 min a 85°C y iv) 15 min a 4°C.

## 13.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La expresión de los genes de mTOR y sus efectores, 4EBP1 y p70S6K, en FCx se determinó en triplicado, utilizando sondas complementarias a sus secuencias génicas y SYBR® Green, mediante qPCR en un termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, California, EEUU). Las sondas de oligonucleótidos empleadas (tabla 5) fueron diseñadas utilizando el *software* Primer express (Applied Biosystems, California, EEUU). Para la reacción de amplificación se utilizaron 60 ng de cDNA, 300 nM de las sondas *forward* y *reverse*, y Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, California, EEUU). El protocolo de ciclado fue el siguiente: i) un ciclo de 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, ii) 40 ciclos de 15 s a 95°C y 60 segundos a 60°C, iii) curva de fusión o *melting curve*.

Utilizando los niveles de expresión del gen de referencia GAPDH (tabla 5), se normalizaron los niveles de expresión del mRNA de nuestros genes de interés.

**Tabla 5.** Sondas utilizadas en los estudios de expresión génica por qPCR y número de acceso al GenBank.

GEN	FORWARD	REVERSE	referencia NCBI
mTOR	5'- GAAGTTTCCAGAGAAGATTCC -3'	5'- GTGATTCTGTAGTTGCCATC -3'	NM_004958
4-EBP1	5'- TCTGATGGAGTGTCTCGAACTCA -3'	5'- GGGCTAGTGACCCCAGGAA -3'	NM_004095
GAPDH	5'- TGCACCACCAACTGCTTAGC -3'	5'- GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3'	NM_002046

### 13.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la fase exponencial de la curva de amplificación del producto de PCR, se produce un incremento lineal de la señal fluorescente proporcional al producto amplificado. El umbral de amplificación determina los niveles de amplificación por encima de los niveles basales, siendo el ciclo umbral (Ct) el número de ciclos en el cual la cantidad de cDNA alcanza el umbral fijado. El valor de Ct es indirectamente proporcional a la cantidad de cDNA diana inicial, por lo que muestras con mayor cantidad de cDNA del gen estudiado obtendrán valores de Ct menores.

Los cambios relativos en la expresión de los genes diana, se determinó mediante el método de Ct, en base a la cantidad de mRNA de los controles internos (GAPDH) utilizando la siguiente ecuación:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  donde  $\Delta Ct = (Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{gen control}})$  y  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{en la condición experimental}) - \Delta Ct(\text{condición control})$  (Livak & Schmittgen, 2001). Los resultados se expresan como cantidad relativa  $\pm$  S.E.M., siendo el valor relativo 1 la media de los valores de la muestra de referencia.

## 14. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa *GraphPad Prism 6*<sup>®</sup> (GraphPad Software, California, EEUU). En todos los casos, los resultados se expresaron como valores medios  $\pm$  S.E.M. Se consideró estadísticamente significativo cuando el valor de p fue inferior a 0,05.

La comparación estadística entre dos poblaciones con distribución normal se realizó mediante el test *t* de Student pareado, para aquellos valores comparados entre el mismo animal, o despareado, para aquellos valores correspondientes a animales de diferentes.

El estudio de más de dos poblaciones compartiendo la misma variable, se llevó a cabo mediante análisis de varianzas de una vía (*one-way ANOVA*). Por otro lado, cuando dos factores podían interactuar entre ellos se realizaron análisis de varianzas de dos vías (*two-way ANOVA*). En ambos métodos, en caso de mostrar interacción, las diferencias entre los grupos se analizaron en mayor profundidad a través del *post-hoc test* Newman-Keuls.



## **IV. RESULTADOS**

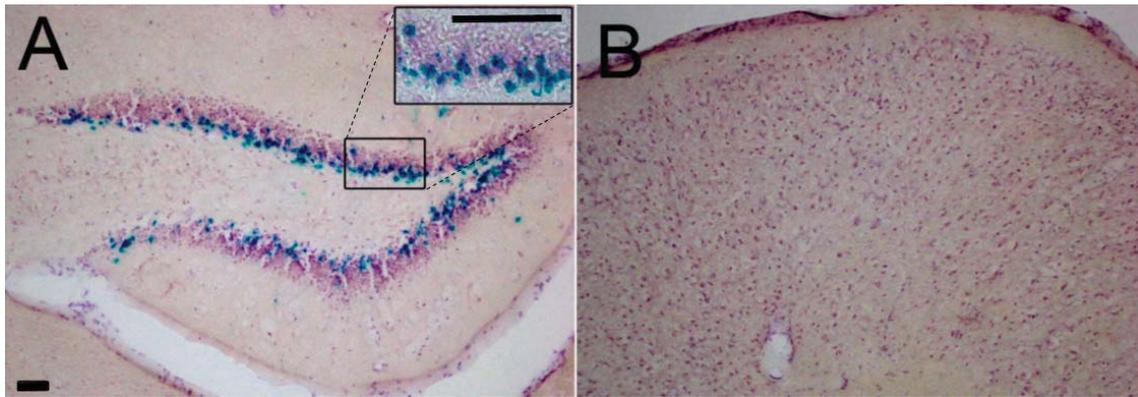


# $\beta$ -CATENINA

## 1. CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD ANATÓMICA DE LA EXPRESIÓN INDUCIBLE DE LA RECOMBINASA Cre BAJO EL PROMOTOR GLAST

Los ratones ROSA26-LacZ se utilizaron para comprobar la localización de las células que expresan la recombinasa Cre. En los animales utilizados en este estudio, la recombinasa Cre se encuentra bajo el promotor GLAST. Estos animales GLAST-CreERT2, inducibles por tamoxifeno (TMX), se utilizaron para generar tanto los animales *knockout* para  $\beta$ -catenina, como los animales que la estabilizan. Por acción de la recombinasa Cre en los ratones R26-LacZ se permite la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, por lo que tras la incubación con el reactivo X-gal, podemos visualizar las células que expresan  $\beta$ -galactosidasa (y que por lo tanto expresan la recombinasa Cre), mediante un precipitado de color azul.

Como se aprecia en la figura 15, la coloración característica tras la hidrolización del compuesto X-gal, revela la recombinación eficiente y específica de la actividad recombinasa en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del *hipocampo*, mientras que la señal no fue apreciable en las otras regiones como áreas corticales. Habiendo comprobado la especificidad de área, el resto del trabajo de tesis se centra principalmente en analizar cambios en la SGZ del *hipocampo*.



**Figura 15.** Localización anatómica de la recombinación en cerebro de ratones GLAST-CreERT2 evaluado mediante el marcaje de X-gal, indicativo de la expresión LacZ en ratones R26-LacZ. Las células en las que se produjo la recombinación se sitúan en el giro dentado del *hipocampo* (A), en concreto en la capa subgranular (inserto en A). Otras áreas como la corteza no muestran marcaje (B). Barra: 50  $\mu$ m.

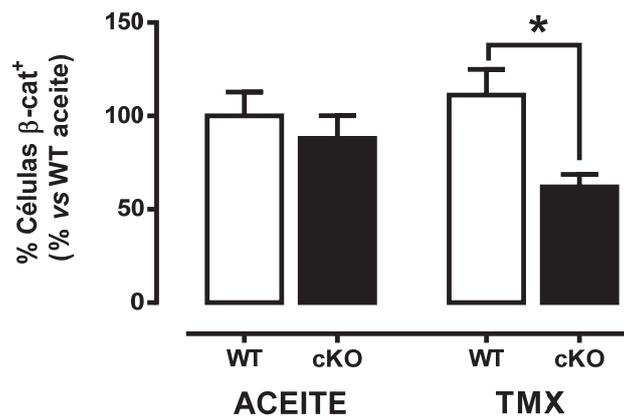
## 2. CARACTERIZACIÓN DEL RATÓN *KNOCKOUT* CONDICIONAL PARA $\beta$ -CATENINA

Los siguientes experimentos fueron realizados para comprobar los efectos conductuales, neuroquímicos y moleculares tras la eliminación de  $\beta$ -catenina, en células que expresan el transportador de glutamato-aspartato (GLAST). Estos experimentos se realizaron un mes después de la inducción del *knockout* condicional (cKO) mediante la administración de TMX.

### 2.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE $\beta$ -CATENINA EN *HIPOCAMPO*

En primer lugar, cuantificamos los niveles de  $\beta$ -catenina mediante inmunohistoquímica. Un mes después de la inducción del cKO mediante la administración TMX, los niveles de  $\beta$ -catenina disminuyeron significativamente en la zona subgranular

del giro dentado del *hipocampo* en los animales cKO (cKO+TMX:  $62,0 \pm 6,7$  vs WT+TMX:  $111,2 \pm 13,8$  células  $\beta$ -catenina<sup>+</sup>,  $p < 0,05$ ) (fig. 16). No se apreciaron cambios significativos en los grupos experimentales tratados con vehículo (aceite de maíz). El análisis mediante ANOVA de dos vías reveló cambios significativos en la variable genotipo [ $F(1,21)=6,99$ ,  $p < 0,05$ ].



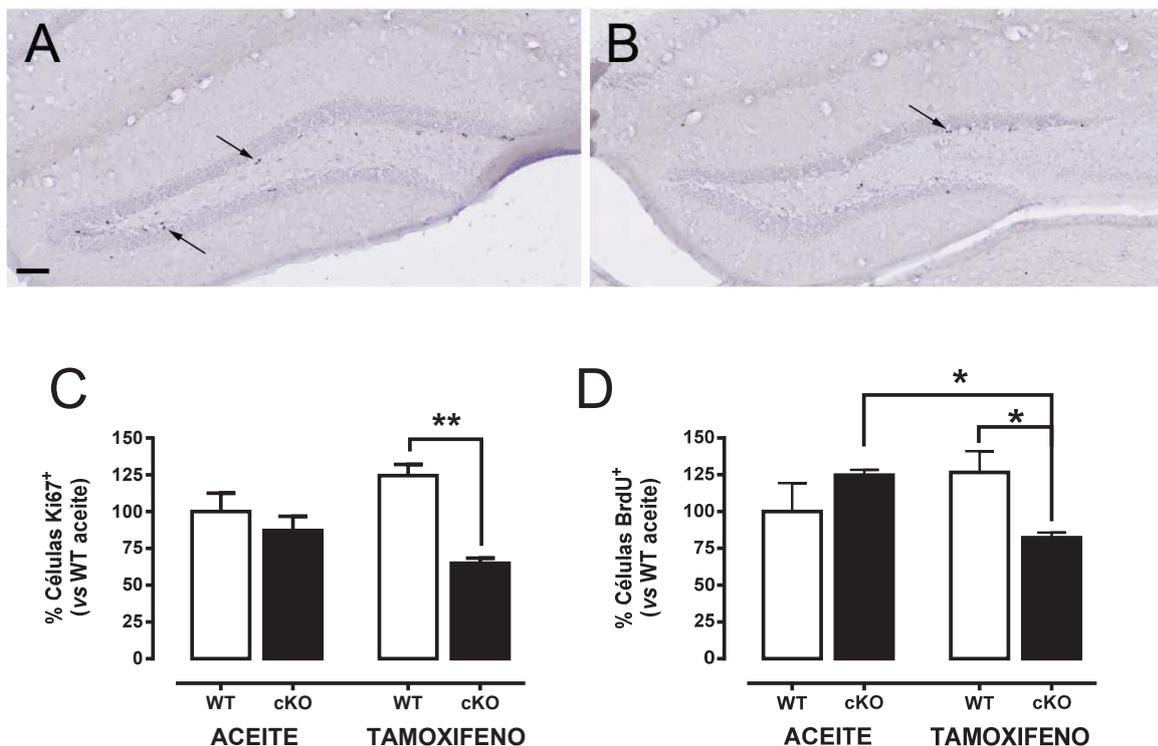
**Figura 16.** Efecto sobre la expresión de  $\beta$ -catenina en la capa subgranular del giro dentado del *hipocampo* un mes después de la inducción del animal cKO. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M., normalizando frente al grupo WT vehículo. ANOVA de dos vías, seguido por Newman-Keuls test. \* $p < 0,05$ . n=5-7 animales.

## 2.2. ESTUDIO DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN Y NEUROGÉNESIS EN HIPOCAMPO

### 2.2.1. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN

La inducción del sistema de recombinación un mes después de la administración de tamoxifeno, promueve una reducción significativa de la expresión de la proteína nuclear Ki67 en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo* en los animales cKO inducidos (TMX) respecto a sus respectivos *wildtype* (cKO+TMX:  $64,9 \pm 3,4$  vs WT+TMX:  $124,6 \pm 7,6$  células Ki67<sup>+</sup>,  $p < 0,01$ ) (figs. 17A, B y C). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías mostró una interacción significativa genotipo x tratamiento [ $F(1,19)=6,76$ ,  $p < 0,05$ ], además de un efecto significativo en la variable genotipo [ $F(1,19)=16,20$ ,  $p < 0,001$ ].

Por otro lado, la incorporación de BrdU en los animales cKO inducidos con tamoxifeno se redujo (fig. 17D) con respecto a sus animales *wildtype* (cKO+TMX:  $82,4 \pm 3,5$  vs WT+TMX:  $126,6 \pm 14,5$  células BrdU<sup>+</sup>,  $p < 0,05$ ), y respecto a los animales cKO a los que se administró el vehículo (aceite) (cKO+TMX:  $82,4 \pm 3,5$  vs cKO+aceite:  $124,8 \pm 3,6$  células BrdU<sup>+</sup>,  $p < 0,05$ ). El análisis estadístico por ANOVA de dos vías reveló la existencia de una interacción significativa entre las variables genotipo x tratamiento [F(1,20)=10,90,  $p < 0,01$ ].

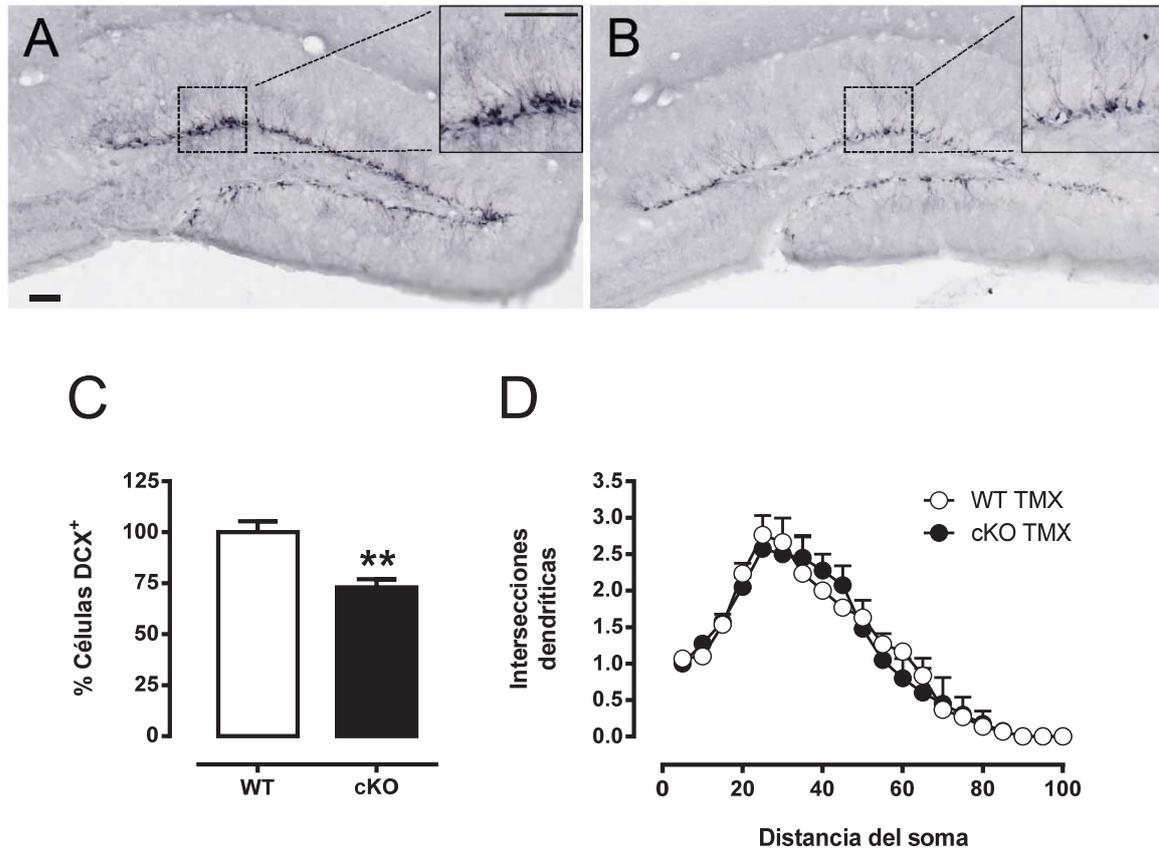


**Figura 17.** Efecto de la inducción del animal cKO para  $\beta$ -catenina sobre la proliferación hipocámpal. Imágenes representativas de la expresión de Ki67 en animales WT+TMX (A), y cKO+TMX para  $\beta$ -catenina (B). Gráficas representando los valores del marcaje de Ki67 (C), y de la incorporación de BrdU (D). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M., normalizados frente al grupo control vehículo. ANOVA de dos vías, seguido por un Newman-Keuls test. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . n=5-7 animales por grupo. Barra: 100  $\mu$ m.

Teniendo en cuenta que los grupos tratados con vehículo (aceite) y los animales *wildtype* TMX no presentaban diferencias significativas en los niveles de  $\beta$ -catenina, así como en marcadores asociados a proliferación, se decidió a partir de este punto, realizar los

experimentos sólo con los grupos cKO y sus respectivos WT tratados con TMX, para de este modo reducir el número de animales a emplear en los futuros experimentos.

### 2.2.2. EXPRESIÓN DE DOBLECORTINA (DCX)



**Figura 18.** Efecto de la reducción de los niveles de  $\beta$ -catenina sobre la expresión del marcador de neurona inmadura doblecortina. Imágenes representativas de la expresión de DCX en el giro dentado de los animales WT+TMX (A) y cKO+TMX (B). Las gráficas representan el número de las células DCX<sup>+</sup> (C), y el estudio de la arborización que presentan las neuronas DCX<sup>+</sup> mediante un análisis *Sholl* (D). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. Prueba *t* de Student, datos no pareados. ANOVA de dos vías, seguido por Newman-Keuls test.  $^{**}p < 0,01$  vs grupo WT. n=6-7 animales por grupo. Barra: 100  $\mu$ m.

Para comprobar si la disminución en proliferación en giro dentado de *hipocampo* se correlacionaba con cambios en la población neuronal inmadura, utilizamos el marcador específico doblecortina (DCX). El número de células DCX<sup>+</sup> que presentan los animales

cKO fue menor que en los animales WT (cKO  $72,92 \pm 4,07$  vs WT  $100,0 \pm 5,42$  células DCX<sup>+</sup>,  $p < 0,01$ ) (fig. 18A, B y C). Mediante el análisis *Sholl* se determinó el número de intersecciones dendríticas como medida de la complejidad de la arborización dendrítica.

No apreciamos cambios en los animales cKO respecto a sus respectivos WT en el número de intersecciones, a medida que nos distanciamos del soma, en las neuronas inmaduras de los animales (fig. 18D). Esto indica que no existen diferencias en la ramificación dendrítica de las neuronas DCX<sup>+</sup> entre los dos grupos experimentales. El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo en la variable distancia del soma [ $F(19,95) = 50,86$ ,  $p < 0,001$ ].

## 2.3. ESTUDIOS CONDUCTUALES

Una vez estudiados los cambios en marcadores de proliferación y neurogénesis ligados a la reducción de los niveles de  $\beta$ -catenina, se estudió el fenotipo comportamental de estos animales mediante pruebas para evaluar conductas de tipo ansioso y depresivo. Estos estudios se realizaron, como en el apartado anterior, un mes después de la administración de tamoxifeno (fig. 19).

### 2.3.1. CONDUCTA DE TIPO ANSIOSA

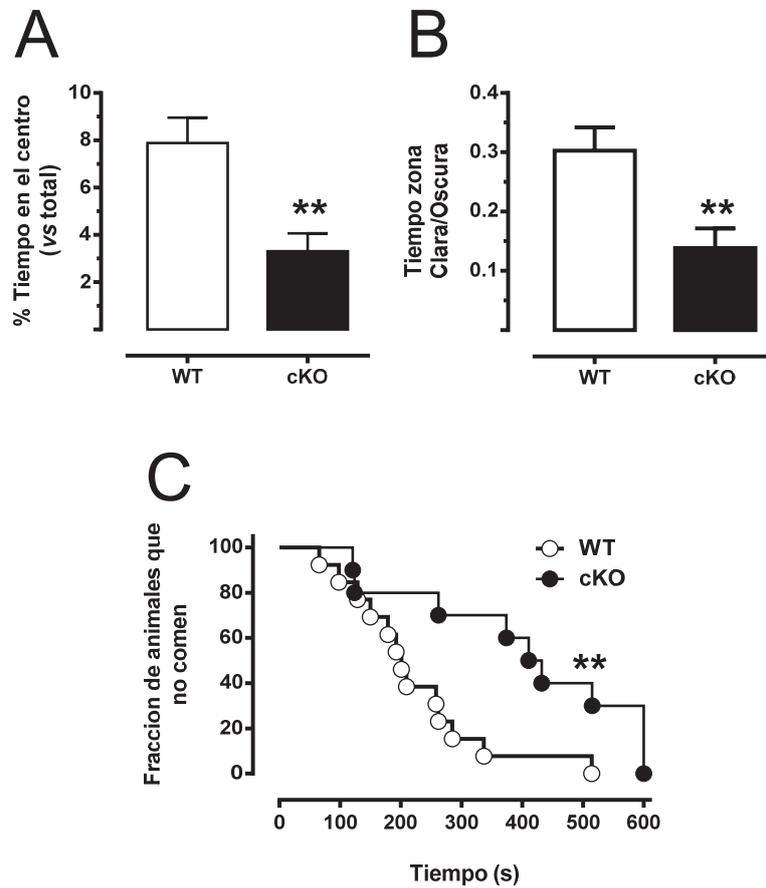
#### *Test de campo abierto (open field test, OF)*

La conducta ansiosa examinada mediante el test de campo abierto en los animales cKO  $\beta$ -catenina, mostró una disminución en el porcentaje de tiempo de permanencia en el centro del campo abierto en los animales cKO con respecto a los animales WT (cKO:  $3,31 \pm 0,76$  vs WT:  $7,88 \pm 1,08\%$ ,  $p < 0,01$ ) (fig. 19A).

#### *Test de la caja clara/oscura (Light/Dark Box test, LDB)*

Como refleja la figura 19B, los animales knockout para  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo*, presentan un fenotipo ansioso traducido por un menor tiempo de permanencia en la zona iluminada (aversiva) frente al tiempo en la

zona oscura (segura), respecto a los animales WT (cKO:  $0,14 \pm 0,03$  vs WT:  $0,30 \pm 0,04$ ,  $p < 0,01$ ).



**Figura 19.** Efecto de la reducción de los niveles de  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado sobre la conducta ansiosa. Porcentaje de tiempo de permanencia en el centro en el test de campo abierto (A). Tiempo en el compartimiento claro vs oscuro en el LDB (B). Curva de supervivencia que muestra el tiempo de latencia en el NSF (C). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. Prueba  $t$  de Student, datos no pareados (A y B). \*\* $p < 0,01$ . Análisis de supervivencia y diferencias estadísticas determinadas mediante el método de Kaplan–Meier (C). \*\* $p < 0,01$ .  $n=7-14$  animales por grupo.

### *Novelty Suppressed Feeding (NSF) Test*

La reducción de  $\beta$ -catenina en el *hipocampo*, está asociada a un efecto de tipo ansioso/depresivo reflejado como un incremento significativo en el tiempo de latencia en los animales cKO, respecto a sus controles WT (cKO:  $221,5 \pm 32,3$  vs WT:  $403,7 \pm 58,5$  s,  $p$

< 0,01) (fig. 19C). No se observaron diferencias significativas en la ingesta de comida posterior al test.

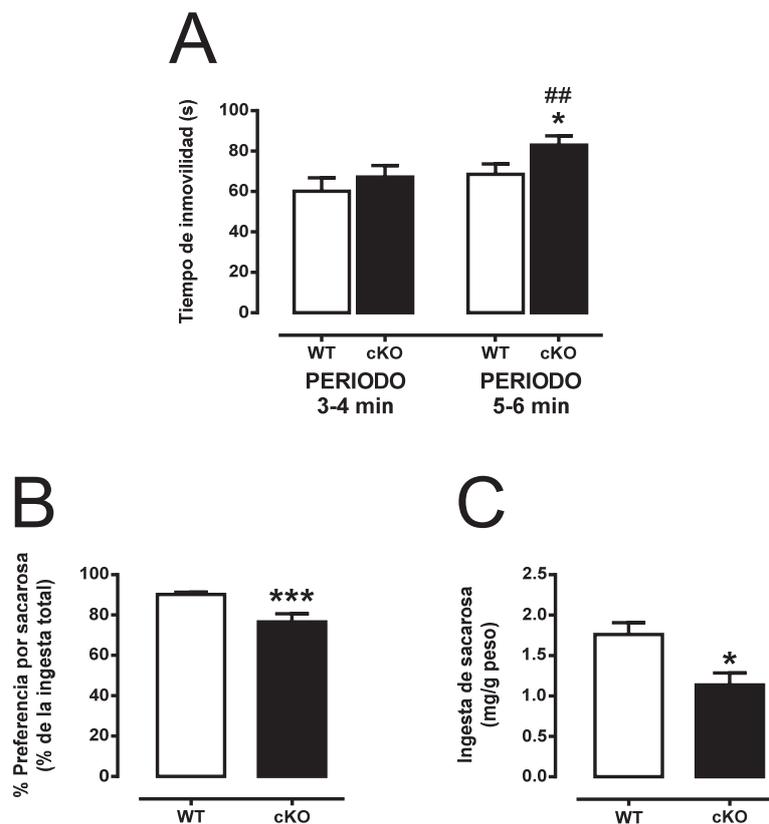
### **2.3.2. CONDUCTA DE TIPO DEPRESIVA**

#### ***Test de la natación forzada (Forced Swimming Test, FST)***

El análisis del test de la natación forzada se realizó contabilizando los 4 últimos min (de los 6 min totales). Este periodo se dividió en dos episodios de 2 min cada uno (fig. 20A). En cada uno de estos segmentos se analizó el tiempo de inmovilidad, conducta que refleja una manera pasiva de supervivencia que denota indefensión. El tiempo de inmovilidad fue significativamente superior para los animales cKO respecto a los controles en los min 5-6 (cKO:  $82,96 \pm 4,59$  vs WT:  $68,44 \pm 5,26$  s,  $p < 0,05$ ) reflejando una conducta de tipo depresiva. Además, los animales cKO sufrieron un aumento de la inmovilidad en los 2 últimos min del test, comparado con el periodo 3-4 min (cKO 5-6 min:  $82,96 \pm 4,59$  vs cKO 3-4 min:  $67,15 \pm 5,69$  s,  $p < 0,01$ ) mostrando diferente adaptación al estrés con el tiempo.

#### ***Test de preferencia e ingesta de sacarosa***

De manera paralela se estudió la conducta anhedónica de los animales, uno de los indicadores más claros del estado depresivo, mediante el test de preferencia por sacarosa y la ingesta de ésta (figs. 20B y 20C, respectivamente). El análisis mostró que los animales presentaban un estado anhedónico reflejado por un descenso del consumo de sacarosa en el test de la preferencia por sacarosa (cKO:  $76,64 \pm 3,95$  vs WT:  $90,26 \pm 1,12\%$  preferencia por sacarosa vs total,  $p < 0,001$ ), y en la ingesta de sacarosa (cKO:  $1,14 \pm 0,15$  vs WT:  $1,76 \pm 0,15$  mg/g,  $p < 0,05$ ).



**Figura 20.** Efecto de la reducción de los niveles de  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado sobre la conducta de tipo depresiva. Test de la natación forzada (A). Estado anhedónico evaluado por la preferencia por sacarosa (B), y por el consumo de sacarosa (C). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. Prueba *t* de Student, datos no pareados  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,001$  vs grupo WT. Prueba *t* de Student, datos pareados  $^{##}p < 0,01$  vs cKO periodo 3-4.  $n=6-14$  animales por grupo.

## 2.4. ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS

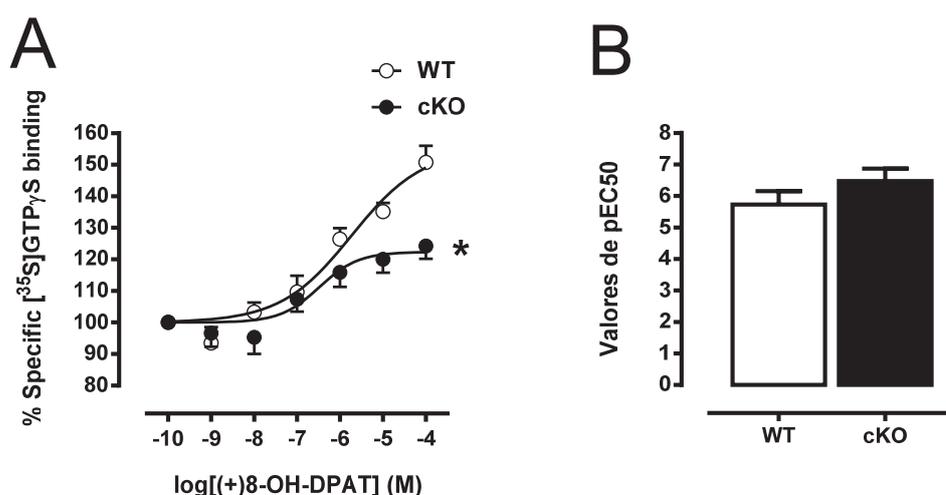
### 2.4.1. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub>: ESTUDIOS *IN VITRO*

#### Fijación específica de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S mediada por la activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en homogeneizado de membranas

La estimulación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> conlleva el acople y activación de proteínas Gi/o. Por ello, para determinar la funcionalidad o eficacia de dicho acople se

realizaron ensayos de fijación de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S en homogeneizados de membrana procedente de *corteza prefrontal* (PFCx).

La estimulación de los receptores 5-HT $_{1A}$  en la PFCx (receptores postsinápticos) se realizó mediante curvas dosis-respuesta, utilizando el agonista selectivo 5-HT $_{1A}$  ( $\pm$ ) 8-OH-DPAT, pudiendo determinar los valores de estimulación máxima ( $E_{max}$ ) y la concentración eficaz 50 (EC $_{50}$ ) (fig. 21). En el grupo *wildtype* la  $E_{max}$  fue de  $155,2 \pm 9,8\%$ , expresado como porcentaje de estímulo con respecto a la fijación basal (100%). En los animales cKO para  $\beta$ -catenina, la estimulación máxima de proteínas Gi/o fue significativamente menor ( $122,4 \pm 3,6\%$ ,  $p < 0,05$ ), respecto a los animales WT (fig. 21A). No se apreciaron diferencias significativas en el parámetro farmacológico de potencia entre los grupos estudiados (fig. 21B).



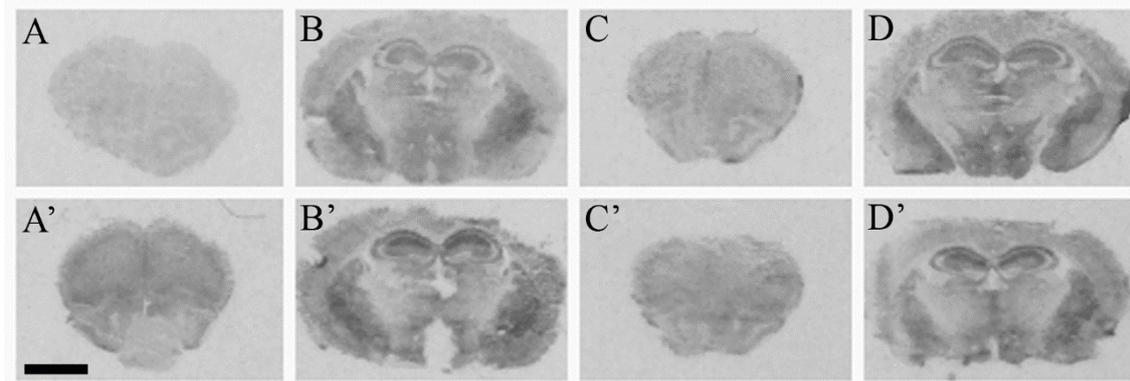
**Figura 21.** Fijación específica de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S inducida tras la estimulación con el agonista 5-HT $_{1A}$  ( $\pm$ ) 8-OH-DPAT en PFCx de ratones cKO para  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo*. Curvas concentración-respuesta de la estimulación por ( $\pm$ ) 8-OH-DPAT (A), y valores de potencia (B). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. Prueba *t* de Student, datos no pareados. \*  $p < 0,05$  vs WT.  $n=6$  animales por grupo.

### **Fijación específica de [<sup>35</sup>S]GTPγS mediada por la activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en secciones cerebrales.**

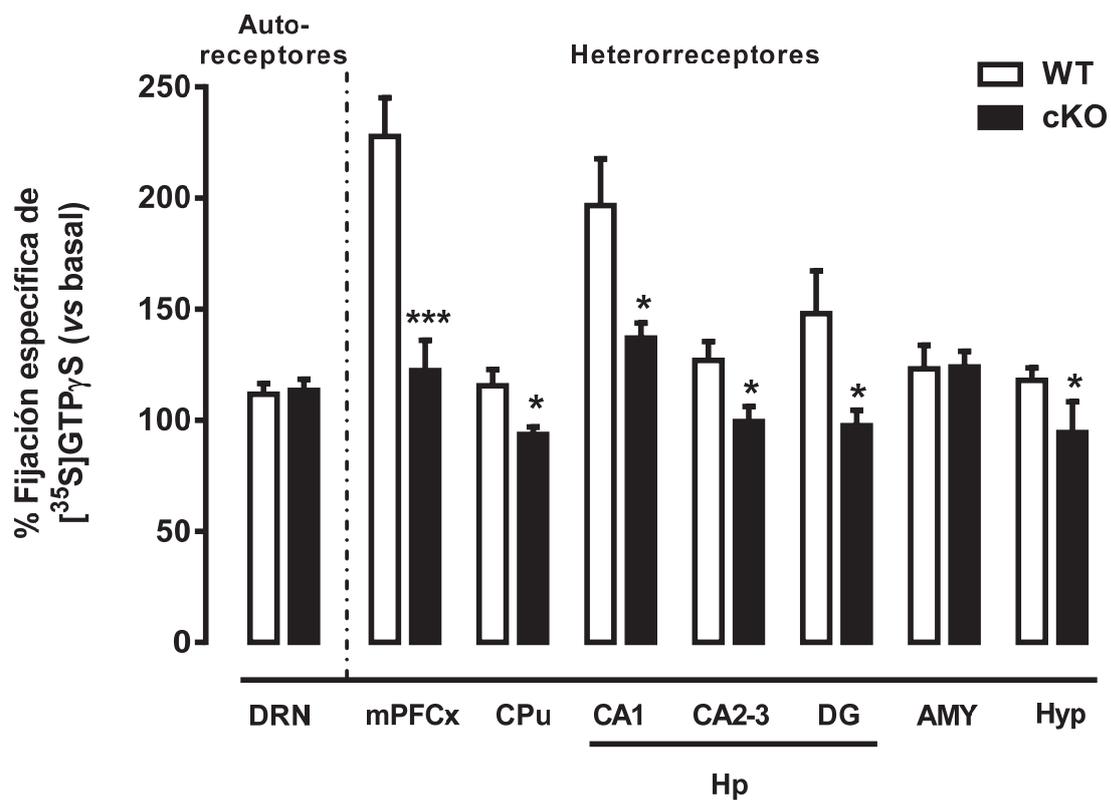
Los experimentos de autorradiografía funcional se realizaron con la finalidad de estudiar la funcionalidad del receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> en diferentes áreas cerebrales, así como confirmar el resultado obtenido en los ensayos anteriores de *binding* funcional.

El estudio de la autorradiografía funcional del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (figs. 22 y 23) mostró diferencias en la capacidad de fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS estimulada por el agonista 5-HT<sub>1A</sub> (±) 8-OH-DPAT entre los animales cKO para β-catenina y los animales WT, en áreas en las que el receptor 5-HT<sub>1A</sub> tiene localización post-sináptica. En la mPFCx, los animales cKO presentaron una inhibición de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS estimulada por (±) 8-OH-DPAT 10 μM del -82% frente a la estimulación en animales WT ( $p < 0,001$ ). En las diferentes áreas del *hipocampo* (CA1, CA2-3 y DG), se observó una reducción de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS estimulada por la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> del -62%, -102% y del -105% respectivamente, en animales cKO comparado con sus respectivos animales control (WT) ( $p < 0,05$  para todas ellas). En *caudado-putamen e hipotálamo* también se apreció una reducción de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS en animales cKO, del -140% y -131% respectivamente, con respecto a los animales *wildtype* ( $p < 0,05$  para ambas). En el *núcleo dorsal del rafe* y la *amígdala*, no se observaron cambios en la funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

En la tabla que se muestra a continuación, se exhiben los valores medios de los basales registrados en las áreas cerebrales de interés para este trabajo. La fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTPγS en los estudios de autorradiografía funcional fue mayor en mPFCx, *hipocampo* (áreas CA1, CA2-3 y giro dentado), y en *hipotálamo* de los animales cKO para β-catenina con respecto a los animales WT (tabla 6). Este hecho, sin embargo, no afectó a los resultados presentados pues los valores de fijación absoluta (calculada mediante la sustracción a la estimulación de [<sup>35</sup>S]GTPγS por (±) 8-OH-DPAT de su respectiva estimulación basal), presentan también una reducción significativa en el animal cKO para β-catenina con respecto al WT en las mismas áreas descritas en la figura 23.



**Figura 22.** Autorradiogramas representativos de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS inducida por (±) 8-OH-DPAT. La figura refleja las estimulaciones basales en el grupo WT (A, B) y el grupo cKO (C, D), y las estimulaciones tras la activación específica de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en ambos grupos (A', B' y C', D', respectivamente). Barra = 2 mm.



**Figura 23.** Fijación específica de [<sup>35</sup>S]GTPγS inducida por la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en secciones coronales de cerebro de ratones cKO para β-catenina y sus respectivos *wildtype*. Resultados expresados como promedio±S.E.M. Prueba *t* Student, datos no pareados. \**p* < 0,05, \*\*\**p* < 0,001 vs WT. n=4-6 animales por grupo. DRN, *núcleo dorsal del rafe*; mPFCx, *corteza prefrontal medial*; CPu, *caudado-putamen*; Hp, *hipocampo* (CA1, *área CA1 del hipocampo*; CA2-3, *áreas CA2 y CA3 del hipocampo*; DG, *giro dentado del hipocampo*; Amy, *amígdala*; Hyp, *hipotálamo*.

**Tabla 6.** Valores de fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTPγS (nCi/g tejido) en las estructuras cerebrales estudiadas. Resultados expresados como promedio±S.E.M. Prueba *t* Student, datos no pareados. \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001 vs WT. n=4-6 animales por grupo. mPFCx, *corteza prefrontal medial*; Hp, *hipocampo* (CA1, área CA1 del *hipocampo*; CA2-3, áreas CA2 y CA3 del *hipocampo*; DG, giro dentado del *hipocampo*); CPu, *caudado-putamen*; Hyp, *hipotálamo*; Amy, *amígdala*; y DRN, *núcleo dorsal del rafe*.

Áreas cerebrales	WT		cKO	
	PROMEDIO	± S.E.M.	PROMEDIO	± S.E.M.
mPFCx	226,4	± 29,9	388,5	± 37,4**
Hp				
CA1	403,8	± 35,8	594,3	± 32,7**
CA2-3	336,8	± 26,3	475,0	± 24,2**
DG	206,0	± 90,0	325,0	± 12,3***
CPu	619,0	± 27,4	696,8	± 36,7
Hyp	653,8	± 51,0	830,3	± 29,3*
Amy	453,8	± 31,9	457,0	± 30,3
DRN	623,7	± 39,8	325,0	± 12,0***

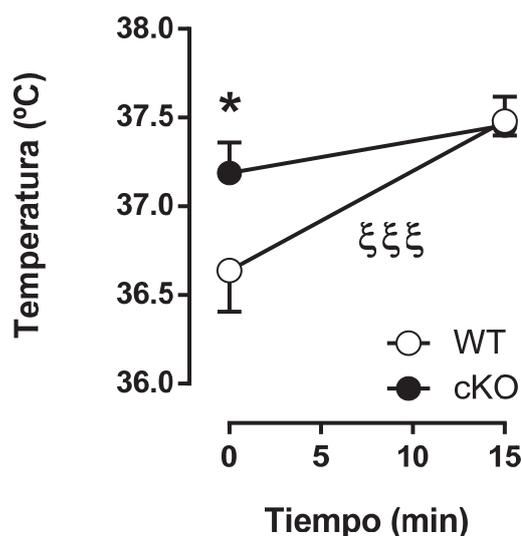
\**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001 vs WT-TMX

## 2.4.2. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub>: ESTUDIOS *IN VIVO*

### *Evaluación de la hipertermia inducida por estrés*

En la hipertermia inducida por estrés (*Stress-Induced Hyperthermia*, SIH) se evaluó la temperatura corporal basal de los animales cKO para β-catenina y sus respectivos WT, así como la temperatura inducida por estrés transcurridos 15 min. En este caso, la manipulación del animal para tomar la temperatura basal (sonda de temperatura rectal) actúa como factor estresante inductor de la hipertermia (Richardson-Jones et al, 2010). Los animales cKO presentaron una temperatura inicial significativamente superior respecto los animales WT (cKO: 37,19±0,17 vs WT: 36,59±0,22°C, *p* < 0,05) (fig. 24). Con respecto a

la hipertermia inducida por estrés, los animales WT presentaron un incremento significativo de temperatura a los 15 min con respecto a su temperatura basal (WT t=15;  $37,50 \pm 0,08$  vs WT t=0 min;  $36,59 \pm 0,23^\circ\text{C}$ ,  $p < 0,001$ ), mientras que los animales cKO para  $\beta$ -catenina no mostraron cambios.



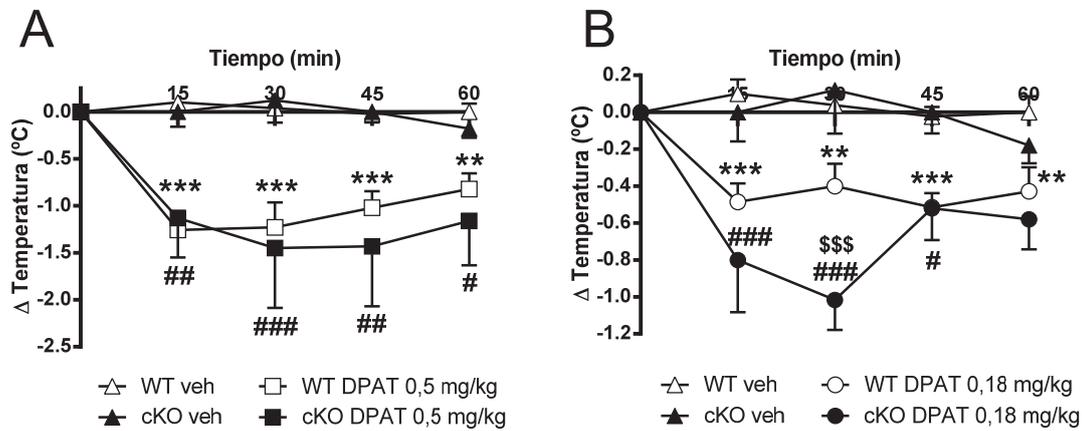
**Figura 24.** Temperatura corporal evaluada en estado inicial y 15 min tras la aplicación del agente estresante. Resultados expresados como promedio±S.E.M. Prueba  $t$  Student, datos no pareados.  $*p < 0,05$  vs WT. Prueba  $t$  Student, datos pareados.  $\xi\xi\xi p < 0,001$  WT t=15 vs WT t=0. n=16 animales por grupo.

#### ***Evaluación de la hipotermia inducida por el agonista 5-HT<sub>1A</sub> (+) 8-OH-DPAT en animales cKO $\beta$ -catenina***

El objetivo de este experimento, fue examinar *in vivo* la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> presinápticos los cuales inducen hipotermia corporal tras ser activados. Para ello se administró el agonista selectivo 5-HT<sub>1A</sub> (+) 8-OH-DPAT, y se tomó la temperatura corporal cada 15 min, hasta un tiempo máximo de 1 h.

La administración del agonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> (+)-8-OH-DPAT a una dosis de 0,5 mg/kg (i.p.) promovió un descenso en la temperatura en los animales cKO  $\beta$ -catenina similar a la observada en los animales WT (fig. 25A). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró un efecto significativo del

genotipo [ $F(3,33)=11,51, p < 0,001$ ], del tiempo [ $F(4,132)=12,22, p < 0,001$ ], y de la interacción de ambos factores [ $F(12,132)=5,95, p < 0,001$ ].



**Figura 25.** Hipotermia inducida por la administración del agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (+) 8-OH-DPAT 0,5 mg/kg (A), y 0,18 mg/kg (B), en animales cKO para  $\beta$ -catenina y sus respectivos animales *wildtype*. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls test, \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  WT (+) 8-OH-DPAT vs WT vehículo; # $p < 0,05$ , ### $p < 0,01$  y #### $p < 0,001$  cKO (+) 8-OH-DPAT vs cKO vehículo; \$\$\$ $p < 0,001$  cKO (+) 8-OH-DPAT 0,18 mg/kg vs WT (+) 8-OH-DPAT 0,18 mg/kg. n=5-14 animales por grupo.

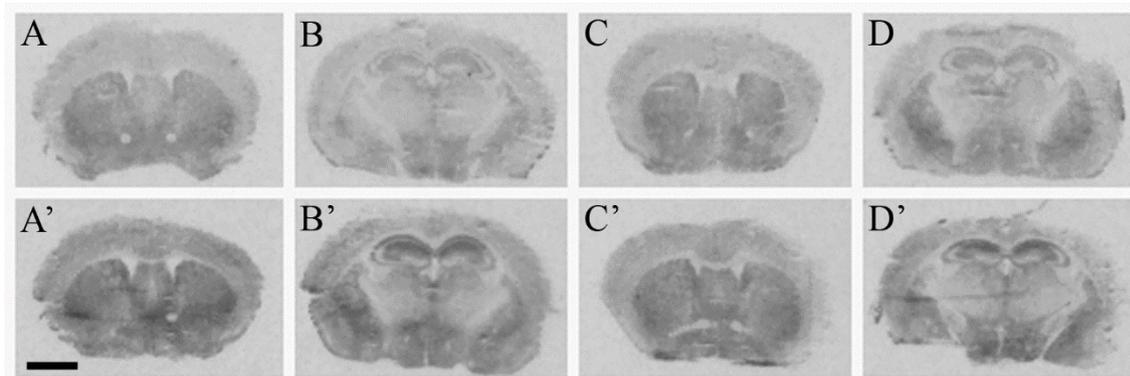
Con el fin de poder determinar si existía un incremento de la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> presinápticos, se optó por usar una dosis más baja que la que produce el efecto hipotérmico máximo. La administración del agonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> (+) 8-OH-DPAT a una dosis de 0,18 mg/kg (i.p.) promovió un descenso en la temperatura en los animales cKO  $\beta$ -catenina de magnitud superior a la observada en los animales WT (fig. 25B). El análisis estadístico por ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró un efecto significativo del genotipo [ $F(3,26)=15,44, p < 0,001$ ], del tiempo [ $F(4,104)=8,46, p < 0,001$ ] y de la interacción de ambos factores [ $F(12,104)=5,18, p < 0,001$ ]. El post-test mostró una mayor hipotermia inducida por el agonista selectivo 5-HT<sub>1A</sub> en los animales cKO  $\beta$ -catenina 30 min después de su administración ( $p < 0,001$ ) (fig. 19B). Los grupos de animales cKO  $\beta$ -catenina y WT a los que se administró vehículo no mostraron cambios de temperatura significativos.

### 2.4.3. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1B</sub>

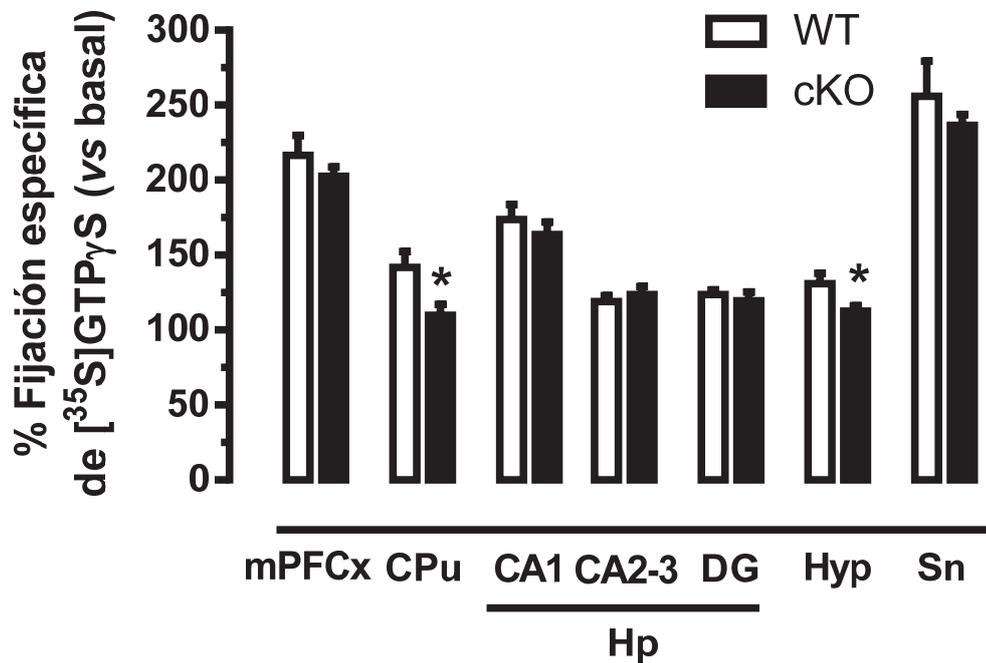
#### Fijación específica de [<sup>35</sup>S]GTPγS mediada por la activación del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en secciones cerebrales: estudios *in vitro*

La activación de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, del mismo modo que los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, implica la activación de proteínas Gi/o. Para determinar la capacidad de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> para activar estas proteínas G y su localización a nivel anatómico, se llevaron a cabo ensayos de autorradiografía funcional en secciones coronales de cerebro. Para determinar la fijación del radioligando [<sup>35</sup>S]GTPγS inducida por el receptor 5-HT<sub>1B</sub>, se utilizó el agonista selectivo CP94,253 a una concentración de 10 μM.

Como se puede observar en las figuras 26 y 27, los animales cKO para β-catenina presentaron una reducción en la capacidad para fijar [<sup>35</sup>S]GTPγS inducido por el agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>1B</sub> CP94,253 en *caudado-putamen* (-77%) e *hipotálamo* (-59%) de los animales cKO β-catenina, frente a la estimulación de los animales WT ( $p < 0,05$  para ambas estructuras). El resto de las estructuras estudiadas no presentaron cambios significativos.



**Figura 26.** Autorradiogramas representativos de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS inducida por CP94,253. La figura refleja las estimulaciones basales en el grupo WT (A, B) y el grupo cKO (C, D), y las estimulaciones tras la activación específica de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> en ambos grupos (A', B' y C', D', respectivamente). Barra = 2 mm.



**Figura 27.** Fijación específica de [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S mediada por el agonista selectivo 5-HT $_{1B}$  CP94,253 en secciones coronales de cerebro de ratón. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. Prueba *t* Student, datos no pareados. \* $p < 0,05$  vs grupo WT.  $n=4-6$  animales por grupo. mPFCx, corteza prefrontal medial; CPu, caudado-putamen; Hp, hipocampo (CA1, área CA1 del hipocampo; CA2-3, áreas CA2 y CA3 del hipocampo; DG, giro dentado); Hy: hipotálamo; Sn, sustancia negra.

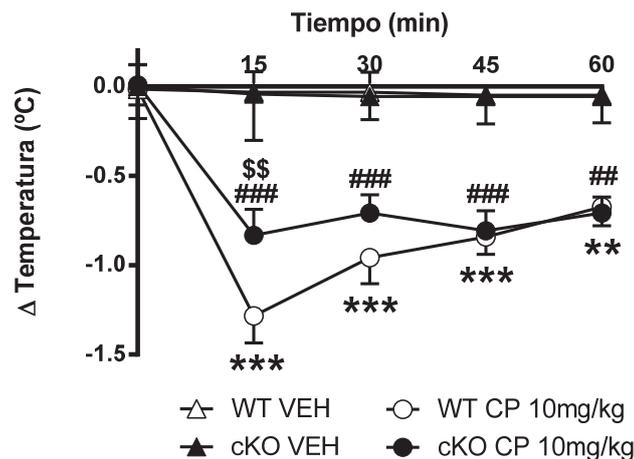
No se observaron diferencias en los niveles de fijación basal de [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S entre animales cKO para  $\beta$ -catenina y sus respectivos *wildtype* (tabla 7).

**Tabla 7.** Valores de fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTPγS (nCi/g tejido) en las estructuras cerebrales estudiadas. Resultados expresados como promedio±S.E.M. mPFCx; *corteza prefrontal medial*, CPu; *caudado-putamen*; Hp, *hipocampo* (CA1, área CA1 del hipocampo, CA2-3, áreas CA2 y CA3 del *hipocampo*, DG, giro dentado); Hy, *hipotálamo*; Sn, *sustancia negra*.

Áreas cerebrales	WT		cKO	
	PROMEDIO	± S.E.M.	PROMEDIO	± S.E.M.
mPFCx	107,5	± 7,9	100,5	± 13,0
Hp				
CA1	257,2	± 22,9	263,3	± 21,9
CA2-3	182,0	± 15,3	166,5	± 10,7
DG	128,2	± 13,9	134,0	± 14,1
CPu	248,2	± 34,0	281,0	± 32,5
Hyp	461,0	± 53,8	461,7	± 28,2
Sn	211,3	± 24,8	177,3	± 12,6

### **Evaluación de la hipotermia inducida por el agonista 5-HT<sub>1B</sub> CP94,253: estudios *in vivo***

La funcionalidad *in vivo* de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> fue evaluada mediante la hipotermia corporal producida por la activación de estos receptores tras la administración del agonista selectivo CP94,253 (10 mg/kg). En este experimento, el grupo de animales cKO para β-catenina mostró una menor respuesta hipotérmica inducida por el compuesto CP94,253 que los animales control (fig. 28). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo del genotipo [ $F(3,33)=13,43$ ,  $p < 0,001$ ], del tiempo [ $F(4,132)=16,74$ ,  $p < 0,001$ ], y de la interacción genotipo x tiempo [ $F(12,132)=5,77$ ,  $p < 0,001$ ]. El resultado del *post-hoc* Newman-Keuls mostró en el minuto 15 una menor hipotermia inducida por la estimulación del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en los animales cKO para β-catenina frente a los animales WT (cKO,  $-0,83 \pm 0,14$  vs WT,  $-1,28 \pm 0,15$ ,  $p < 0,01$ ).



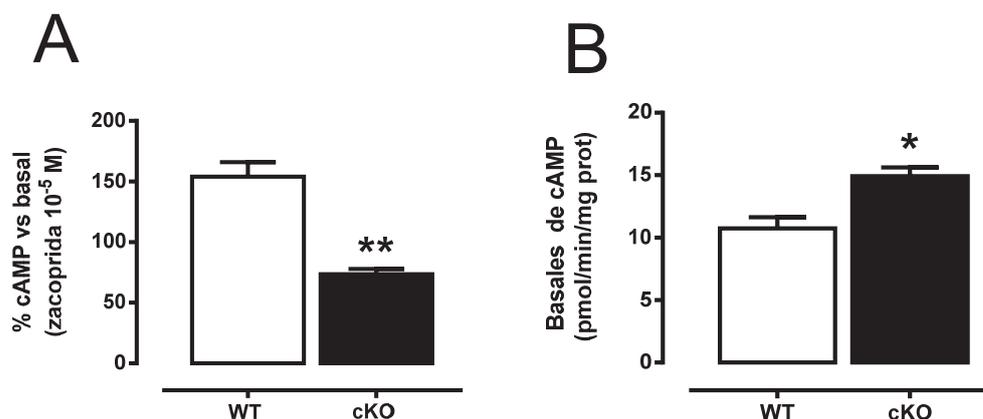
**Figura 28.** Hipotermia inducida por la administración del agonista del receptor 5-HT<sub>1B</sub> CP94,253 10 mg/kg, i.p., en animales cKO para  $\beta$ -catenina y sus respectivos *wildtype*. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías seguido por un Newman-Keuls test. \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  WT CP94,253 vs WT vehículo; ### $p < 0,01$  y #### $p < 0,001$  cKO CP94,253 vs cKO vehículo; \$\$ $p < 0,01$  cKO CP94,253 vs WT CP94,253. n=6-12 animales por grupo.

#### 2.4.4. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>4</sub>

En este caso, el receptor 5-HT<sub>4</sub> se acopla a proteínas Gs, y mediante la técnica de fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S no se obtienen buenos resultados debido a la escasa señal específica y elevada señal basal. Por ello, decidimos analizar la funcionalidad de este receptor en nuestros animales a través de la cuantificación de la acumulación de cAMP, efector *downstream* de la vía de señalización en la que participa, mediada por el receptor 5-HT<sub>4</sub>.

##### Influencia sobre la acumulación de cAMP en los animales cKO inducibles para $\beta$ -catenina

La cuantificación del cAMP producido por la estimulación de la enzima adenilato ciclasa, mediada por los receptores 5-HT<sub>4</sub> se realizó en homogeneizados de *estriado*, estructura donde se encuentra la mayor densidad de este subtipo de receptor serotoninérgico. La estimulación del receptor 5-HT<sub>4</sub> se realizó utilizando el agonista selectivo para este receptor zacoprida (10  $\mu$ M).



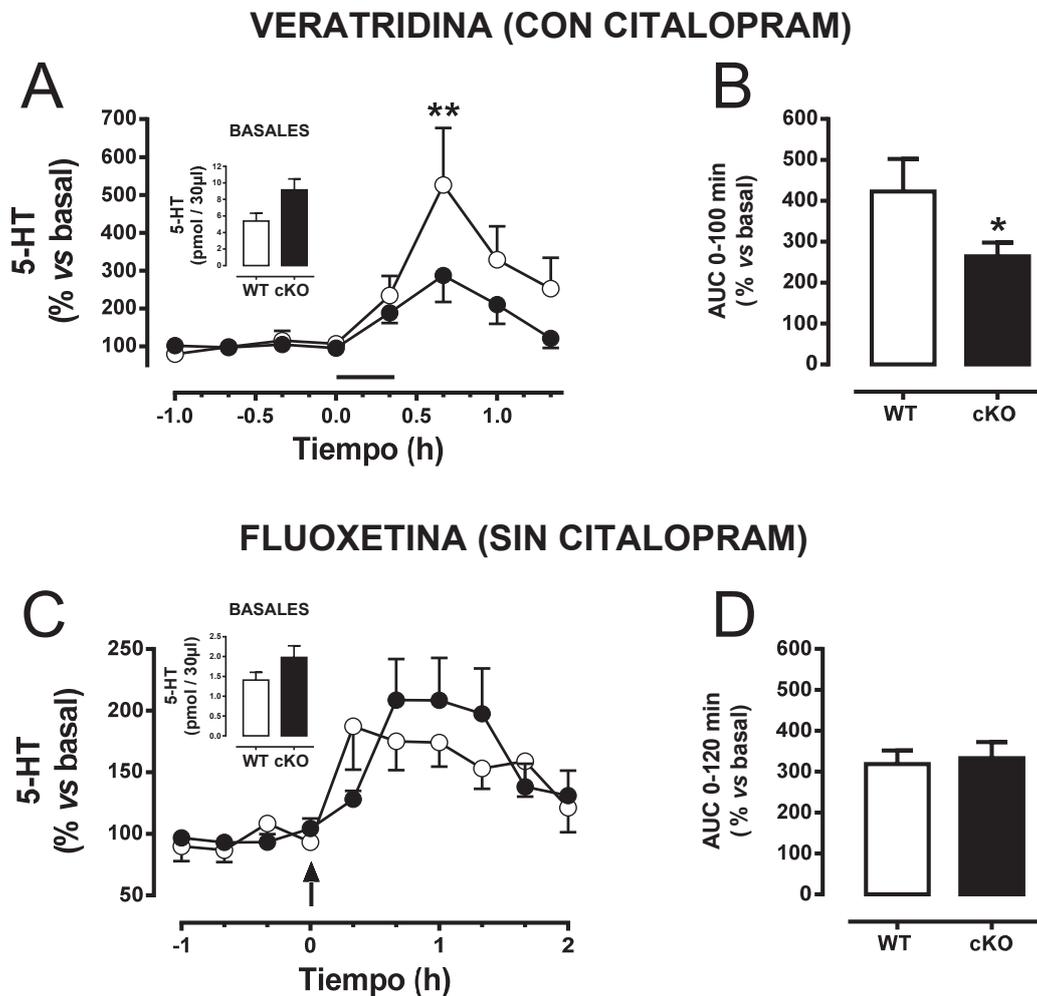
**Figura 29.** Acumulación de cAMP mediada por la activación del receptor 5-HT<sub>4</sub> (A), y cantidad basal de cAMP (B), en membranas de estriado de animales cKO para β-catenina y sus respectivos animales *wildtype*. Resultados expresados como promedio±S.E.M. Prueba *t* Student, datos no pareados. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs grupo WT.  $n=3$  animales por grupo.

Los animales cKO para β-catenina en la capa subgranular del giro dentado del *hipocampo*, presentaron una reducción estadísticamente significativa en la acumulación de cAMP mediada por la estimulación selectiva del receptor 5-HT<sub>4</sub> respecto a sus respectivos animales *wildtype* (cKO:  $73,7 \pm 4,2$  vs WT:  $154,0 \pm 12,1\%$  frente al cAMP basal (100%),  $p < 0,01$ ) (fig. 29A). Los animales cKO para β-catenina mostraron mayores niveles de cAMP basal que sus respectivos animales *wildtype* (cKO:  $14,92 \pm 0,70$  vs WT:  $10,75 \pm 0,88$  pmol/min/mg prot cAMP,  $p < 0,05$ ) (fig. 29B).

#### 2.4.5. EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN CORTEZA PREFRONTAL: ESTUDIOS DE MICRODIÁLISIS

Para evaluar posibles cambios en la funcionalidad del sistema serotoninérgico en los animales cKO para β-catenina, se procedió al estudio de la liberación de los neurotransmisores 5-HT y glutamato en la *corteza prefrontal medial*. El glutamato, además de encontrarse modificado en depresión mayor (Sanacora et al, 2012), actúa en *corteza* regulando la activación de las neuronas serotoninérgicas mediante la conexión PFCx-DRN (Celada et al, 2001).

## Estudio de la liberación de serotonina



**Figura 30.** Efecto de la eliminación de  $\beta$ -catenina de la SGZ del giro dentado del *hipocampo* sobre la liberación de 5-HT en mPFCx. Liberación de serotonina tras la infusión de veratridina (A y B) y la administración de fluoxetina (C y D). Los niveles de liberación basal se representan como inserto en las figuras A y C. Perfil de liberación temporal de serotonina tras la administración de veratridina (A) y fluoxetina (C), y área bajo la curva de ambos perfiles (B para veratridina y D para fluoxetina). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido de Bonferroni test.  $**p < 0,01$  vs WT. Prueba *t* Student, datos no pareados.  $*p < 0,05$  vs WT.  $n=7-12$  animales por grupo.

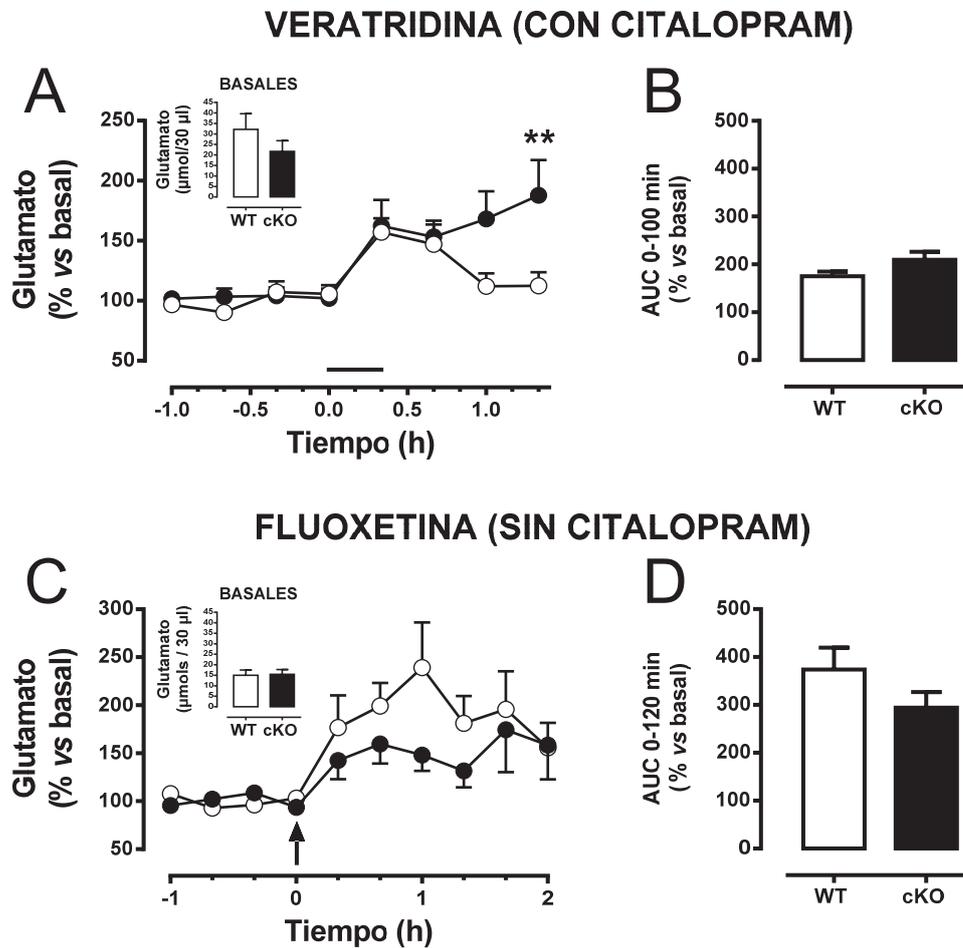
De forma basal, no se observaron cambios significativos en los niveles de 5-HT en mPFCx entre los grupos cKO y WT (figs. 30A, inserto y C, inserto). La administración del compuesto veratridina indujo una menor liberación de 5-HT en los animales cKO para  $\beta$ -catenina con respecto a los animales WT, evaluada mediante los valores del área bajo la curva (cKO:  $265,0 \pm 33,0$  vs WT:  $423,1 \pm 79,3\%$  vs basal,  $p < 0,05$ ) (fig. 30B). Por ANOVA de dos vías de medidas repetidas se observó un efecto significativo del genotipo [ $F(1,17)=5,11$ ,  $p < 0,05$ ], y del tiempo [ $F(7,119)=10,85$ ,  $p < 0,001$ ] (fig. 30A). El post-test Bonferroni mostró un pico menor de liberación de 5-HT en los animales cKO 40 min después de la infusión de veratridina ( $p < 0,01$ ).

Tras la administración de fluoxetina, no se observaron cambios en la liberación de serotonina (figs. 30C y D). Mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas solamente se observó un efecto significativo del tiempo [ $F(9,117)=10,19$ ,  $p < 0,001$ ] (fig. 30C).

### **Estudio de la liberación de glutamato**

No se observaron cambios significativos en los niveles basales de glutamato en mPFCx entre los grupos cKO y WT (figs. 31A, inserto y C, inserto). La infusión del compuesto veratridina no produjo cambios significativos en el área bajo la curva entre los animales cKO para  $\beta$ -catenina y sus respectivos animales WT (fig. 31B). El ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró un efecto significativo del tiempo [ $F(7,98)=7,38$ ,  $p < 0,001$ ], y de la interacción genotipo x tiempo [ $F(7,98)=2,28$ ,  $p < 0,05$ ] (fig. 25A). El post-test Bonferroni mostró una mayor liberación de glutamato en animales cKO 80 min después de la infusión de veratridina ( $p < 0,01$ ).

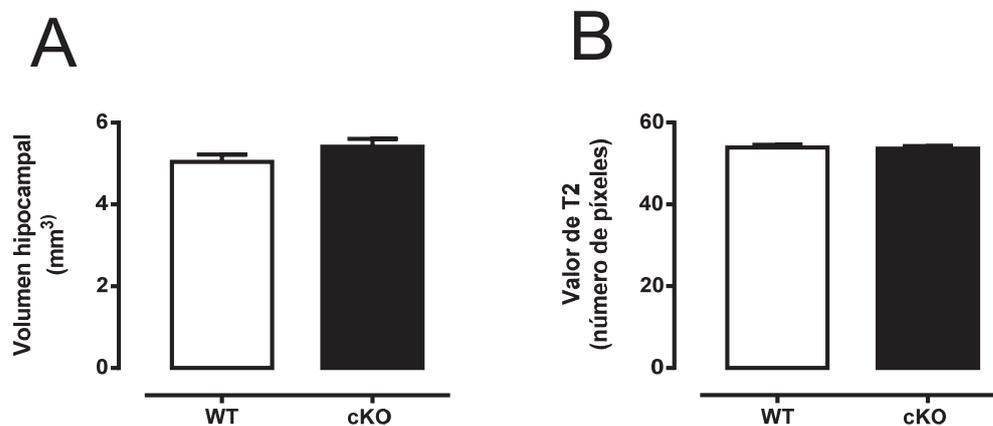
Tras la administración de aguda de fluoxetina sistémica, no se observaron cambios en la liberación de glutamato (figs. 31C y D). Por ANOVA de dos vías de medidas repetidas solamente mostró un efecto significativo del tiempo [ $F(9,144)=6,68$ ,  $p < 0,001$ ] (fig. 25C).



**Figura 31.** Efecto de la eliminación de  $\beta$ -catenina de la SGZ del *hipocampo* sobre la liberación de glutamato en mPFCx. Liberación de glutamato tras la administración de veratridina (A y B) y de fluoxetina (C y D). Los niveles de liberación basal se representan como inserto en las figuras A y C. Perfil de liberación temporal de glutamato tras la administración de veratridina (A) y fluoxetina (C), y área bajo la curva de ambos perfiles (B para veratridina y D para fluoxetina). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido de Bonferroni test. \*\* $p < 0,01$  vs grupo WT.  $n=7-10$  animales por grupo.

## 2.5. ESTUDIOS DE NEUROIMAGEN EN LOS RATONES cKO PARA $\beta$ -CATENINA

En los estudios de neuroimagen, se determinó el volumen hipocampal en animales cKO para  $\beta$ -catenina y sus respectivos animales *wildtype*, a partir de imágenes tomográficas obtenidas mediante resonancia magnética nuclear. Diferentes autores describen la disminución en el tamaño de esta área en cerebros de pacientes diagnosticados de depresión mayor respecto a individuos sanos (Campbell et al, 2004; MacQueen et al, 2003; McKinnon et al, 2009).



**Figura 32.** Evaluación del volumen hipocampal en ratones cKO para  $\beta$ -catenina y sus respectivos WT. Representación del cálculo del volumen del *hipocampo* tras segmentación manual (A), y tras la caracterización del tiempo T2 de relajación (B) de esta estructura. Resultados expresados como promedio  $\pm$  S.E.M. n=6 animales por grupo.

Tras la obtención de las imágenes, se realizaron dos tipos de análisis para determinar la dimensión de la estructura cerebral, un primer estudio volumétrico mediante segmentación manual o ROI (*Region of interest*) (fig. 32A), y un segundo análisis en el que se realizó la caracterización de este tejido mediante su valor de relajación T2 (fig. 32B), que ha demostrado ser un indicador en otras enfermedades psiquiátricas (Ongur et al, 2010). En los dos tipos de análisis se obtuvieron resultados similares entre animales cKO para  $\beta$ -catenina y sus correspondientes animales WT.

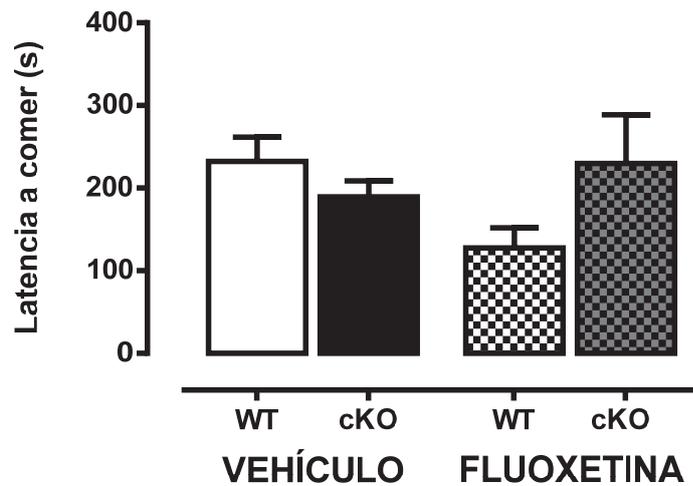
## 2.6. RESPUESTA DEL RATÓN *KNOCKOUT* PARA $\beta$ -CATENINA AL TRATAMIENTO CON FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS

En este apartado se incluyen los cambios conductuales, neuroquímicos y moleculares producidos por la administración de compuestos con acción antidepresiva sobre los animales cKO para  $\beta$ -catenina, y sus respectivos animales *wildtype*.

### 2.6.1. TRATAMIENTO CRÓNICO CON FLUOXETINA EN RATONES cKO $\beta$ -CATENINA: EFECTO CONDUCTUAL

#### *Novelty Supressed Feeding Test*

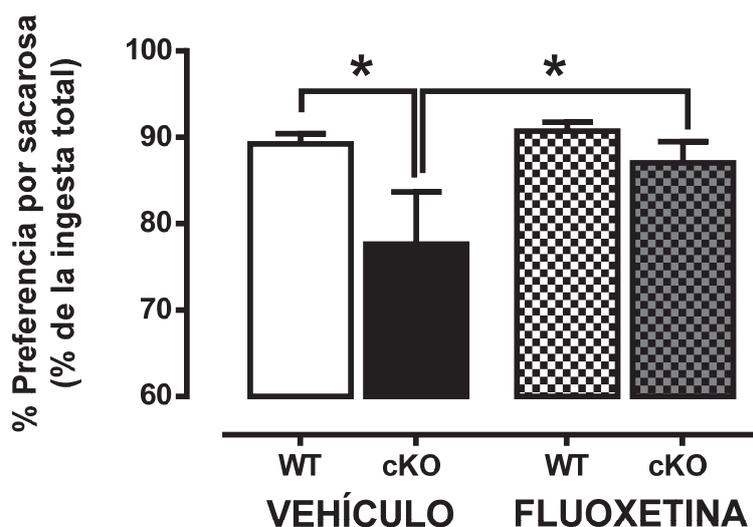
Un mes después de la inducción del *knockout* condicional para  $\beta$ -catenina, se comenzó la administración durante 28 días del inhibidor selectivo del transportador de serotonina (SSRI) fluoxetina (20 mg/kg/día, i.p.). Transcurrido este periodo, los grupos cKO y WT tratados con fluoxetina, y sus respectivos grupos vehículo, se sometieron al test conductual *novelty suppressed feeding*, para evaluar la conducta ansioso/depresiva. Mediante ANOVA de dos vías se apreció el efecto significativo de la interacción genotipo x tratamiento [ $F(1,47)=4,44$ ,  $p < 0,05$ ]. Un análisis *t* de Student mostró una disminución significativa de la latencia en los animales *wildtype* tratados con fluoxetina frente al grupo vehículo ( $p < 0,05$ ), mientras que no se observaron cambios en los animales cKO  $\beta$ -catenina (fig. 33). Cabe destacar en este caso, que el análisis de la ingesta de comida posterior al test experimental mostró una mayor ingesta en los grupos tratados con fluoxetina frente a sus respectivos vehículos [ $F(1,47)=17,44$ ,  $p < 0,001$ ] (tratamiento en los WT  $p < 0,05$ , y en los cKO  $p < 0,01$ ).



**Figura 33.** Efecto del tratamiento crónico con fluoxetina sobre la conducta de los animales cKO para  $\beta$ -catenina en el NSF. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. n=11-15 animales por grupo.

### *Test de la preferencia de sacarosa*

Para comprobar si la administración de fluoxetina revertía el estado anhedónico observado en los animales cKO respecto a sus controles, utilizamos el test de preferencia de sacarosa. Los animales cKO presentaron una menor preferencia de sacarosa que los animales WT (cKO:  $77,65 \pm 6,04$  vs WT:  $89,23 \pm 1,21\%$ ,  $p < 0,05$ ) (fig. 34). Por otro lado, el tratamiento crónico con fluoxetina indujo un incremento en la preferencia de sacarosa en los animales cKO frente a sus respectivos cKO vehículo (cKO Flx:  $87,07 \pm 2,44$  vs cKO veh:  $77,65$ ,  $p < 0,05$ ). Los resultados estadísticos obtenidos mediante ANOVA de dos vías indicaron un efecto significativo del genotipo ( $[F(1,23)=8,26; p < 0,01]$ ), y próximo a la significación estadística para el efecto del tratamiento [ $F(1,3)=4,25; p = 0,051$ ].



**Figura 34.** Efecto del tratamiento crónico con fluoxetina sobre el estado anhedónico en animales cKO para  $\beta$ -catenina. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls test. \* $p < 0,05$ .  $n=5-8$  animales por grupo.

## 2.6.2. TRATAMIENTO SUBCRÓNICO CON RS67,333 EN RATONES cKO $\beta$ -CATENINA

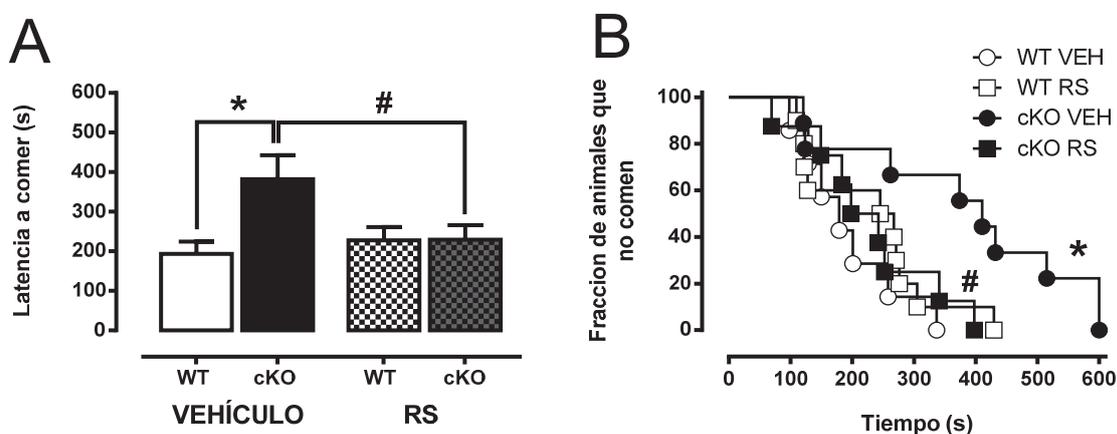
El agonista parcial del receptor 5-HT<sub>4</sub> RS67,333 es un compuesto que presenta potencial antidepressivo en ensayos pre-clínicos (Lucas et al, 2007; Pascual-Brazo et al, 2012).

### Efecto del compuesto RS67,333 sobre la conducta

#### Novelty Supressed Feeding Test

La administración sub-crónica (7 días) del compuesto RS67,333 (1,5 mg/kg/día, i.p.), produjo un efecto de tipo antidepressivo en los animales cKO para  $\beta$ -catenina respecto al grupo cKO vehículo. Los animales cKO para  $\beta$ -catenina a los que se administró vehículo, mostraron un mayor tiempo de latencia con respecto a los animales WT, confirmado los resultados mostrados en el apartado 1.3.3 (cKO VEH: 381,9 $\pm$ 60,7 vs WT VEH: 193,1 $\pm$ 31,0 s,  $p < 0,05$ ) (fig. 35A). Los animales cKO  $\beta$ -catenina tratados con RS67,333 durante 7 días mostraron una disminución en el tiempo de latencia (cKO RS: 229,1 $\pm$ 37,0 vs cKO VEH: 381,9 $\pm$ 60,7,  $p < 0,05$ ) (fig. 35A). El análisis estadístico por ANOVA de dos vías reveló la existencia de un efecto significativo del genotipo [ $F(1,30)=4,71$ ,  $p < 0,05$ ], y de la

interacción genotipo x tratamiento [ $F(1,30)=4,56, p < 0,05$ ]. No se observaron diferencias significativas en la ingesta de comida posterior al test.



**Figura 35.** Efecto conductual en el NSF de la administración durante 7 días del compuesto RS67,333 en el cKO  $\beta$ -catenina y sus respectivos animales WT. Tiempos de latencia en los diferentes grupos experimentales (A y B). Representación del tiempo de latencia mediante curvas de Kaplan-Meier (B). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías seguido del post test Newman-Keuls (A) y Mantel-Cox test (B). \* $p < 0,05$  cKO VEH vs WT VEH; # $p < 0,05$  cKO RS vs cKO VEH.  $n=7-9$  animales por grupo.

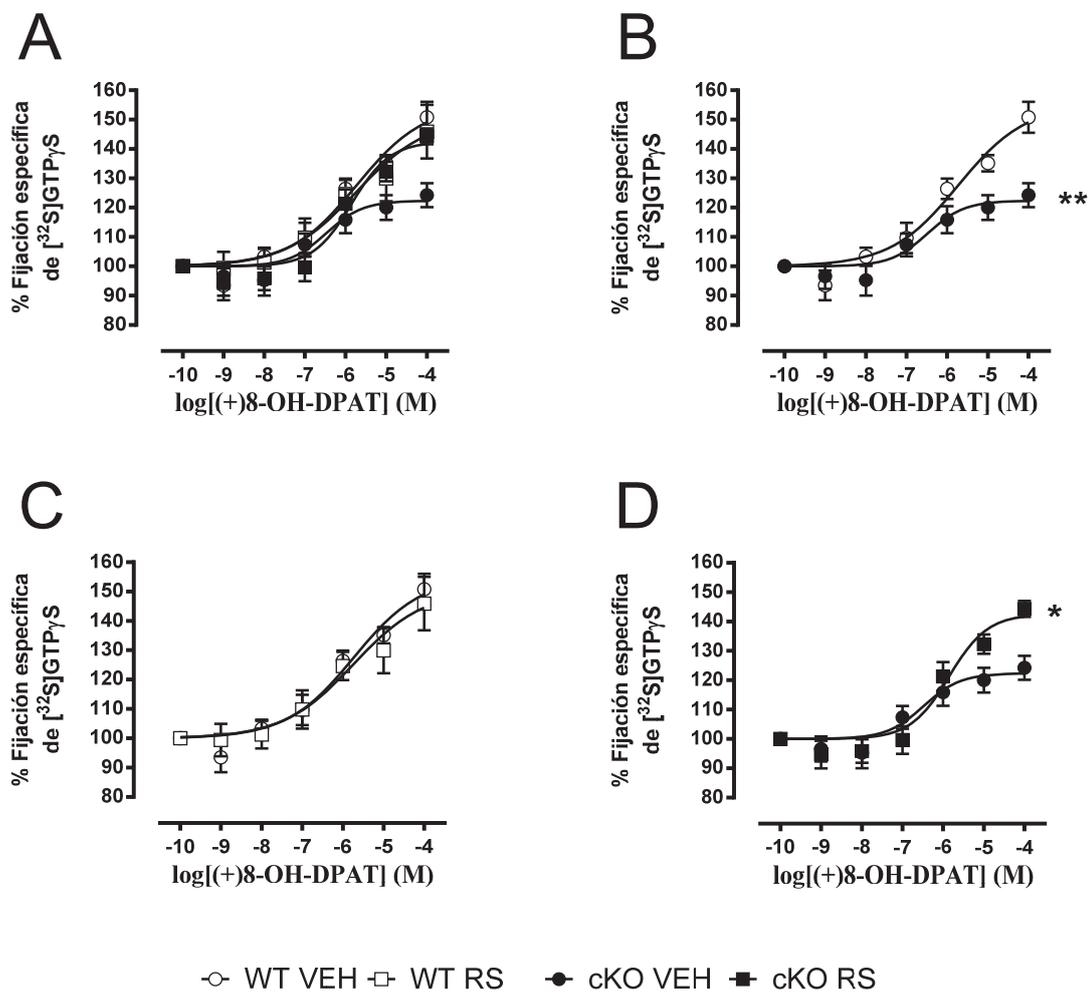
### Efecto del tratamiento sub-crónico con RS67,333 sobre la funcionalidad del sistema serotoninérgico

A continuación, evaluamos si el efecto de tipo antidepresivo/ansiolítico observado en los animales cKO para  $\beta$ -catenina tras la administración del compuesto RS67,333 iba acompañado de una modulación del sistema serotoninérgico.

### Efecto del tratamiento con RS67,333 en ratones cKO $\beta$ -catenina en la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>

La funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en animales tratados con RS67,333 y sus respectivos vehículos, se determinó mediante ensayos de fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S en homogeneizados de membranas de PFCx (fig. 36A). Los valores de estimulación máxima (E<sub>max</sub>) de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S mediada por la estimulación con el agonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> ( $\pm$ ) 8-OH-DPAT fue menor en los animales cKO respecto a sus respectivos WT (cKO VEH: 122,4 $\pm$ 3,6 vs WT VEH: 155,2 $\pm$ 9,8%,  $p < 0,01$ ) (fig. 36B). La

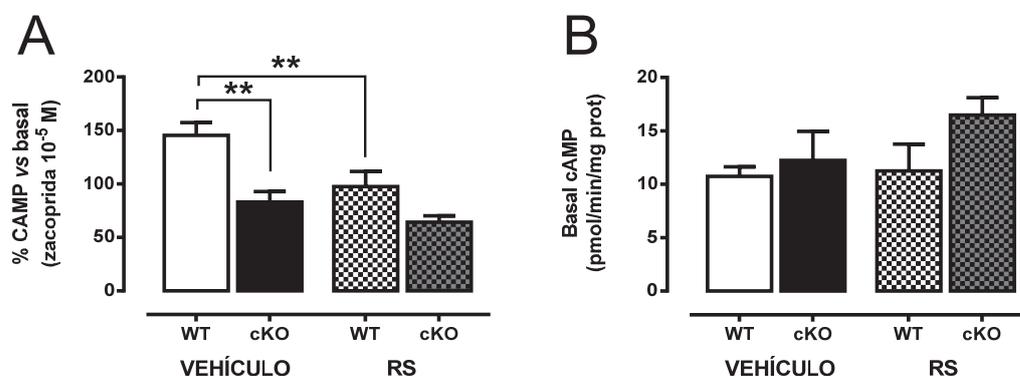
administración subcrónica del agonista parcial RS67,333 produjo en los animales cKO un incremento de los valores de  $E_{max}$  (cKO RS:  $142.5 \pm 4,8$  vs cKO VEH:  $122.4 \pm 3,6\%$ ,  $p < 0,05$ ) hasta alcanzar valores similares a los del animal WT (fig. 36D), sin cambios en los animales WT tratados (fig. 36C). El análisis estadístico ANOVA de dos vías de los valores de  $E_{max}$  reveló una tendencia en la variable genotipo [ $F(1,22)=4,28$ ,  $p = 0,051$ ]. Los grupos experimentales no presentaron diferencias en los valores de fijación basal.



**Figura 36.** Efecto del tratamiento subcrónico con RS67,333 sobre la fijación específica de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  inducida por el agonista selectivo  $5\text{-HT}_{1A}$  ( $\pm$ ) 8-OH-DPAT de todos los grupos experimentales (A); cKO y WT VEH (B); WT VEH y tratado con RS67,333 (C); y cKO VEH y tratado con RS67,333 (D). Resultados expresados como promedio  $\pm$  S.E.M. Prueba *t* Student, datos no pareados. \* $p < 0,05$ , cKO RS vs cKO VEH, \*\* $p < 0,01$ , cKO VEH vs WT VEH.  $n=6-7$  animales por grupo.

### Efecto del tratamiento con RS67,333 en ratones cKO $\beta$ -catenina en la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>4</sub>

También se estudió la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>4</sub> valorando la acumulación de cAMP inducida por el agonista 5-HT<sub>4</sub> zacoprida en animales cKO  $\beta$ -catenina y sus respectivos animales WT, tratados durante 7 días con el compuesto RS67,333. Los animales cKO  $\beta$ -catenina presentaron una disminución significativa de la acumulación de cAMP con respecto a los animales *wildtype* (cKO VEH: 73,7±4,2 vs WT VEH: 154,0±12,1%,  $p < 0,01$ ) (fig. 37A). Por otro lado, el tratamiento durante 7 días con el agonista parcial 5-HT<sub>4</sub> RS67,333 indujo un descenso en la acumulación de cAMP en los animales WT (WT RS: 84,3±7,8 vs WT VEH: 145,5±12,1%,  $p < 0,001$ ), mientras que el tratamiento no produjo cambios en animales cKO para  $\beta$ -catenina (fig. 37A). El análisis estadístico con ANOVA de dos vías demostró un efecto significativo de la variable genotipo [ $F(1,12)=19,08$ ,  $p < 0,01$ ], y del tratamiento [ $F(1,12)=9,27$ ,  $p < 0,05$ ]. Por otro lado, los niveles basales de cAMP no presentaron cambios en los diferentes grupos experimentales (fig. 37B).



**Figura 37.** Influencia de la administración de RS67,333 durante 7 días sobre la actividad de la adenilato ciclasa tras la activación del receptor 5-HT<sub>4</sub> en homogeneizados de *estriado* ratón por el agonista 5-HT<sub>4</sub> zacoprida (10  $\mu$ M). (A) y sobre la cantidad basal de cAMP (B). Resultados expresados como promedio±S.E.M. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls *test*. \*\* $p < 0,01$ . n=4 animales por grupo.

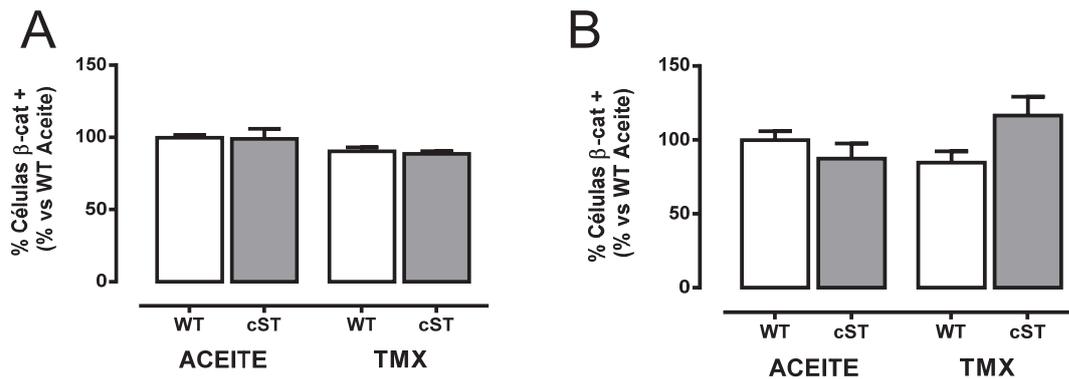
### 3. CARACTERIZACIÓN DEL RATÓN QUE ESTABILIZA $\beta$ -CATENINA

En este apartado se caracterizaron los animales en los que mediante manipulación genética se evita la degradación de  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo*, mediante la eliminación del exón 3 de esta proteína. Del mismo modo que en el animal cKO para  $\beta$ -catenina, en los animales que estabilizan  $\beta$ -catenina (cST) se estudiaron los efectos conductuales, neuroquímicos y moleculares de dicha manipulación.

#### 3.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE $\beta$ -CATENINA EN *HIPOCAMPO*

Los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina en la capa subgranular del giro dentado del *hipocampo* se determinaron mediante inmunohistoquímica tras la inducción del transgénico mediante la administración de tamoxifeno (1mg/día, i.p., durante 5 días), utilizando aceite de maíz para los grupos vehículo. Un mes después de la inducción del transgénico no se observaron cambios en la acumulación de  $\beta$ -catenina (fig. 38A). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo de la variable tamoxifeno (tratamiento) [ $F(1,17)=4,72, p < 0,05$ ].

Tomando un tiempo más corto después de la inducción del transgénico, 12 h después, el análisis de la expresión de  $\beta$ -catenina en la SGZ del *hipocampo*, no mostró cambios significativos, si bien se observó una tendencia al incremento en animales que estabilizan  $\beta$ -catenina, frente a los animales WT tratados con tamoxifeno (cST+TMX:  $116,5 \pm 12,7$  vs WT+TMX:  $84,7 \pm 7,6, p = 0,057$ ) (fig. 38B). El ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo de la interacción entre las variables genotipo y tamoxifeno [ $F(1,20)=5,45, p < 0,05$ ].

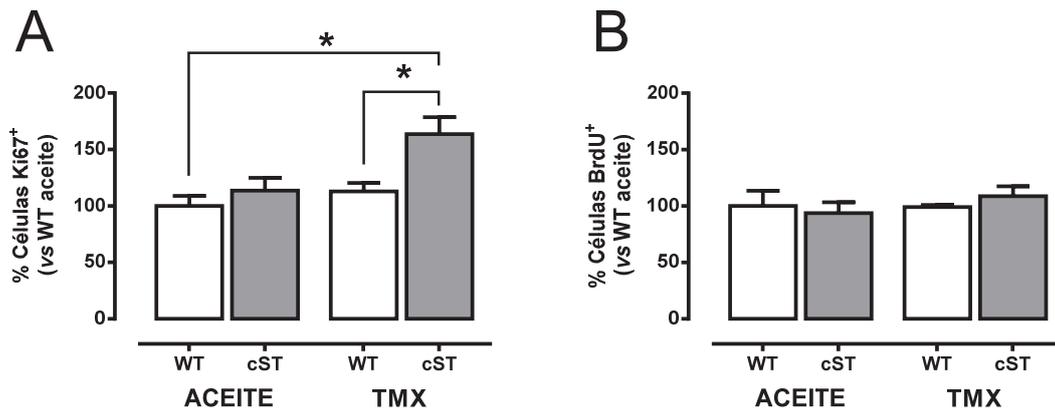


**Figura 38.** Efecto sobre la expresión de  $\beta$ -catenina en la capa subgranular del giro dentado tras la inducción del animal cST un mes (A) y 12 h (B) después de la última administración de TMX. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls test. n=4-6 animales por grupo.

## 3.2. ESTUDIOS DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN Y NEUROGÉNESIS EN HIPOCAMPO

### 3.2.1. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN

Con el objetivo de valorar la influencia de la estabilización de  $\beta$ -catenina sobre marcadores de proliferación en la SGZ del *hipocampo*, realizamos experimentos de inmunohistoquímica para cuantificar las células que expresan el marcador nuclear de proliferación Ki67, como de las células que han incorporado BrdU 1 mes después de la inducción del transgénico. En el estudio de la expresión del marcador de proliferación Ki67 se observó un incremento en los animales cST tras la administración de tamoxifeno, con respecto a los animales *wildtype* tratados con tamoxifeno (cST+TMX:  $163,7 \pm 14,9$  vs WT+TMX:  $112,9 \pm 7,6$  células Ki67<sup>+</sup>,  $p < 0,05$ ) y con respecto a los mismos animales tratados con aceite (cST+TMX:  $163,7 \pm 14,9$  vs cST+aceite:  $113,7 \pm 11,2$  células Ki67<sup>+</sup>,  $p < 0,05$ ). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de las dos componentes: tratamiento [ $F(1,22)=7,25$ ,  $p < 0,05$ ], y genotipo [ $F(1,22)=7,60$ ,  $p < 0,05$ ] (fig. 39A). Por otro lado, el análisis de la incorporación del análogo sintético de la timidina BrdU, no mostró diferencias en ninguno de los grupos estudiados (fig. 39B).

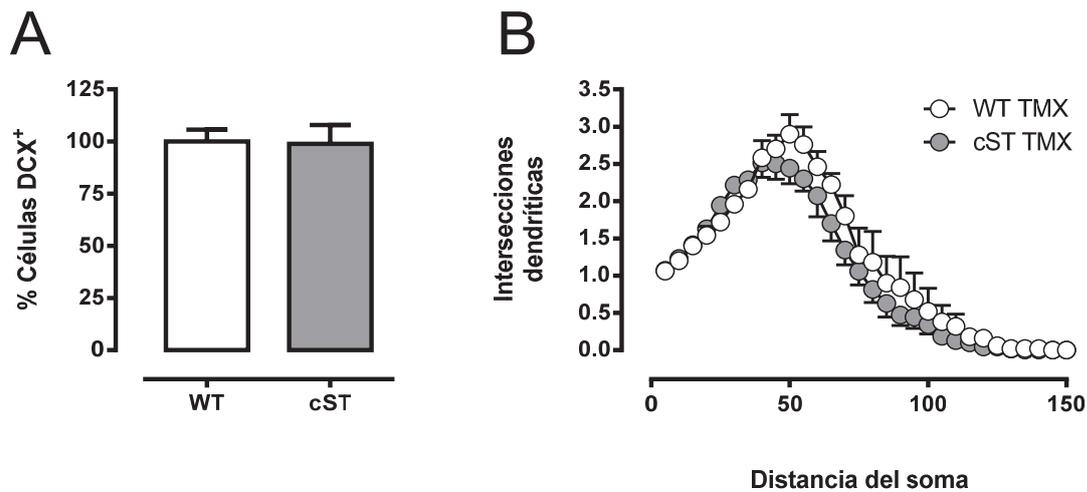


**Figura 39.** Efecto de la inducción del animal cST sobre la proliferación hipocampal determinada por la expresión de la proteína nuclear Ki67 (A), y la incorporación de BrdU (B). Resultados expresados como promedio±S.E.M. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls test. \* $p < 0,05$ .  $n=4-10$  animales por grupo.

Como ya se ha descrito para el animal cKO  $\beta$ -catenina, al observar que los grupos WT y cKO tratados con vehículo (aceite) y el grupo *wildtype* al que se administró tamoxifeno no presentaban diferencias significativas en los niveles de  $\beta$ -catenina, ni en los niveles de los parámetros asociados a proliferación (Ki67 y BrdU), se decidió realizar el resto de los experimentos sólo con los grupos WT y cST tratados con tamoxifeno, y reduciendo así el número de animales a emplear en los futuros experimentos.

### 3.2.2. EXPRESIÓN DE DOBLECORTINA (DCX)

Seguidamente, se evaluó si los cambios observados en proliferación se correlacionaban con cambios en la población de neuronas inmaduras, cuyo marcador específico es la proteína doblecortina (DCX). Como se ha descrito para los animales cKO, realizamos un análisis *Sholl* del marcaje obtenido con DCX para comprobar el estado de la arborización en estas nuevas neuronas DCX<sup>+</sup>, y así comprobar si la estabilización de  $\beta$ -catenina inducía cambios en la densidad dendrítica. En la figura 40 se muestran los resultados obtenidos en ambos estudios no observándose cambios entre los dos grupos experimentales (cST y WT) ni en el número de células DCX positivas, ni en su arborización. Un ANOVA de dos vías con los datos de la arborización dendrítica reveló un efecto significativo en la variable distancia al soma [ $F=(29,290)=89,78$ , \*\*\* $p < 0,001$ ].



**Figura 40.** Efecto sobre el número de neuronas que expresan doblecortina generadas en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo tras la inducción del animal transgénico (A), así como sobre la complejidad dendrítica en las células DCX<sup>+</sup> (B). Resultados expresados como promedio±S.E.M. Prueba *t* Student, datos no pareados (A). ANOVA de dos vías seguida de Newman-Keuls test (B). n=5-7 animales por grupo.

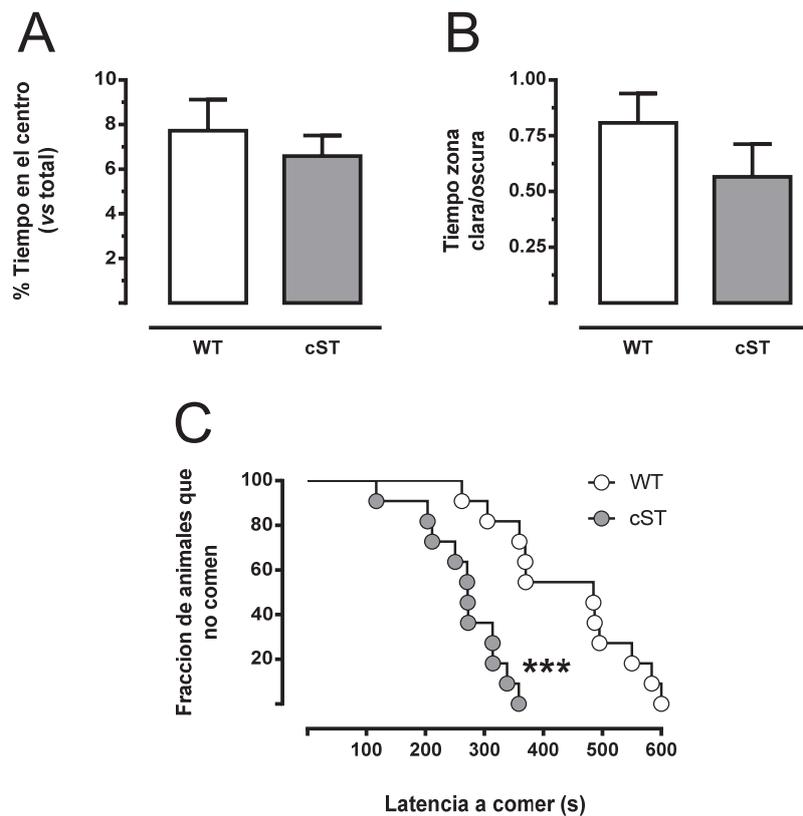
### 3.3. ESTUDIOS CONDUCTUALES

Una vez confirmado el incremento en proliferación tras la estabilización de  $\beta$ -catenina, se estudió el fenotipo comportamental de los animales un mes después de la administración de TMX mediante diferentes test conductuales que evalúan conductas de tipo ansioso y de tipo depresivo.

#### 3.3.1. CONDUCTA DE TIPO ANSIOSA

##### *Test de campo abierto (open field test, OF)*

La ansiedad evaluada mediante el test de campo abierto en los animales cST  $\beta$ -catenina en SGZ del *hipocampo*, no mostró cambios con respecto al grupo *wildtype* (fig. 41A).



**Figura 41.** Efecto de la estabilización de  $\beta$ -catenina (cST) en la SGZ del giro dentado sobre la ansiedad. Porcentaje de tiempo de permanencia en el centro en el test del campo abierto (OF) (A). Tiempo en el compartimiento claro vs oscuro en el LDB (B). Curva de supervivencia que muestra el tiempo de latencia en el NSF (C). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. Análisis de supervivencia y diferencias estadísticas determinadas mediante el método de Kaplan–Meier (C). \*\*\* $p < 0,001$  vs WT.  $n=7-11$  animales por grupo.

### *Test de la caja clara/oscura (Light Dark Box, LDB)*

Con esta prueba se evaluó la conducta ansiosa pura, sin componente emotivo o de recompensa. No se observaron diferencias entre los dos grupos experimentales evaluados (cST y WT) (fig. 41B).

### *Novelty Supressed Feeding Test (NSF)*

Los animales transgénicos mostraron un fenotipo de tipo ansiolítico/anti-depresivo en el NSF, evidenciado por la disminución significativa en el tiempo de latencia a comer (cST:  $265,8 \pm 20,9$  vs WT:  $442,4 \pm 34,6$  s,  $p < 0,001$ ) (fig. 41C). No se observaron diferencias

significativas en la ingesta de comida posterior al test. No se observaron diferencias en ingesta de comida durante los 5 min de duración del post-test.

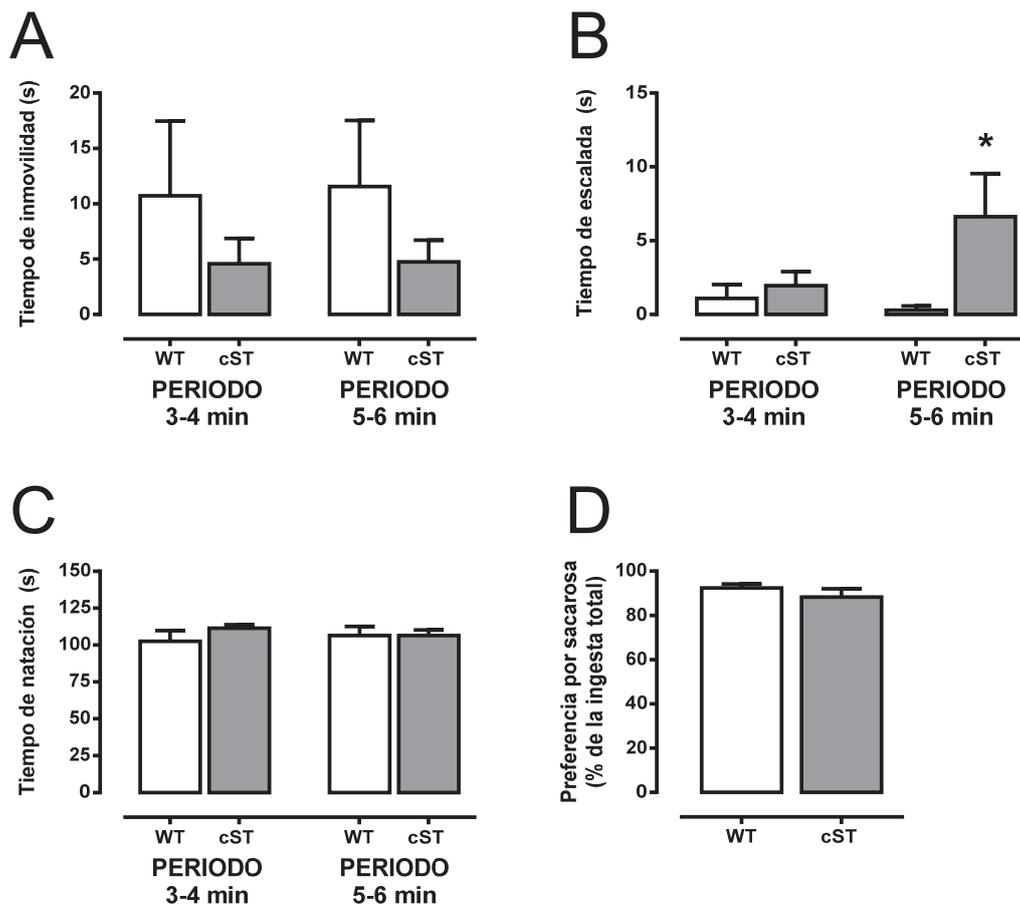
### **3.3.2. CONDUCTA DE TIPO DEPRESIVA**

#### ***Test de la natación forzada (Forced Swimming Test, FST)***

Para el análisis del FST, el tiempo de duración de la prueba, se dividió en episodios de dos minutos cada uno y se analizaron los tiempos de inmovilidad, natación (*swimming*) y escalada (*climbing*). Los tiempos de inmovilidad (fig. 42A) y natación (fig. 42C) no mostraron diferencias entre el grupo cST y el grupo WT. El análisis del tiempo de escalada mostró una mayor conducta de este tipo en los animales cST con respecto a sus animales WT en los dos últimos minutos del test (cST 5-6 min:  $6,63 \pm 2,92$  vs WT 5-6 min:  $0,29 \pm 0,29$  s,  $p < 0,05$ ) (fig. 42B).

#### ***Test de preferencia de sacarosa***

Por último, se estudió el efecto sobre la anhedonia de la estabilización de  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo*. Estos animales no mostraron diferencias en la preferencia de sacarosa con respecto a los animales *wildtype* (fig. 42D).



**Figura 42.** Efecto de la estabilización de  $\beta$ -catenina sobre la conducta tipo depresiva. Conductas de inmovilidad (A), escalada (B), y natación (C) en el test de la natación forzada. Preferencia de sacarosa (D). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. Prueba *t* Student, datos no pareados. \* $p < 0,05$ .  $n=11$  animales por grupo.

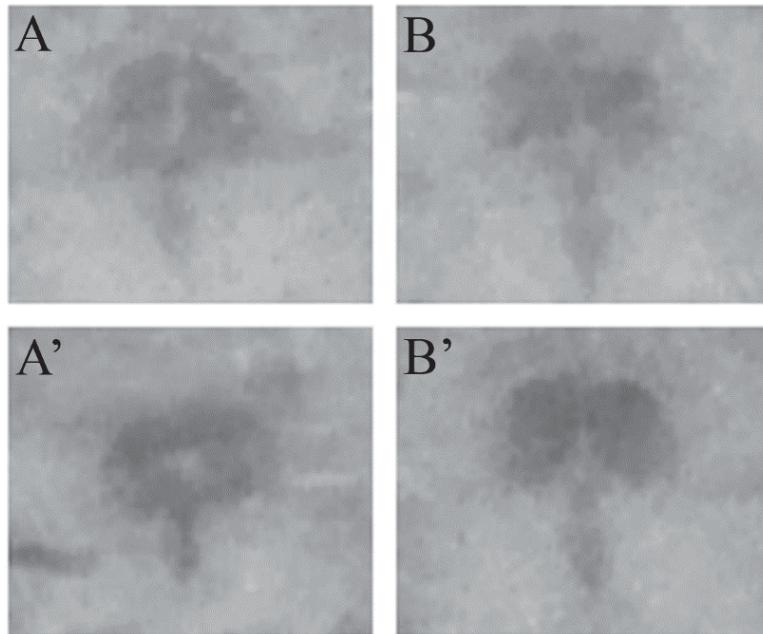
### 3.4. ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS

#### 3.4.1. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub>: ESTUDIOS *IN VITRO*

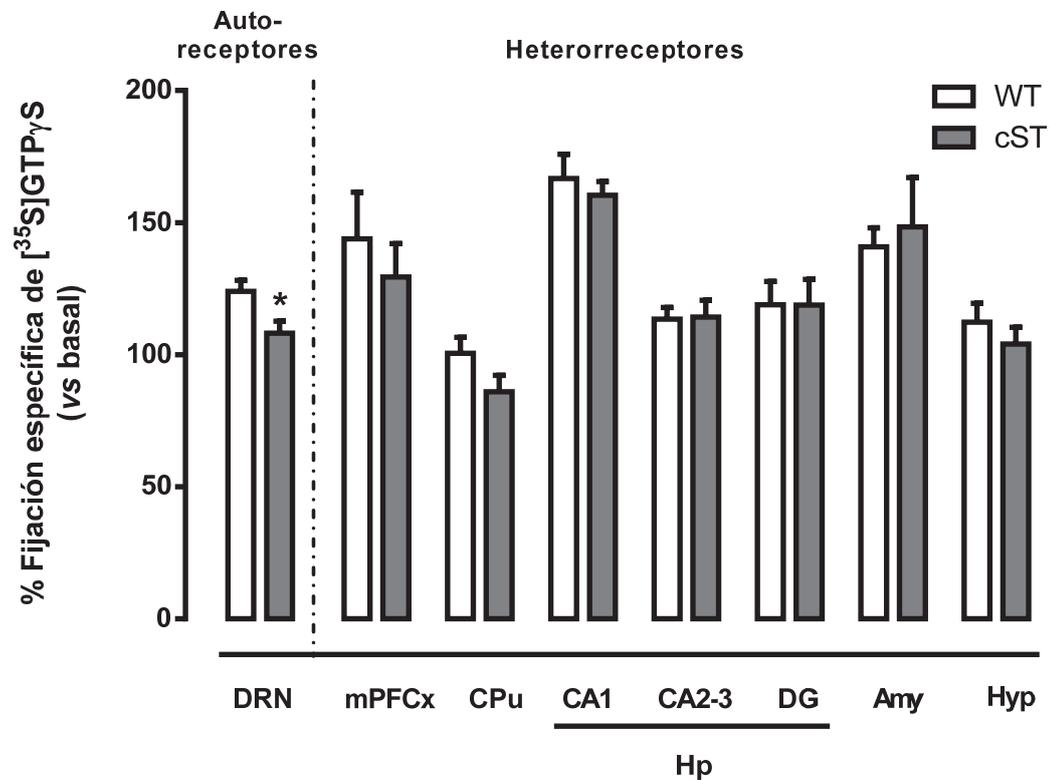
De forma paralela a lo realizado con los animales cKO  $\beta$ -catenina, quisimos estudiar si el efecto conductual observado en los animales que estabilizan  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del hipocampo, estaba asociado a cambios en el sistema serotoninérgico, debido a la importante implicación de este sistema en la respuesta a fármacos antidepresivos.

### Fijación específica de [<sup>35</sup>S]GTPγS mediada por la activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en secciones cerebrales

El estudio de autorradiografía funcional del receptor 5-HT<sub>1A</sub> mediante fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS tras estimulación por el agonista selectivo (±) 8-OH-DPAT 10 μM, mostró una menor estimulación en el *núcleo dorsal del rafe* (DRN) de los animales cST frente a sus respectivos animales WT (-66%,  $p < 0,05$ ) (figs. 43 y 44). No se encontraron diferencias en la funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en ninguna de las restantes áreas estudiadas.



**Figura 43.** Autorradiogramas representativos de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS inducida por (±)8-OH-DPAT en el DRN. La figura refleja las estimulaciones basales en el grupo WT (A) y el grupo cST (B), y las estimulaciones tras la activación específica de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en ambos grupos (A' y B' respectivamente). Barra = 2 mm.



**Figura 44.** Fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  mediada por la activación de los receptores  $5\text{-HT}_{1\text{A}}$  en ratones con  $\beta$ -catenina estabilizada. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. Prueba *t* Student, datos no pareados. \* $p < 0,05$ .  $n=4-6$  animales por grupo. DRN: *núcleo dorsal del rafe*; mPFCx: *corteza prefrontal medial*; CPu: *caudado-putamen*; Hp: *hipocampo* (CA1, *área CA1 del hipocampo*; CA2-3, *áreas CA2 y CA3 del hipocampo*; DG, *giro dentado*); Amy, *amígdala*; Hyp, *hipotálamo*.

La fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  basal no presentó diferencias en ninguna estructura entre los dos grupos experimentales estudiados (tabla 8).

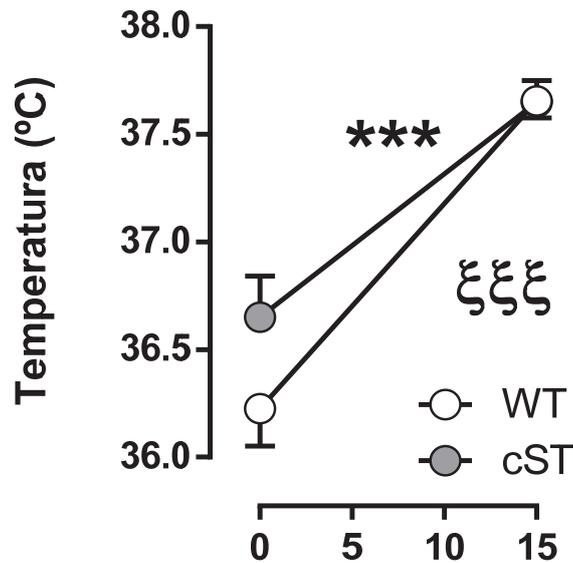
**Tabla 8.** Valores de fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTPγS (nCi/g tejido) en las estructuras cerebrales estudiadas. Resultados expresados como promedio±S.E.M. n=4-6 animales por grupo. mPFCx, *corteza prefrontal medial*; Hp, *hipocampo* (CA1, área CA1 del *hipocampo*; CA2-3, áreas CA2 y CA3 del *hipocampo*; DG, giro dentado del *hipocampo*), CPu, *caudado-putamen*; Hyp, *hipotálamo*, Amy, *amígdala*; y DRN, *núcleo dorsal del rafe*.

Áreas cerebrales	WT		cKO	
	PROMEDIO	± S.E.M.	PROMEDIO	± S.E.M.
mPFCx	347,2	± 69,1	355,2	± 29,4
Hp				
CA1	492,3	± 10,2	585,5	± 50,4
CA2-3	407,5	± 14,0	455,7	± 33,1
DG	228,8	± 18,1	245,2	± 20,6
CPu	662,8	± 82,4	810,2	± 88,7
Hyp	717,6	± 44,5	708,7	± 79,7
Amy	457,0	± 42,5	367,5	± 48,2
DRN	533,2	± 33,2	540,3	± 30,9

### 3.4.2. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub>: ESTUDIOS *IN VIVO*

#### Evaluación de la hipertermia inducida por estrés (SIH)

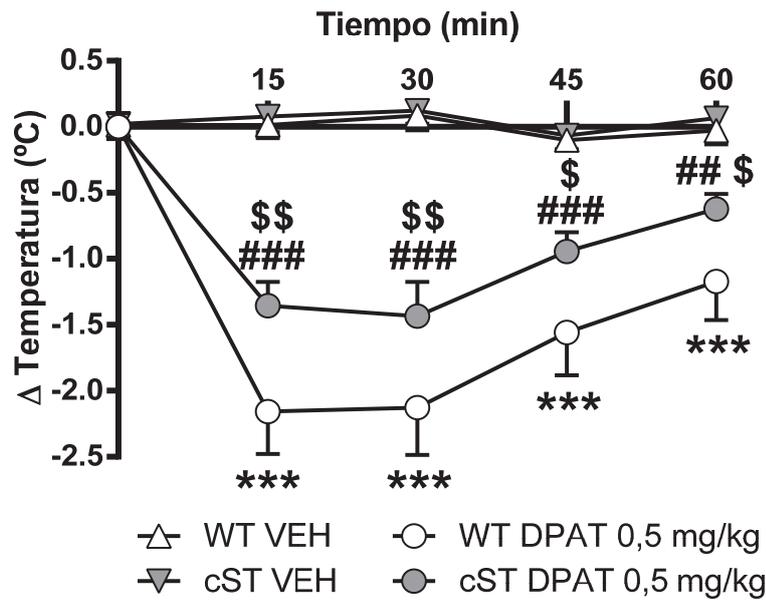
Como se describió en el apartado del animal cKO, en la SIH se evaluó la temperatura corporal basal de los animales cST y WT, así como la temperatura inducida por estrés (sonda de temperatura anal) transcurridos 15 min de la medida inicial. Los animales cST presentaron valores de temperatura basales similares a sus controles WT (fig. 45). Por otro lado los animales cST, sufrieron incrementos significativos de temperatura tras la aplicación del estrés (cST t=15 min: 37,65±0,01 vs cST t=0 min: 36,65±0,17°C,  $p < 0,001$ ), de magnitud similar a los animales WT (WT t=15 min: 37,66±0,08 vs WT t=0 min: 36,23±0,17°C,  $p < 0,001$ ) (fig. 45).



**Figura 45.** Temperatura corporal evaluada en estado inicial y 15 min después de la aplicación del agente estresante. Resultados expresados como promedio±S.E.M. Prueba *t* Student, datos pareados.  $\xi\xi\xi p < 0,001$  WT  $t=15$  vs WT  $t=0$ ,  $***p < 0,001$  cST  $t=15$  vs cST  $t=0$ .  $n=16$  animales por grupo.

### Evaluación de la hipotermia inducida por el agonista 5-HT<sub>1A</sub> (+) 8-OH-DPAT en animales $\beta$ -catenina cST

La valoración de la hipotermia inducida por un agonista selectivo para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> nos permitió examinar la funcionalidad *in vivo* de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> pre-sinápticos. Para ello se administró el agonista selectivo 5-HT<sub>1A</sub> (+) 8-OH-DPAT y se tomó la medida corporal cada 15 min, durante 1 h. La administración del agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (0,5 mg/kg, i.p.) promovió un descenso de la temperatura significativamente menor en los animales cST, con respecto al grupo WT 15 minutos (cST:  $-1,36 \pm 0,18$  vs WT:  $-2,16 \pm 0,32^\circ\text{C}$ ,  $p < 0,01$ ), 30 min (cST:  $-1,43 \pm 0,26$  vs WT:  $-2,13 \pm 0,36^\circ\text{C}$ ,  $p < 0,01$ ), 45 min (cST:  $-0,94 \pm 0,15$  vs WT:  $-1,56 \pm 0,33^\circ\text{C}$ ,  $p < 0,05$ ) y 60 min (cST:  $-0,62 \pm 0,11$  vs WT:  $-1,17 \pm 0,29^\circ\text{C}$ ,  $p < 0,05$ ) tras su administración (fig. 46). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías reflejó la existencia de un efecto significativo del genotipo [ $F(3,28)=23,67$ ,  $p < 0,001$ ], del tiempo [ $F(4,112)=39,88$ ,  $p < 0,001$ ], y de la interacción genotipo y tiempo [ $F(12,112)=15,67$ ,  $p < 0,001$ ]. La administración de vehículo (suero salino) no alteró la respuesta hipotérmica en ninguno de los dos grupos estudiados.



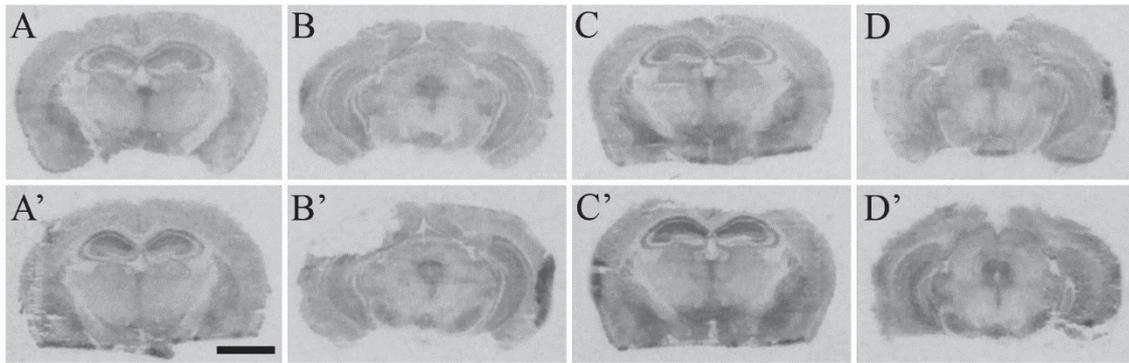
**Figura 46.** Hipotermia inducida por la administración del agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (+) 8-OH-DPAT 0,5 mg/kg en animales cST para  $\beta$ -catenina y sus correspondientes WT. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls test. \*\*\* $p$  < 0,001 WT (+) 8-OH-DPAT vs WT vehículo; ## $p$  < 0,01 y ### $p$  < 0,001 cST (+) 8-OH-DPAT vs cST vehículo; \$ $p$  < 0,05, \$\$ $p$  < 0,01 cST (+) 8-OH-DPAT vs WT (+) 8-OH-DPAT.  $n=7-9$  animales por grupo.

### 3.4.3. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1B</sub>

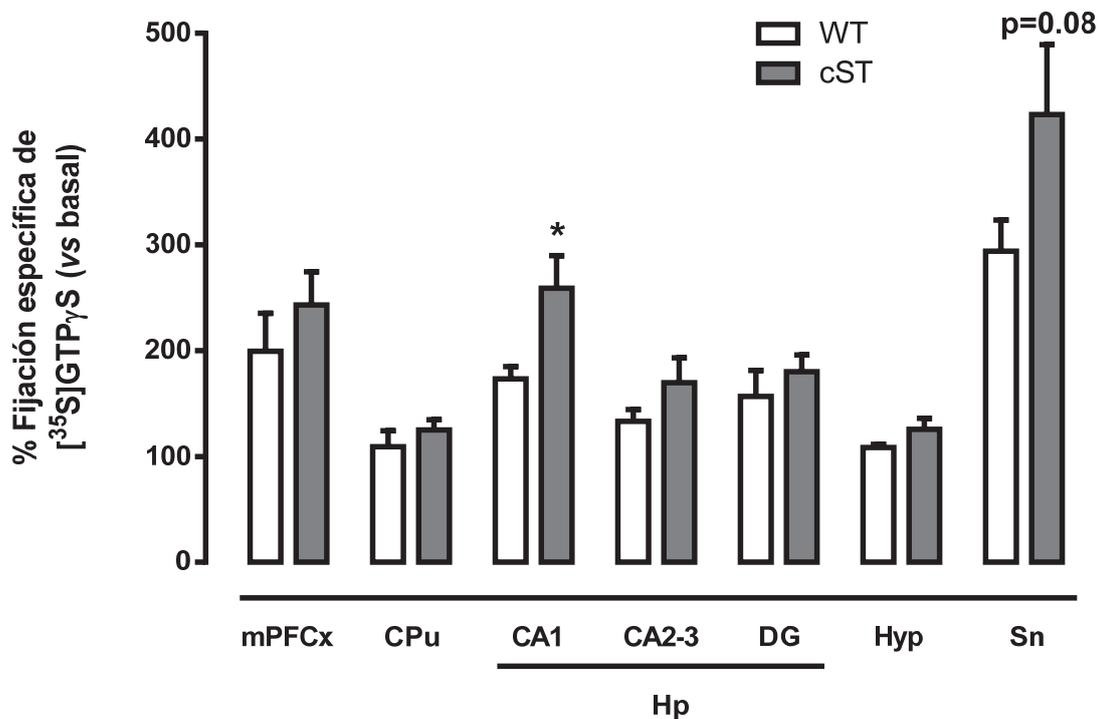
La activación de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, del mismo modo que los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, también está asociada al efecto antidepresivo como el que presentan nuestros animales cST.

#### Fijación específica de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S mediada por la activación del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en secciones cerebrales: estudios *in vitro*

Mediante estudios de autorradiografía funcional se evaluó la fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S mediada por la activación de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> por el agonista selectivo CP94,253 (10  $\mu$ M). Se observó un aumento significativo de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S en el área CA1 del *hipocampo* de los animales cST  $\beta$ -catenina, frente a sus respectivos controles (218%,  $p$  < 0,05), y un incremento, aunque no significativo en *sustancia negra* (Sn) (+120%,  $p$  = 0,08) para el mismo grupo (figs. 47 y 48).



**Figura 47.** Autorradiogramas representativos de la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  inducida por CP94,253. La figura refleja las estimulaciones basales en el grupo WT (A, B) y el grupo cST (C, D), y las estimulaciones tras la activación específica de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> en ambos grupos (A', B' y C', D', respectivamente). Barra = 2 mm.



**Figura 48.** Fijación específica de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  mediada por el agonista selectivo 5-HT<sub>1B</sub> CP94,253 en secciones coronales de cerebro de ratón cST  $\beta$ -catenina y sus correspondientes WT. Resultados expresados como promedio  $\pm$  S.E.M. Prueba *t* Student, datos no pareados. \**p* < 0,05 vs WT. *n*=3-6 animales por grupo. mPFCx, corteza prefrontal medial; CPu, caudado-putamen; Hp, hipocampo (CA1, área CA1 del hipocampo; CA2-3, área CA2 + CA3 del hipocampo; DG, giro dentado); Hyp hipotálamo; Sn, sustancia negra.

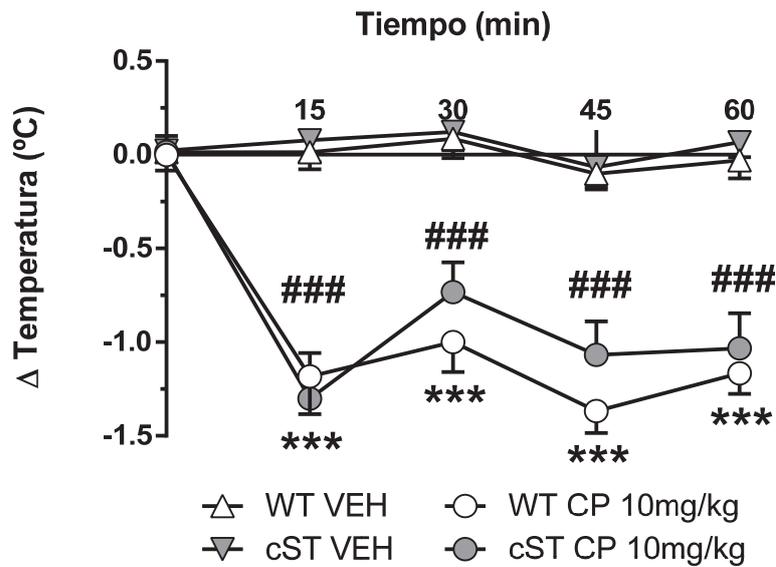
Los valores medios basales de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS (tabla 9) en las diferentes áreas cerebrales estudiadas en este trabajo, no mostraron diferencias entre los animales cST para β-catenina y sus respectivos animales control.

**Tabla 9.** Valores de fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTPγS (nCi/g tejido) en las estructuras cerebrales estudiadas. Resultados expresados como promedio±S.E.M. n=3-6 animales por grupo. mPFCx, corteza prefrontal medial; Hp, hipocampo (CA1, área CA1 del hipocampo; CA2-3, áreas CA2 y CA3 del hipocampo; DG, giro dentado del hipocampo); CPu, caudado-putamen; Hyp, hipotálamo; Amy, amígdala; y Sn, sustancia negra.

Áreas cerebrales	WT		cKO	
	PROMEDIO	± S.E.M.	PROMEDIO	± S.E.M.
mPFCx	170.6	± 34.9	116.6	± 36.9
Hp				
CA1	259.9	± 17.8	233.0	± 43.1
CA2-3	184.5	± 16.4	149.4	± 29.7
DG	99.8	± 12.8	86.0	± 15.8
CPu	333.5	± 64.9	241.4	± 37.3
Hyp	421.0	± 27.4	508.6	± 69.4
Sn	141.1	± 22.1	110.4	± 37.6

### Evaluación de la hipotermia inducida por el agonista 5-HT<sub>1B</sub> CP94,253: estudios *in vivo*

Para valorar la funcionalidad de los receptores de serotonina 5-HT<sub>1B</sub> *in vivo* evaluamos la hipotermia mediada tras la estimulación de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> con el agonista selectivo CP94,253 (10 mg/kg, i.p.). Los resultados de hipotermia inducida por CP94,253 de los animales cST β-catenina y WT fueron similares. (fig. 49). En este caso, el análisis mediante ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del genotipo [F(3,24)=40,64,  $p < 0,001$ ], del tiempo [F(4,96)=26,62,  $p < 0,001$ ], y de la interacción genotipo y tiempo [F(12,96)=7,56,  $p < 0,001$ ].



**Figura 49.** Hipotermia inducida por la administración del agonista del receptor 5-HT<sub>1B</sub> CP94,253 10 mg/kg en animales cST y WT para  $\beta$ -catenina. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls test. \*\*\* $p$  < 0,001 WT CP94,253 vs WT vehículo; ### $p$  < 0,001 cST CP94,253 vs cST vehículo. n=6-9 animales por grupo.

### 3.5. MODELO DE CORTICOSTERONA CRÓNICA EN ANIMALES cST $\beta$ -CATENINA

Tras observar la conducta de tipo antidepresiva, y los cambios moleculares y neuroquímicos, similares a los descritos en la terapia antidepresiva, presentes en los animales cST tras la estabilización de  $\beta$ -catenina, decidimos estudiar si estos cambios producían un fenotipo “resistente” a la depresión. Para ello, sometimos a estos animales cST a un modelo animal de depresión con gran validez como el modelo de administración crónica de corticosterona (Gourley & Taylor, 2009).

#### 3.5.1. CAMBIOS CONDUCTUALES

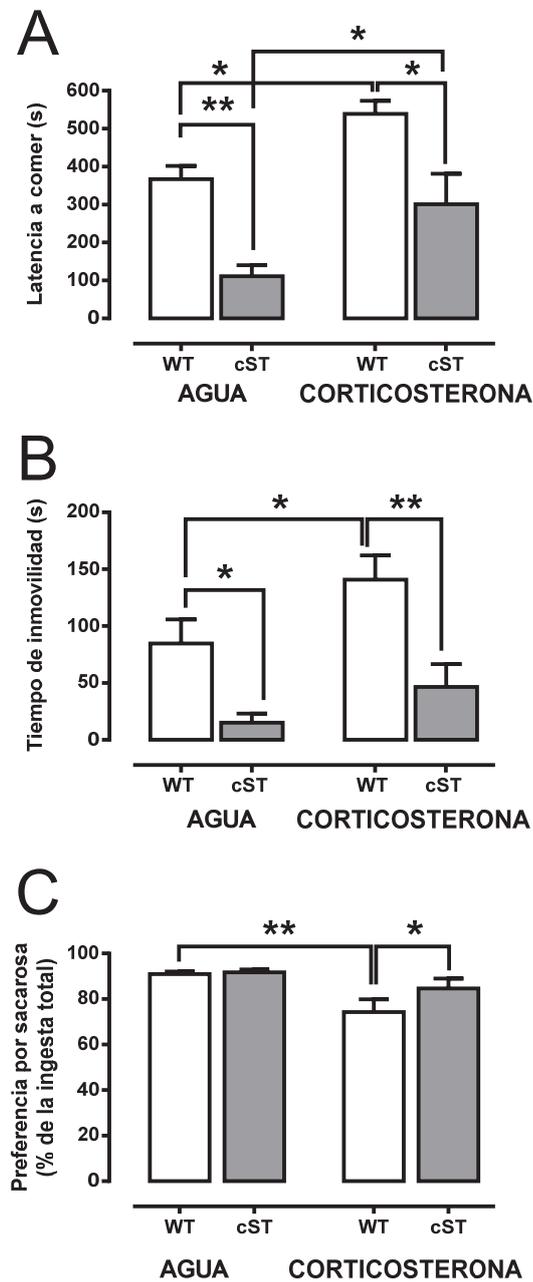
Un mes después de la inducción del animal transgénico, se administró a los animales la corticosterona en la bebida durante 4 semanas más. Transcurrido este tiempo, los animales fueron sometidos a diversos test conductuales —NSF, FST y test de la preferencia de sacarosa—, pudiendo así evaluar las conductas ansioso/depresivas de estos animales.

En el NSF (fig. 50A), el grupo cST mostró una menor latencia frente a los animales WT dos meses después de la inducción del animal transgénico (cST+AGUA:  $111,3 \pm 28,9$  vs WT+AGUA:  $366,8 \pm 35,2$  s,  $p < 0,01$ ). El tratamiento crónico con corticosterona indujo un incremento significativo del tiempo de latencia a comer tanto en el animal WT (WT+CORT:  $539,4 \pm 34,3$  vs WT+AGUA:  $366,8 \pm 35,2$  s,  $p < 0,05$ ), como en el cST  $\beta$ -catenina (cST+CORT:  $301,0 \pm 80,6$  vs cST+AGUA  $111,3 \pm 28,9$  s,  $p < 0,05$ ). La latencia en los animales cST sometidos al modelo de corticosterona crónica fue significativamente menor que en WT modelo (cST+CORT:  $301,0 \pm 80,6$  vs WT+CORT:  $539,4 \pm 34,3$  s,  $p < 0,05$ ). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del genotipo [ $F(1,30)=22,46$ ,  $p < 0,001$ ], y del modelo de corticosterona [ $F(1,30)=10,08$ ,  $p < 0,01$ ]. La evaluación de la ingesta durante en post-test mostró un efecto significativo del modelo de corticosterona [ $F(1,30)=13,21$ ,  $p < 0,01$ ], con una menor ingesta de comida en los animales wildtype tratados con corticosterona frente a sus respectivos vehículos ( $p < 0,01$ ).

Los resultados obtenidos en el FST (fig. 50B) van en línea con los anteriores. Los animales cST vehículo presentaron un tiempo de inmovilidad significativamente menor que sus respectivos WT (cST+AGUA:  $15,1 \pm 8,0$  vs WT+AGUA:  $84,8 \pm 21,1$ ;  $p < 0,05$ ). La administración crónica de corticosterona provocó un aumento significativo de los tiempos de inmovilidad en los animales WT (WT+CORT:  $140,9 \pm 21,2$  vs WT+AGUA:  $84,8 \pm 21,1$  s;  $p < 0,05$ ), sin alterar los tiempos en el animal cST+CORT. Este grupo cST+CORT presentó valores de inmovilidad significativamente inferiores que los tiempos de inmovilidad del grupo WT+CORT (cST+CORT:  $46,6 \pm 20,0$  vs WT+CORT:  $140,9 \pm 21,2$  s,  $p < 0,01$ ). El estudio estadístico mediante ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de las variables genotipo [ $F(1,32)=20,30$ ,  $p < 0,001$ ], y modelo de corticosterona [ $F(1,32)=5,81$ ,  $p < 0,05$ ].

Finalmente en el test de la preferencia por sacarosa (fig. 50C), se observó el efecto de la corticosterona en los animales WT los cuales presentaron estado anhedónico (WT+CORT:  $74,3 \pm 5,6$  vs WT+AGUA:  $91,0 \pm 1,1$  %,  $p < 0,01$ ). En cambio, en los animales cST el modelo de corticosterona no indujo cambios, mostrando una mayor preferencia por la sacarosa que el grupo WT tratado con corticosterona (cST+CORT:  $84,6 \pm 4,4$  vs WT+CORT:  $74,3 \pm 5,6$  %,  $p < 0,05$ ). En este caso, el análisis estadístico con ANOVA de

dos vías reflejó un efecto significativo en la variable modelo de corticosterona [ $F(1,32)=13,34, p < 0,001$ ].



**Figura 50.** Efecto sobre la conducta de tipo ansioso/depresiva de los animales cST  $\beta$ -catenina expuestos a la administración crónica de corticosterona como modelo de depresión. Conducta en el NSF (A), FST (B) y preferencia por sacarosa (C). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls test.  $p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ .  $n=6-10$  animales por grupo. Student  $t$ -test, datos no apareados.



# mTOR

## 4. SILENCIAMIENTO *IN VIVO* DE mTOR EN mPFCx. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL, NEUROQUÍMICA Y MOLECULAR

### 4.1. SILENCIAMIENTO AGUDO DE mTOR

#### 4.1.1. EFECTO CONDUCTUAL DEL SILENCIAMIENTO DE mTOR EN mPFCx.

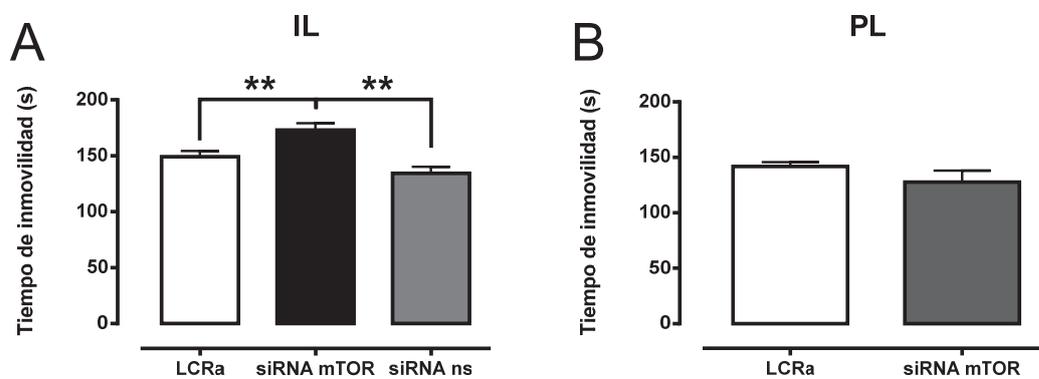
Los experimentos se realizaron en ratones de la cepa C57BL/6 a los que se administró mediante coordenadas estereotáxicas: A) una mezcla de dos siRNAs específicos contra mTOR, y B) vehículo (líquido cefalorraquídeo artificial, LCRA) en *corteza infralímbica* (IL) o en *corteza prelímbica* (PL). Además, se infundió siRNA no-sentido (siRNA ns), sólo en *corteza infralímbica*. Tras una única administración de los siRNAs contra mTOR, siRNA ns, o LCRA en estas áreas cerebrales se evaluó el comportamiento de tipo ansioso/depresivo de los animales mediante varios de los test conductuales más aceptados en la validación de fármacos ansiolíticos/antidepresivos.

#### *Test de la natación forzada (Forced Swimming Test, FST)*

24 h después de la administración de los siRNAs selectivos para mTOR en *corteza* IL, se observó un incremento del tiempo de inmovilidad en el test de la natación forzada (FST) con respecto al grupo control de LCRA (siRNA mTOR:  $173,0 \pm 6,2$  vs LCRA:  $149,2 \pm 5,2$  s;  $p < 0,01$ ), y al grupo de siRNA ns (siRNA mTOR:  $173,0 \pm 6,2$  vs siRNA ns:

134,4±5,9 s,  $p < 0,01$ ) (fig. 51A). El grupo siRNA ns no mostró diferencias significativas con respecto al grupo LCRA.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre al grupo infundido con las moléculas de siRNA para mTOR en la *corteza* PL y sus respectivos controles (LCRA, fig. 51B). En este experimento se prescindió del grupo siRNA ns, al no observarse, tras la infusión de los siRNAs contra mTOR, diferencias conductuales con los animales a los que se administró LCRA.



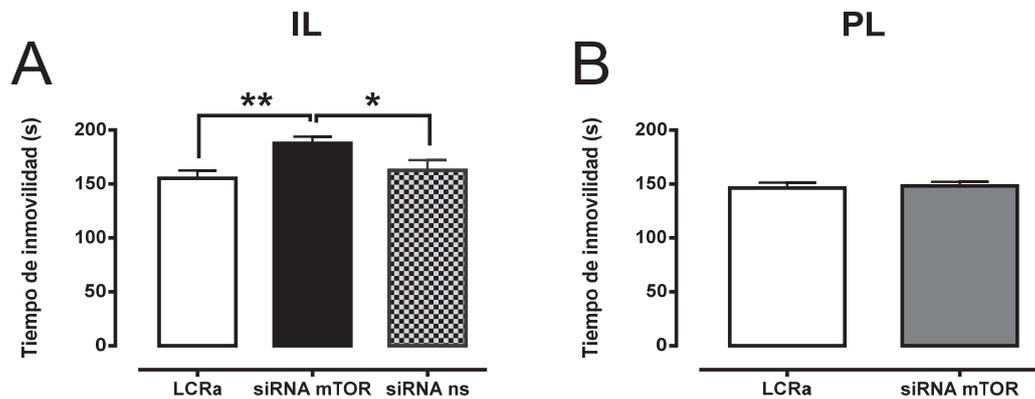
**Figura 51.** Efecto de la infusión de siRNAs contra mTOR en la mPFCx sobre la conducta de tipo depresiva evaluada mediante el FST. Aumento del tiempo de inmovilidad en animales tras el silenciamiento de mTOR en la *corteza* IL (A), y la ausencia de cambios conductuales tras la infusión de siRNAs para mTOR en la *corteza* PL (B). Resultados expresados como promedio±S.E.M. Prueba *t* Student, datos no pareados. \*\* $p < 0,01$ .  $n=5-9$  animales por grupo.

### *Test de suspensión de la cola (Tail Suspension Test, TST)*

48 h después de la infusión de los siRNA para mTOR y sus respectivos controles, se observó un incremento de la inmovilidad en los animales en los que se silenció mTOR en *corteza* IL, con respecto al grupo al que se le administró LCRA (siRNA mTOR: 187,7±6,3 vs LCRA: 155,2±7,4 s,  $p < 0,01$ ), y al grupo de siRNA ns (siRNA mTOR: 187,7±6,3 vs siRNA-ns: 162,7±9,4 s,  $p < 0,05$ ) (fig. 52A). El grupo siRNA ns no presentó diferencias significativas con respecto al grupo LCRA en el tiempo de inmovilidad.

Los animales a los que se administró los siRNAs para mTOR y sus respectivos controles en la *corteza* PL, no mostraron diferencias conductuales entre los diferentes

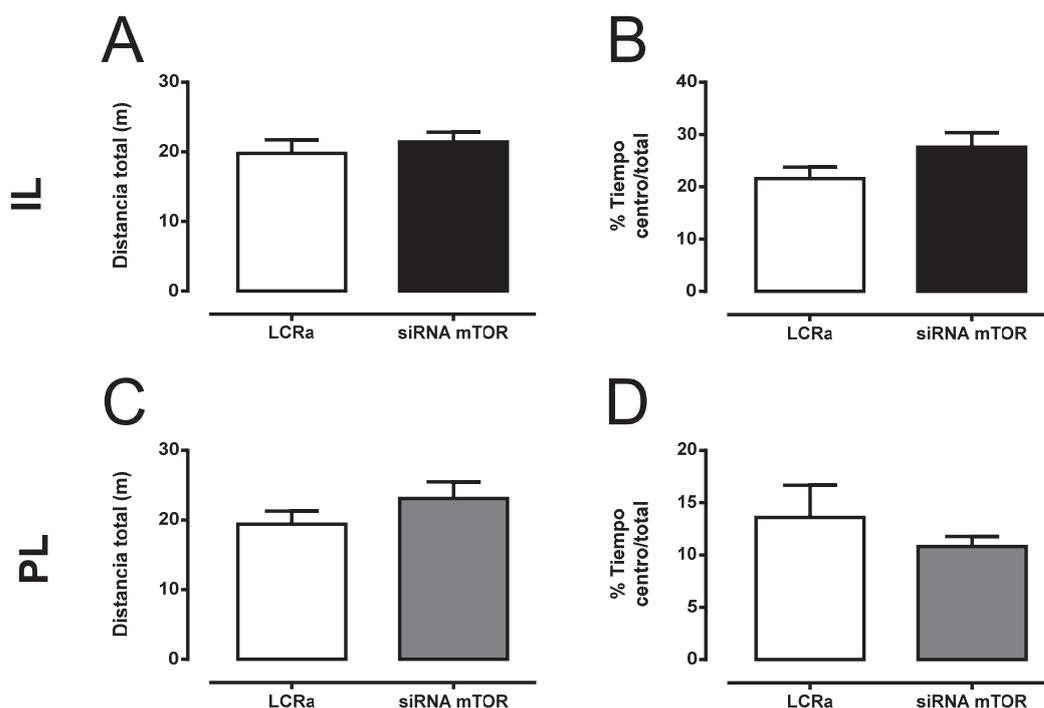
grupos (fig. 52B), como se describió en el test de la natación forzada. En este experimento se prescindió del grupo siRNA ns, al no observarse, tras la infusión de los siRNAs contra mTOR, diferencias conductuales con los animales a los que se administró LCRa.



**Figure 52.** Efecto de la infusión de siRNAs contra mTOR en la mPFCx sobre la conducta de tipo depresiva en el TST. Se observó un incremento del tiempo de inmovilidad en los animales en los que se silenció mTOR en la *corteza* IL (A), mientras que no se apreciaron efectos conductuales en los animales infundidos en la *corteza* PL (B). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. Prueba *t* Student, datos no pareados. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .  $n=5-9$  animales por grupo.

### *Test de campo abierto (Open Field test, OF)*

En una segunda tanda de animales, se realizó la evaluación de la actividad motora y la conducta ansiosa mediante el test de campo abierto. No se apreciaron cambios significativos entre los grupos en los que se silenció mTOR en la *corteza* IL (fig. 53A y B) o la PL (fig. 53C y D), y sus respectivos grupos control (en los que se infundió LCRa), en parámetros de movilidad, y de ansiedad evaluados en este test conductual. En este experimento, se prescindió del grupo siRNA ns, al no haber mostrado en el experimento previo diferencias conductuales con los animales a los que se administró LCRa.



**Figure 53.** Efecto de la infusión de siRNAs contra mTOR en la mPFCx sobre la actividad motora (A, C) y la conducta ansiosa (B, D) en el test de campo abierto. La infusión de siRNA mTOR en *corteza* IL (A, B) o *corteza* PL (C, D) no provocó cambios en la distancia total recorrida (A, C), ni en el tiempo central respecto al total (B, D). Resultados expresados como promedio±S.E.M. n=5-6 animales por grupo.

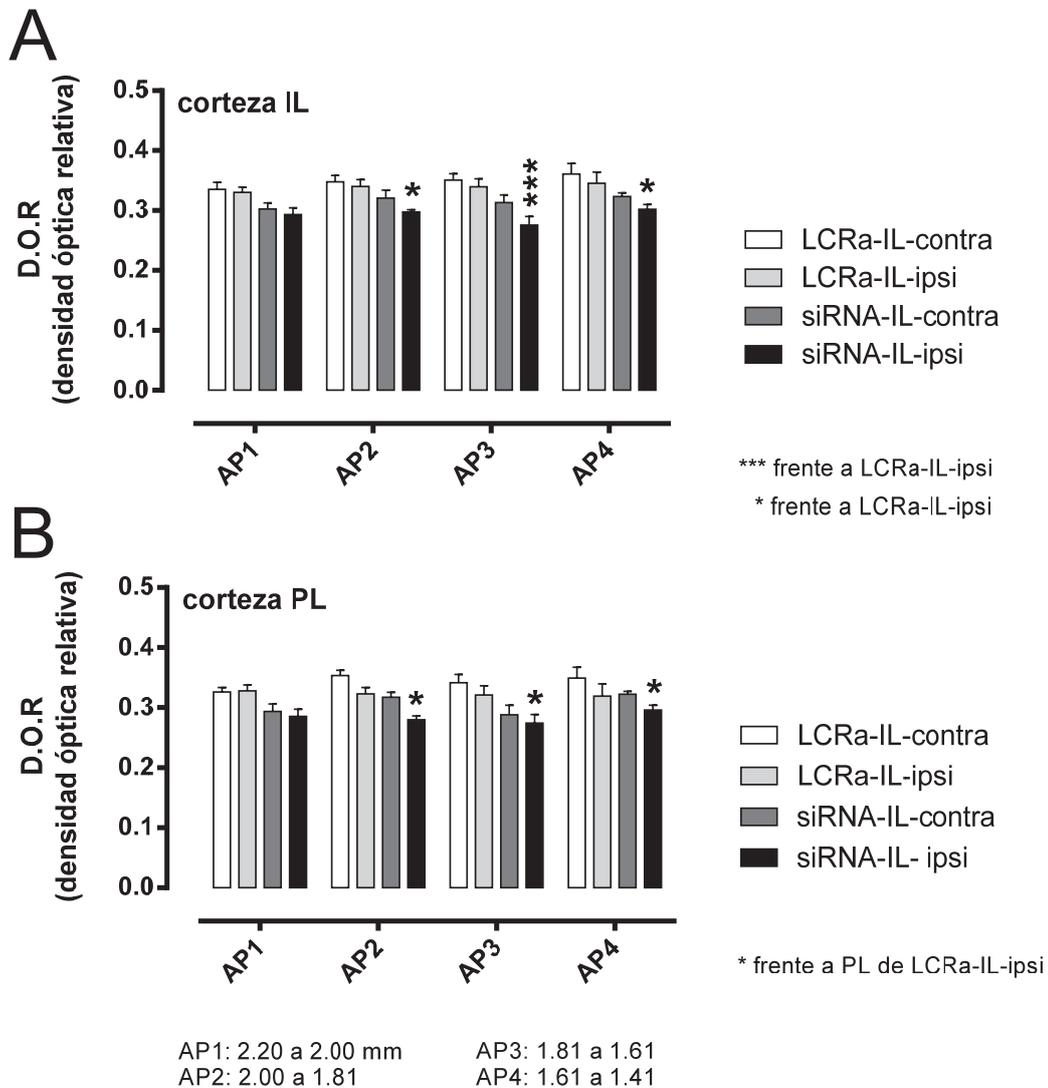
#### 4.1.2. CAMBIOS MOLECULARES ASOCIADOS AL SILENCIAMIENTO DE mTOR EN LA mPFCx.

Para determinar el correcto silenciamiento de mTOR, se llevó a cabo una hibridación *in situ* utilizando sondas específicas contra el mRNA que codifica para mTOR. También empleamos la misma técnica para comprobar si los niveles del mRNA de BDNF estaban afectados tras el silenciamiento de mTOR, tanto en la *corteza* IL, como en la *corteza* PL, así como en las diferentes subestructuras que conforman el *hipocampo*.

##### Expresión del mRNA de mTOR tras su silenciamiento en *corteza* IL y *corteza* PL

La infusión del siRNA para mTOR en *corteza infralímbica* (IL), produjo una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) de la expresión del mRNA para esta proteína en la región ipsilateral de la *corteza* IL, a 1.61-1.81 mm con respecto a Bregma (AP3, fig. 54A) y en las secciones anteroposteriores adyacentes (AP2 y AP4, fig. 54A;  $p < 0.05$ ). No se observaron

cambios en la expresión de mTOR en la región IL contralateral. Por ANOVA de dos vías, estos datos mostraron un efecto significativo del silenciamiento [ $F(3,59)=18,25, p < 0,001$ ].

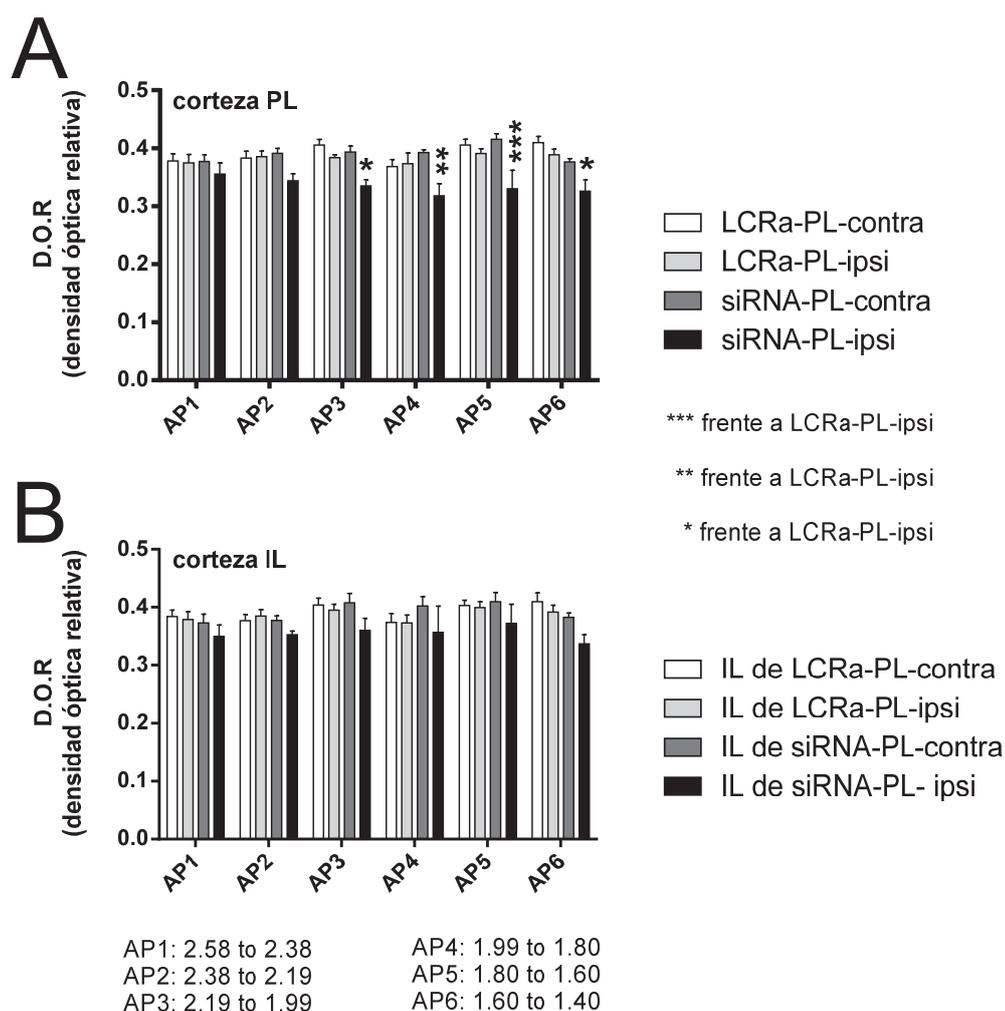


**Figura 54.** Efecto de la infusión de siRNAs contra mTOR en la corteza IL sobre la expresión del mRNA de mTOR en las *cortezas* IL (A) y PL (B). Los resultados se expresan como valores relativos de densidad óptica, promedio±S.E.M. ANOVA de dos vías, seguido por Newman-Keuls test. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs LCRa-IL-ipsi.  $n=5$  animales por grupo. LCRa-IL-contra (mRNA cuantificado en la *corteza* IL/PL contralateral de los animales infundidos LCRa en la *corteza* IL), LCRa-IL-ipsi (mRNA determinado en la *corteza* IL/PL ipsilateral de los animales infundidos LCRa en la *corteza* IL), siRNA-IL-contra (mRNA cuantificado en la *corteza* IL/PL contralateral de los animales infundidos siRNA mTOR en la *corteza* IL), y siRNA-IL-ipsi (mRNA cuantificado en la *corteza* IL/PL ipsilateral de los animales infundidos siRNA mTOR en la *corteza* IL). Contra: lado contralateral al de infusión; ipsi: lado ipsilateral al de infusión.

La infusión del siRNA para mTOR en *corteza* IL también produjo la disminución de expresión de mRNA para mTOR en la región ipsilateral de la *corteza* PL en el nivel anteroposterior AP3 ( $p < 0,05$ ), así como en las regiones adyacentes anterior AP2 y posterior AP4 ( $p < 0,05$ ; fig. 54B); sin cambios en la región contralateral. El análisis de varianza por ANOVA de dos vías con los datos de la expresión de mTOR en *corteza* PL mostró un efecto significativo del silenciamiento [ $F(3,64)=16,28, p < 0,001$ ].

Tras la infusión en la *corteza prefrontal (PL)* de siRNAs para mTOR se observó una disminución significativa en los niveles del mRNA de mTOR en la *corteza* PL infundida con el *pool* de siRNAs (siRNA-PL-ipsi), respecto a la misma área infundida con LCRa (LCRa-PL-ipsi) en las secciones coronales AP3, ( $p < 0,05$ ), AP4 ( $p < 0,01$ ), AP5 ( $p < 0,001$ ) y AP6 ( $p < 0,05$ ) (Fig. 55A). No se observaron diferencias en la expresión de mTOR en la región contralateral. Mediante ANOVA de dos vías de estos datos se observó un efecto significativo del silenciamiento [ $F(3,85)=22,64, p < 0,001$ ].

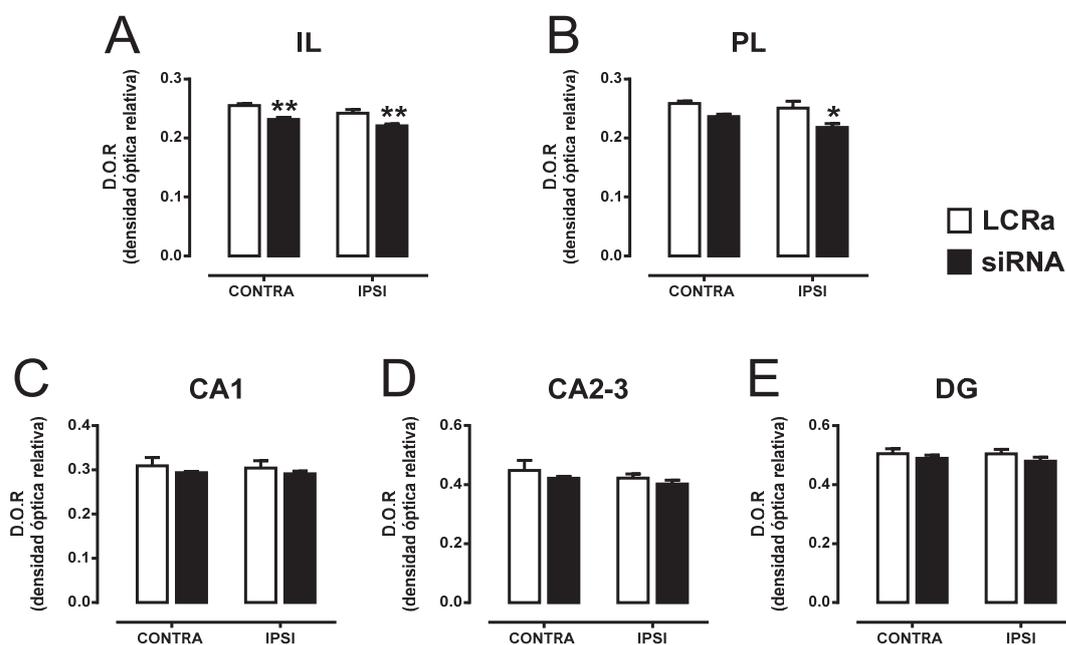
Los niveles de expresión de mTOR en la *corteza* IL no se vieron modificados de forma significativa en los animales en los que se infundió siRNAs contra mTOR en la *corteza* PL (fig. 55B). Por ANOVA de dos vías, estos datos revelaron un efecto significativo del silenciamiento [ $F(3,88)=7,47, p < 0,001$ ].



**Figura 55.** Efecto de la administración de siRNA contra mTOR en la corteza PL sobre la expresión del mRNA de mTOR en las *cortezas* PL (A) e IL (B). Los resultados se expresan como valores relativos de densidad óptica. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls test. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. LCRa-PL-ipsi.  $n=3-5$  animales por grupo. LCRa-PL-contra (mRNA cuantificado en la *corteza* PL/IL contralateral de los animales infundidos LCRa en la *corteza* PL), LCRa-PL-ipsi (mRNA determinado en la *corteza* PL/IL ipsilateral de los animales infundidos LCRa en la *corteza* PL), siRNA-PL-contra (mRNA cuantificado en la *corteza* PL/IL contralateral de los animales infundidos siRNAs mTOR en la *corteza* PL), y siRNA-PL-ipsi (mRNA cuantificado en la *corteza* PL/IL ipsilateral de los animales infundidos siRNAs mTOR en la *corteza* PL). Contra: lado contralateral al de infusión; ipsi: lado ipsilateral al de infusión.

## Expresión del mRNA de BDNF tras el silenciamiento de mTOR en las *cortezas* IL y PL

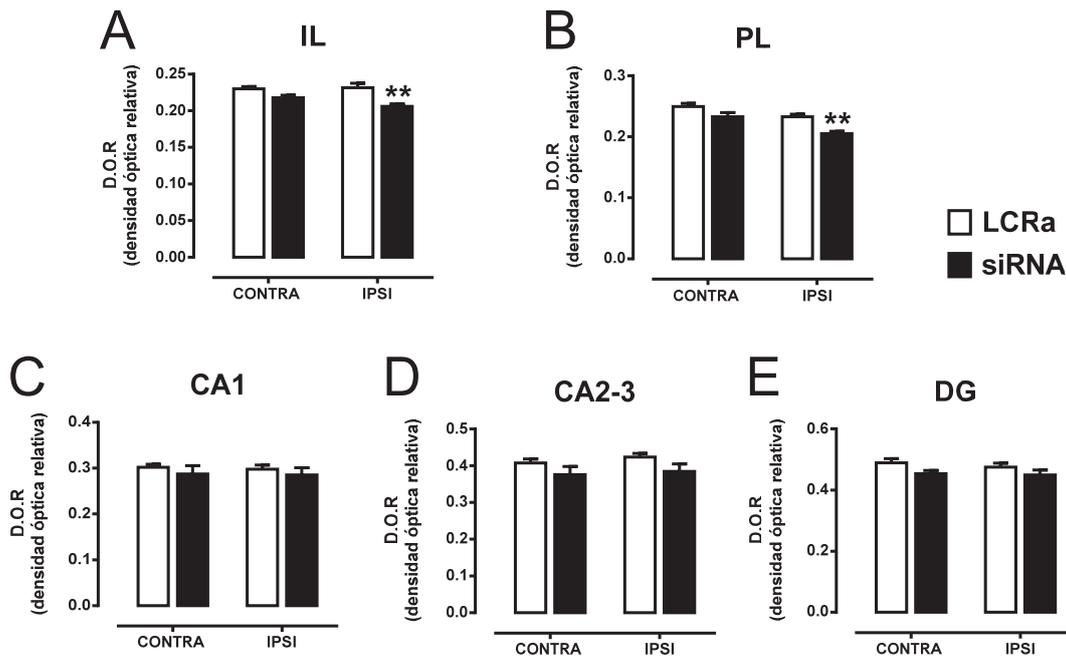
Tras confirmar la disminución de los niveles de mRNA de mTOR en las regiones silenciadas de la mPFCx, se evaluaron los niveles del mRNA de BDNF en diferentes áreas cerebrales como la mPFCx (*cortezas* IL y PL), y el *hipocampo* (áreas CA1 y CA2-CA3, y giro dentado) mediante hibridación *in situ* sobre secciones coronales.



**Figura 56.** Efecto de la infusión de siRNAs contra mTOR en la *corteza* IL sobre la expresión de BDNF en diferentes áreas cerebrales: *corteza* IL (A), *corteza* PL (B), área CA1 del *hipocampo* (C), áreas CA2-3 del *hipocampo* (D) y giro dentado del *hipocampo* (E). Los resultados se expresan como valores relativos de densidad óptica; promedio±S.E.M. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls test. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs LCRa.  $n=5$  animales por grupo. Contra: lado contralateral al de infusión; ipsi: lado ipsilateral al de infusión.

En los animales en los que se realizó el **silenciamiento unilateral de mTOR en la *corteza* IL** se observó un descenso significativo de la expresión de BDNF en la *corteza* IL ipsilateral ( $p < 0,01$ ), y contralateral ( $p < 0,01$ ) (fig. 56A). En la *corteza* PL se redujo la expresión de BDNF tan solo en el lado ipsilateral ( $p < 0,05$ ), no observándose cambios significativos en el contralateral (fig. 56B). La expresión en *hipocampo* no se vio modificada tras el silenciamiento de mTOR en la *corteza* IL (figs. 56C, D y E). Mediante

ANOVA de dos vías los valores obtenidos en *corteza* IL mostraron un efecto significativo de las variables lado de infusión [ $F(1,16)=7,49, p < 0,05$ ], y silenciamiento [ $F(1,16)=26,98, p < 0,001$ ]. En la *corteza* PL, un ANOVA de dos vías también mostró un efecto significativo de la variable silenciamiento [ $F(1,16)=13,86, p < 0,01$ ].



**Figura 57.** Efecto de la infusión de siRNAs contra mTOR en la *corteza* PL sobre la expresión de BDNF en *corteza* IL (A), *corteza* PL (B), área CA1 del *hipocampo* (C), áreas CA2-3 del *hipocampo* (D) y giro dentado del *hipocampo* (E). Los resultados se expresan como valores relativos de densidad óptica, promedio±S.E.M. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls test. \*\* $p < 0,01$  vs LCRa.  $n=5$  animales por grupo. Contra: lado contralateral al de infusión; ipsi: lado ipsilateral al de infusión.

Por otro lado, en los animales en los que se realizó el **silenciamiento unilateral de mTOR en la corteza PL** se apreció una disminución de la expresión de BDNF en la *corteza* IL ipsilateral ( $p < 0,01$ ; fig. 57A), y en la *corteza* PL ipsilateral ( $p < 0,01$ ), sin cambios en las áreas contralaterales (fig. 57B). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de BDNF en *hipocampo* (figs. 57C, D y E). El ANOVA de dos vías con los valores obtenidos en la *corteza* IL mostró un efecto significativo de la variable silenciamiento [ $F(1,16)=20,84, p < 0,001$ ]. En la *corteza* PL, mediante ANOVA de dos vías se observó un efecto significativo de las variables lado de infusión [ $F(1,16)=18,41, p <$

0,001], y silenciamiento [ $F(1,16)=18,41, p < 0,001$ ]. En las áreas CA2-3 del *hipocampo*, se observó un efecto significativo del silenciamiento [ $F(1,16)=4,64, p < 0,05$ ]. También el giro dentado del *hipocampo* presentó un efecto significativo de la variable silenciamiento [ $F(1,16)=5,29, p < 0,05$ ].

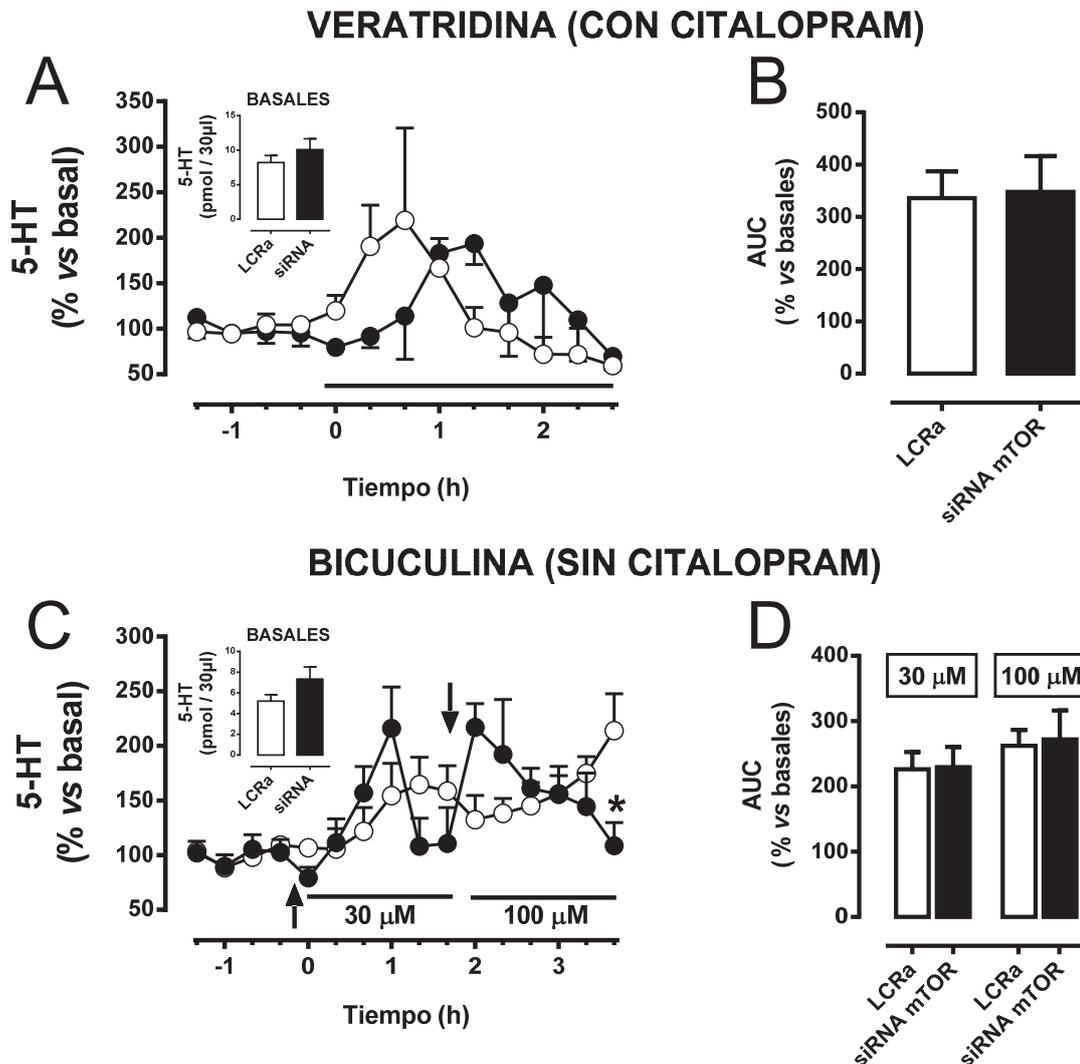
#### **4.1.3. MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE SEROTONINA EN NÚCLEO DORSAL DEL RAJE TRAS EL SILENCIAMIENTO DE mTOR EN LA CORTEZA IL**

Con el fin de aclarar los mecanismos que subyacen a la conducta de tipo depresiva observada tras el silenciamiento de mTOR, evaluamos el estado del sistema serotoninérgico tras la administración aguda del *pool* de siRNAs contra mTOR en *corteza* IL, a nivel del *núcleo dorsal del rafe* (DRN). La elección de este sistema monoaminérgico cerebral se centró principalmente en dos razones: la primera se basa en que parte de las neuronas piramidales de la *corteza* IL proyectan directamente al DRN, y la segunda, se basa en la implicación de este sistema de neurotransmisión en la patología.

Los niveles basales del neurotransmisor serotonina no mostraron diferencias entre los animales con mTOR silenciado en *corteza* infralímbica y los animales control (LCRa) (figs. 58A y C, insertos). Además, la infusión intra-DRN del inhibidor de canales de sodio veratridina no se vio modificada por el silenciamiento de mTOR en *corteza* infralímbica (figs. 58A y B).

La infusión de bicuculina intra-DRN 48 h después del silenciamiento de mTOR en *corteza* IL, produjo un diferente patrón de liberación de serotonina tras la infusión de este antagonista GABA<sub>A</sub> a una concentración de 100  $\mu$ M, sin cambios significativos tras la administración de 30  $\mu$ M (fig. 58C). Así, la infusión de bicuculina 100  $\mu$ M mostró un rápido pico de liberación de serotonina en los animales silenciados para mTOR en IL, mientras que en los animales control, el incremento de la liberación de serotonina fue mantenido. El estudio estadístico mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas en los experimentos de microdiálisis *in vivo*, tras la administración de bicuculina 30  $\mu$ M, mostró un efecto significativo del tiempo [ $F(5,35)=5,26, p < 0,01$ ], y de la interacción silenciamiento y tiempo [ $F(5,35)=2,94, p < 0,05$ ]. El análisis mediante ANOVA de dos vías del efecto de la infusión de 100  $\mu$ M bicuculina, presentó un efecto significativo de la

interacción silenciamiento x tiempo [ $F(5,35)=7,81$ ,  $p < 0,001$ ]. En ninguna de las condiciones se observaron diferencias en el área bajo la curva del perfil de liberación de serotonina (figs. 58 A y C).



**Figure 58.** Respuesta al silenciamiento agudo de mTOR en la *corteza* IL sobre la liberación de 5-HT. Valores obtenidos tras la administración de veratridina (A, B) y bicuculina (C, D), frente al tiempo. Respuesta al silenciamiento agudo de mTOR en la *corteza* IL sobre los niveles basales de 5-HT (insertos en A y C). Valores del área bajo la curva del nivel de serotonina para los valores tras la infusión de veratridina (B) y de bicuculina (D). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. ANOVA de dos vías, seguida de Bonferroni test. \* $p < 0,05$  vs grupo control.  $n=4-5$  animales por grupo.

## **4.2. SILENCIAMIENTO SUBCRÓNICO DE mTOR**

### **4.2.1. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE mTOR EN *CORTEZA IL* SOBRE LA CONDUCTA**

Después del silenciamiento subcrónico (al menos cinco días) de infusión del *pool* de siRNAs específicos contra mTOR en *corteza IL*, ambos grupos de animales (controles y siRNA mTOR), fueron sometidos a una batería de test comportamentales (fig. 14, Material y Métodos), con el fin de verificar la influencia de la reducción de los niveles de mTOR en el fenotipo conductual ansioso/depresivo.

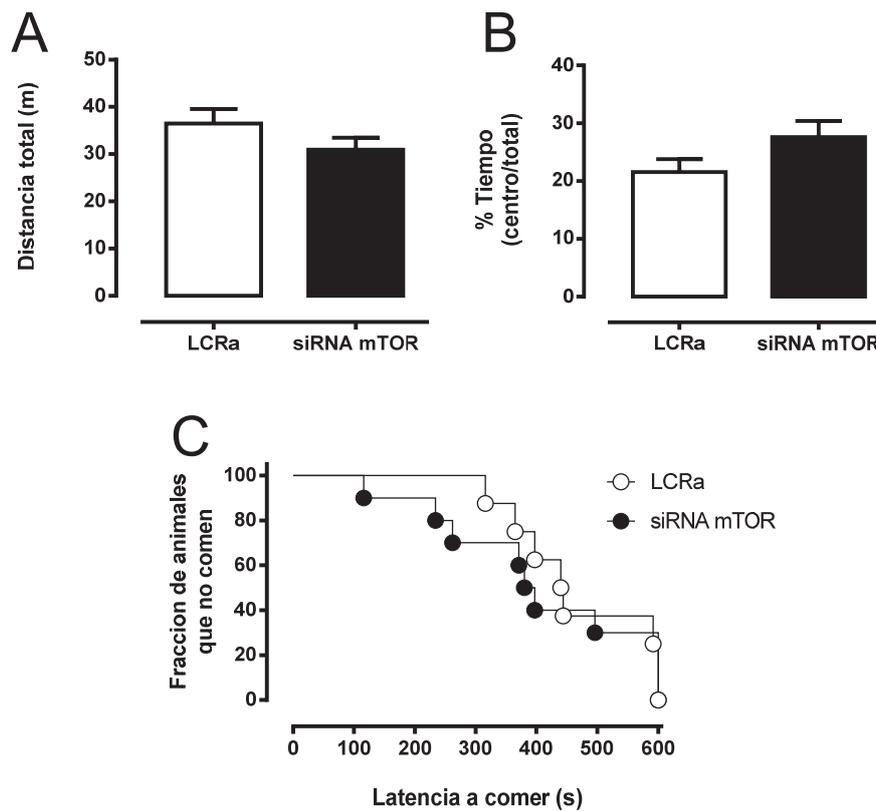
#### ***CONDUCTA DE TIPO ANSIOSA***

##### ***Test de campo abierto (Open Field test, OF)***

Cinco días después de la cirugía, se evaluó tanto la actividad motora (fig. 59A), como la conducta de tipo ansiosa (porcentaje de tiempo de permanencia en el centro del campo frente al total (fig. 59B), no observándose ninguna diferencia significativa en los parámetros estudiados.

##### ***Novelty Supressed Feeding test (NSF)***

Con este test se quiso evaluar la conducta ansiosa con componente emocional (tipo ansioso/depresiva). Al octavo día de la infusión de los siRNAs para mTOR en *corteza IL*, se sometió a los animales a este test después de 24h de privación de alimento. Este test no mostró diferencias significativas entre los grupos en el tiempo de latencia (fig. 59C), parámetro característico a determinar. Tampoco se observaron diferencias en la ingesta de comida en sus propias jaulas evaluado durante 5 min después del test.

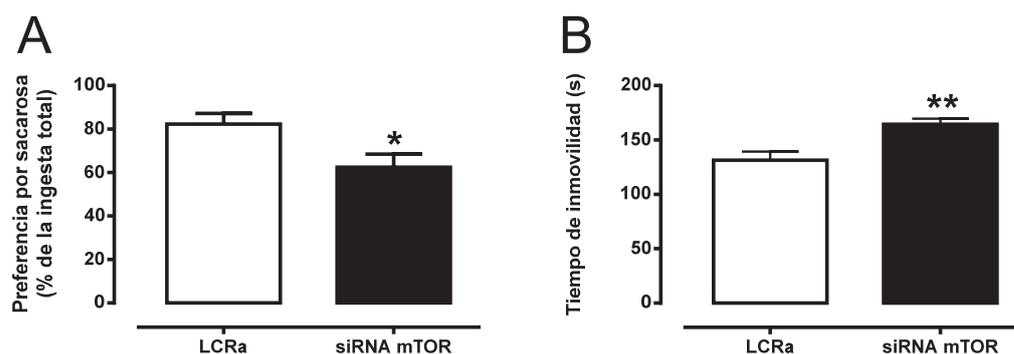


**Figure 59.** Efecto de la infusión subcrónica de siRNAs contra mTOR en la *corteza* IL sobre la conducta de tipo ansioso. Actividad motora (A), y porcentaje de tiempo en el centro del campo (B) evaluados mediante el OF. Tiempos de latencia a comer en el NSF, representación en forma de curvas de supervivencia donde se puede apreciar para cada tiempo, el número de animales que mordieron el pellet (C). Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M. n=8-10 animales por grupo.

## CONDUCTA DE TIPO DEPRESIVA

### *Test de la preferencia de sacarosa e ingesta de sacarosa*

El estado anhedónico, uno de los síntomas más claros en la patología depresiva, se evaluó pasados seis días del comienzo de la infusión de las moléculas de siRNAs en la *corteza* IL. Los animales en los que se infundió mTOR presentaron una reducción significativa de la preferencia por sacarosa (siRNA mTOR: 62,41 $\pm$ 6,1 vs LCRa: 82,31 $\pm$ 4,9%,  $p < 0,05$ ) (fig. 60A), y una clara tendencia sobre la ingesta de la misma ( $p = 0,06$ ), con respecto a sus controles.



**Figure 60.** Influencia de la infusión subcrónica de siRNAs contra mTOR sobre el estado de tipo depresivo, evaluado mediante el porcentaje de preferencia de sacarosa frente a ingesta total de líquido (conducta anhedónica) (A), y el tiempo de inmovilidad en el TST (B). Resultados expresados como promedio±S.E.M. Prueba *t* de Student de datos no pareados. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs LCRa.  $n=7-10$  animales por grupo.

#### *Test de suspensión de la cola (Tail Suspension test, TST)*

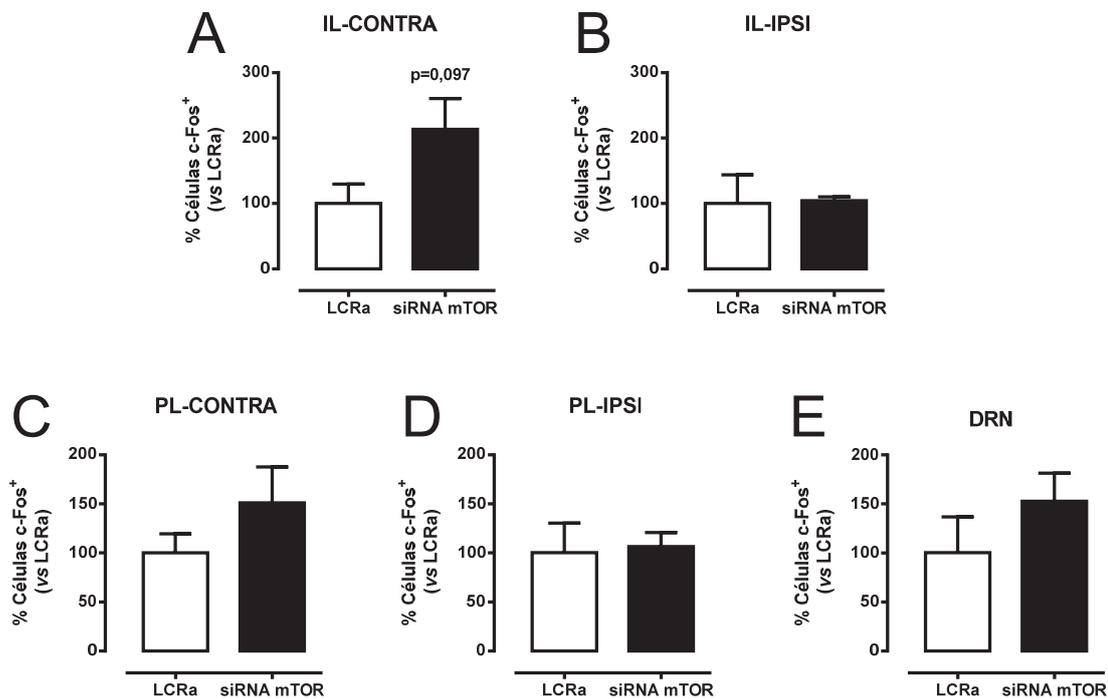
El comportamiento de tipo depresivo, carente de componente ansioso, fue evaluado a través del TST, test ampliamente utilizado para valorar los efectos antidepresivos que presentan ciertos compuestos. En este caso, el parámetro a determinar es el tiempo de inmovilidad de los animales. En el noveno día de tratamiento se realizó el test donde los ratones infundidos con las moléculas de siRNA manifestaron un mayor tiempo de inmovilidad frente a sus controles (siRNA mTOR:  $164,5 \pm 5,1$  vs LCRa:  $131,4 \pm 7,9$  s,  $p < 0,01$ ) (fig. 60B).

#### **4.2.2. CAMBIOS MOLECULARES TRAS EL SILENCIAMIENTO SUBCRÓNICO DE mTOR EN LA CORTEZA IL**

##### **Efecto de la infusión subcrónica de siRNAs para mTOR en corteza IL sobre la expresión de c-Fos**

La expresión de genes de acción temprana es ampliamente utilizada como marcadores moleculares para activación de neuronas que sufren cambios plásticos, como aquellas implicadas en la formación de la memoria o implicadas en la respuesta a estrés. Por ello se escogió la expresión de c-Fos, para establecer una conexión entre el comportamiento de nuestros animales con cambios celulares.

El análisis de la inmunoreactividad de c-Fos se realizó tanto en la mPFCx, *corteza* IL y PL, como en el DRN, por ser esta última estructura un área de proyección de la anterior. Ninguna de las áreas estudiadas mostró diferencias estadísticamente significativas (fig. 61). Cabe destacar el incremento en el número de células positivas para c-Fos ( $p = 0,09$ ) entre siRNA mTOR en la IL-contra vs LCRa en la IL-contra, indicando una tendencia al alza en las células positivas para esta proteína (fig. 61A).

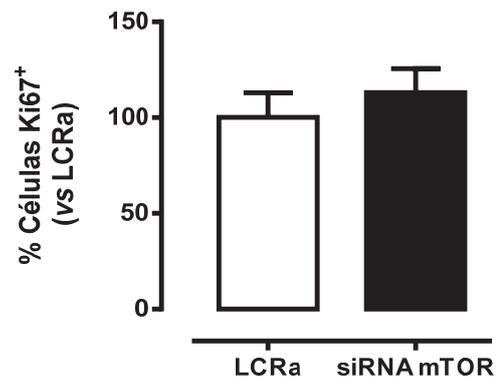


**Figura 61.** Efecto de la administración subcrónica de siRNAs contra mTOR en la *corteza* IL sobre la expresión de c-Fos en: *corteza* IL contralateral (A); *corteza* IL ipsilateral (B); *corteza* PL contralateral (C); *corteza* PL ipsilateral (D); y *núcleo dorsal del rafe* (E). Resultados expresados como promedio±S.E.M. Prueba *t* de Student de datos no pareados.  $n=3-5$  animales por grupo. Contra: contralateral al sitio de infusión; ipsi: ipsilateral al sitio de infusión.

### Efecto de la administración subcrónica de siRNAs contra mTOR en la *corteza* IL sobre la proliferación hipocampal

Con el objetivo de valorar la influencia del silenciamiento de mTOR en la *corteza* IL sobre la neurogénesis hipocampal, cuya disminución se ha asociado con la etiología de la depresión (Duman et al., 1997), se llevó a cabo una inmunohistoquímica para cuantificar el número de células positivas para la proteína nuclear Ki67 en la zona subgranular del giro

dentado del *hipocampo*. Como podemos observar en la figura 62, el silenciamiento subcrónico de mTOR en la *corteza* IL no mostró ninguna variación significativa en la proliferación hipocampal.



**Figura 62.** Efecto de la infusión subcrónica de siRNAs contra mTOR sobre la expresión de Ki67 en el giro dentado del hipocampo. Resultados expresados como promedio±S.E.M. n=5-6 animales por grupo.

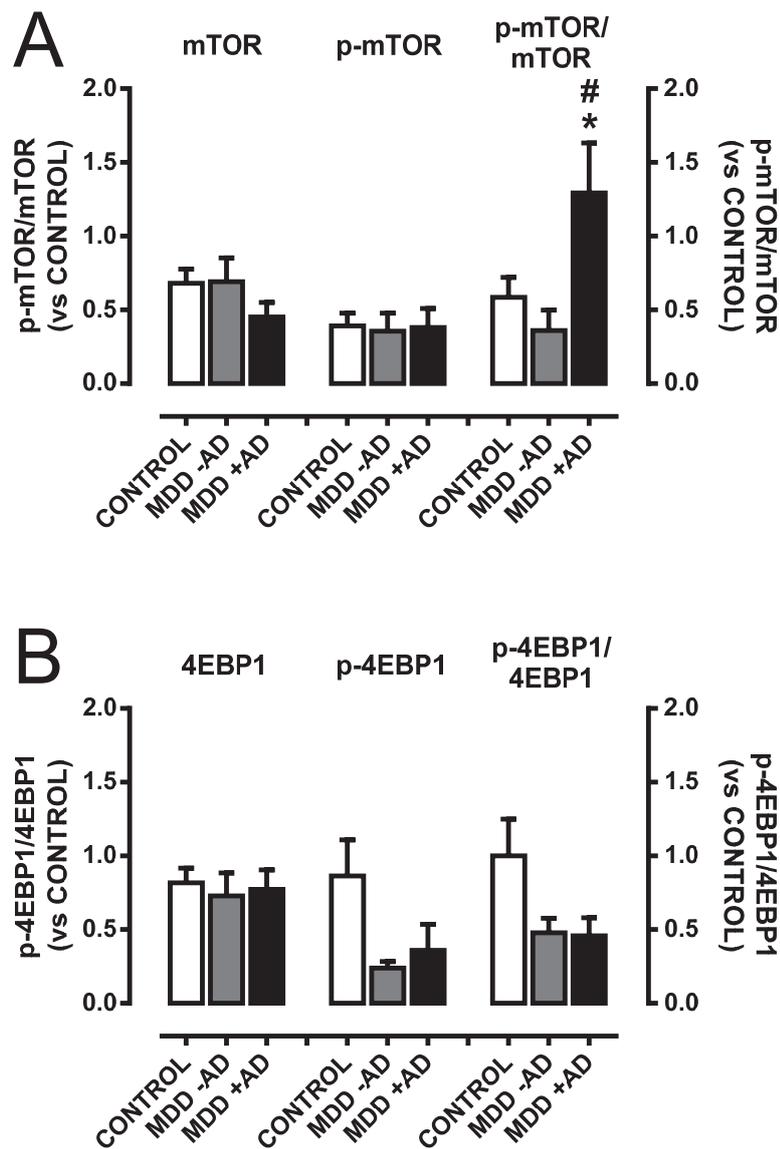
## 5. ESTUDIO DE LA VÍA DE mTOR EN MUESTRAS *POSTMORTEM* DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE DEPRESIÓN

El tercer objetivo de este trabajo de tesis fue comprobar el estado de la vía de mTOR en *corteza frontal* de cerebro postmortem de pacientes suicidas. Los pacientes se diferenciaron entre tratados (MDD +AD) y sin tratar (MDD -AD), los cuales no presentaron trazas de fármacos antidepresivos en sangre tras los estudios forenses. Las características en base a las cuales se realizó el macheo de controles y sujetos se presentan en la tabla 1 (apartado 1.3, Material y Métodos).

### 5.1. ESTUDIO MEDIANTE WESTERN BLOT DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA VÍA DE mTOR

El análisis de la cantidad de la proteína mTOR y su forma fosforilada evaluada mediante experimentos de *western blot*, no mostró diferencias entre los diferentes grupos estudiados (fig. 63A). En cambio, se observó un aumento significativo de la actividad de la vía determinada por el ratio fosfo-mTOR (p-mTOR)/mTOR en el grupo MDD +AD respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ), así como respecto al grupo de pacientes diagnosticados de depresión mayor sin tratamiento (MDD -AD) ( $p < 0,05$ ) (fig. 63A). El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo de la variable tratamiento [ $F(2,24)=4.58, p < 0,05$ ].

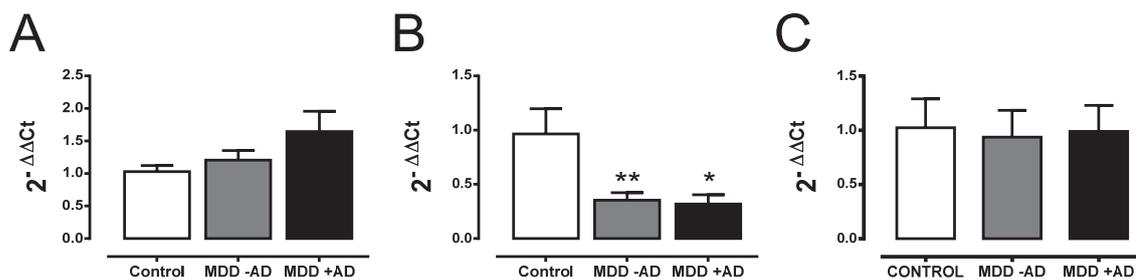
Por otro lado, en el estudio del efector de la vía 4EBP1, así como de la forma fosforilada de éste (fig. 63B), el análisis de los grupos MDD -AD y MDD +AD con sus respectivos controles macheados, no mostró diferencias significativas.



**Figura 63.** Niveles de expresión de las proteínas mTOR y 4EBP1 y sus formas fosforiladas en *corteza frontal* de muestras de cerebro *postmortem*. (A) Niveles de expresión de mTOR, phospho-mTOR y su ratio. Aumento del ratio p-mTOR/mTOR en suicidas tratados con antidepresivos (MDD +AD), respecto a controles. ANOVA de una vía seguido de Newman-Keuls *post-hoc* test. \* $p < 0,05$  vs CONTROL, # $p < 0,05$  vs MDD -AD. (B) Niveles de expresión de 4EBP1, p-4EBP1 y su ratio. Resultados expresados como promedio $\pm$ S.E.M.  $n=6-22$  muestras por grupo.

## 5.2. ESTUDIO MEDIANTE qPCR DE LA EXPRESIÓN DE mRNA DE ELEMENTOS DE LA VÍA DE mTOR

En estas muestras también se estudió el estado de expresión del mRNA de mTOR, 4EBP1 y p70S6K en el estado patológico, y su regulación en individuos tratados con antidepresivos mediante qPCR. El análisis del principal efector de la vía, mTOR, de igual forma que su efector p70S6K, no presentaron diferencias entre los grupos analizados (figs. 64A y C). Por otro lado, los niveles del mRNA de 4EBP1, efector *downstream* a mTOR, se encontraron disminuidos en ambos grupos de sujetos diagnosticados de MDD respecto a los controles (MDD -AD:  $0,35 \pm 0,23$  vs CONTROL,  $p < 0,01$ ; y MDD +AD:  $0,319 \pm 0,09$  vs CONTROL,  $p < 0,05$ ) (fig. 64B). El análisis de varianza mediante ANOVA de una vía, reveló un efecto significativo del tratamiento [ $F(2,24)=5.22$ ,  $p < 0,05$ ].



**Figura 64.** Niveles de expresión del mRNA de mTOR (A), 4EBP1 (B) y p70S6K (C), en muestras *postmortem* de corteza frontal de individuos diagnosticados de depresión sin (MDD -AD), y con (MDD +AD) tratamiento con antidepresivos. Resultados expresados como promedio  $\pm$  S.E.M. ANOVA de una vía seguido de un Newman-Keuls test. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  versus CONTROL. n=6-22 muestras por grupo.



## **V. DISCUSIÓN**



# **$\beta$ -CATENINA**

## **1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS INDUCIBLES PARA $\beta$ - CATENINA EN PROGENITORAS DE *HIPOCAMPO***

El papel de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en la formación, mantenimiento y función del SNC es bien conocido (Inestrosa & Varela-Nallar, 2015). Por otro lado, tanto su implicación en los trastornos del estado de ánimo, concretamente en depresión mayor (Karege et al, 2012a; Pilar-Cuellar et al, 2014; Sani et al, 2012), como su papel en el efecto antidepresivo (Duman & Voleti, 2012; Madsen et al, 2003; Mostany et al, 2008; Pascual-Brazo et al, 2012; Pilar-Cuellar et al, 2014; Pilar-Cuellar et al, 2012), ha sido descrito previamente.

Las células madre neurales no sólo juegan un papel importante en aspectos de la fisiología cerebral sino que también están implicadas en varias condiciones patológicas como los trastornos del estado de ánimo (Zhao et al, 2008). Hasta la fecha, escasos estudios muestran cómo la vía de señalización de Wnt, y en especial  $\beta$ -catenina, regulan tanto la proliferación como la neurogénesis en cerebro adulto, controlando el destino final de este tipo celular en concreto (Lie et al, 2005). Esta vía de Wnt/ $\beta$ -catenina aparece activada en nichos proliferativos en respuesta a fármacos o compuestos con acción antidepresiva (Mostany et al, 2008; Pascual-Brazo et al, 2012). Por ello, hemos querido estudiar el papel

de la modulación de  $\beta$ -catenina en células progenitoras de *hipocampo* sobre las conductas de tipo ansioso/depresivo.

En esta tesis hemos utilizado la tecnología Cre-loxP, mediante la cual la delección específica de lugar está mediada por la enzima Cre recombinasa, que reconoce y corta en regiones específicas loxP. En nuestro caso, esta enzima es expresada bajo la acción del promotor del transportador de glutamato/aspartato en astrocitos (GLAST) (Mori et al, 2006). De este modo, hemos realizado la delección inducible del gen de la  $\beta$ -catenina (cKO) (Brault et al, 2001), o la eliminación del exón 3 del gen de la  $\beta$ -catenina para la estabilización de esta proteína (cST) (Harada et al, 1999), en células que expresan GLAST. Los residuos Ser 33, Ser 37 y Thr 41 son fosforilados por la enzima GSK-3 $\beta$  para la degradación de  $\beta$ -catenina (Winston et al, 1999), por lo que la eliminación de estos sitios de fosforilación promueve la estabilización de  $\beta$ -catenina en el citoplasma y posterior translocación al núcleo, activando los factores de transcripción Tcf/Lef (Hreckulak et al, 2016; Polakis, 1999).

Mediante la línea de ratones Rosa26 hemos comprobado la expresión específica de la enzima CreER, mediante el marcaje con X-gal, dependiente de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, en la zona subgranular del *hipocampo*, y no en otras áreas cerebrales como la *corteza*. Esto confirma que la recombinación es eficiente en progenitoras neurales de cerebro adulto (Mori et al, 2006; Ninkovic et al, 2007), ya que este transportador de glutamato presenta una elevada expresión en las células madre neurales (*neural stem cells*, NSCs) (Mich et al, 2014), mientras que su expresión en astrocitos y glía radial es baja (Jungblut et al, 2012). En este estudio no hemos comprobado la expresión de  $\beta$ -galactosidasa en la zona subventricular (SVZ) —otra de las áreas más relevantes en proliferación en cerebro adulto—, aunque no se han descrito cambios en proliferación asociados a la conducta de tipo depresivo en modelos animales de depresión como el de administración crónica de corticosterona (Siopi et al, 2016), o en pacientes diagnosticados de depresión (Maheu et al, 2015), ni asociado al efecto antidepresivo de fármacos (Santarelli et al, 2003; Surget et al, 2008).

En las dos primeras secciones de este trabajo se estudió en ratones transgénicos condicionales el efecto de la inactivación o la estabilización de  $\beta$ -catenina, elemento clave en la vía canónica de la señalización por Wnt/ $\beta$ -catenina, en la zona subgranular del giro

dentado del *hipocampo* un mes después de la inducción del animal transgénico. Este periodo de tiempo se ha elegido por corresponderse con el tiempo necesario para el proceso de maduración neuronal (Goncalves et al, 2016), así como para la instauración de la acción antidepresiva de los fármacos de uso más habitual en clínica (Santarelli et al, 2003). En este trabajo se muestran por primera vez los efectos y consecuencias de la manipulación genética de  $\beta$ -catenina en progenitoras del giro dentado del *hipocampo* en animal adulto, sobre parámetros de conducta de tipo depresivo y ansioso, marcadores de proliferación y neuroplasticidad, así como sobre el sistema serotoninérgico.

### **Expresión de $\beta$ -catenina en ratones cKO**

En los ratones en los que se inactivó  $\beta$ -catenina se observó una disminución del número de acúmulos de células inmunopositivas para esta proteína en la capa subgranular del giro dentado del *hipocampo*, confirmando que la estrategia genética en estos animales funcionaba correctamente. Sin embargo, dicha inactivación no resulta en una eliminación completa de los acúmulos de  $\beta$ -catenina en esa área. Esto podría deberse a una incompleta recombinación de las secuencias situadas entre los sitios *loxP* por parte de la enzima Cre recombinasa (Bao et al, 2013), y/o a la existencia de células que no activan el promotor GLAST (DeCarolis et al, 2013), como las células progenitoras amplificadoras neurales (*amplifying neural progenitors*, ANPs) (Mira et al, 2010). Además, la expresión de  $\beta$ -catenina también se produce en una amplia variedad de poblaciones celulares, como los neuroblastos que expresan doblecortina y están en fase de diferenciación (Lie et al, 2005), por lo que se mantiene la expresión de  $\beta$ -catenina en estos tipos celulares que no expresan el transportador de glutamato GLAST.

La disminución de  $\beta$ -catenina que observamos en el giro dentado del *hipocampo*, está asociada a nichos proliferativos (Mostany et al, 2008; Pascual-Brazo et al, 2012), donde tiene localización nuclear (Mostany et al, 2008). La disminución de  $\beta$ -catenina con función nuclear en el *núcleo accumbens* de modelos animales de depresión por estrés crónico y en muestras humanas *postmortem* se han relacionado con depresión (Dias et al, 2014). Así, nuestros resultados apoyarían el papel de  $\beta$ -catenina nuclear en el trastorno.

### **Expresión de $\beta$ -catenina en ratones cST**

En relación a los animales que presentan  $\beta$ -catenina estabilizada, no apreciamos incremento en los niveles de  $\beta$ -catenina un mes después de la inducción del animal

transgénico. Sin embargo 12 horas después de la inducción, apreciamos un incremento aunque no llega a ser estadísticamente significativo. La diferencia observada entre los niveles de  $\beta$ -catenina en el animal que estabiliza la proteína 12 horas y 1 mes después de la inducción, podría deberse a mecanismos reguladores como un incremento en la tasa de apoptosis de las células en las que se ha estabilizado  $\beta$ -catenina (Chenn & Walsh, 2002; Deacon, 2006), o a un enlentecimiento del ciclo celular (Mutch et al, 2010). Los resultados un mes después de la estabilización contrastan con lo descrito por otros autores que utilizan la misma técnica para incrementar la señalización de la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina en intestino (Hallpike & Rawdon-Smith, 1934; Harada et al, 1999), e hígado (Kai et al, 2010; Kim et al, 2011b). La diferencia observada entre la estabilización de  $\beta$ -catenina en cerebro y en otros órganos, podría estar asociada a una mayor regulación de esta vía de Wnt/ $\beta$ -catenina en cerebro, dado que la tasa de proliferación basal en cerebro es significativamente inferior a la descrita en intestino o en hígado (Harada et al, 1999; Kai et al, 2010; Kim et al, 2011b).

## 1.1. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN

### 1.1.1. EFECTO DE LA INACTIVACIÓN DE $\beta$ -CATENINA

#### Expresión de marcadores de proliferación

Esta reducción de  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo* fue paralela al descenso en la proliferación hipocampal, valorada tanto por una menor incorporación de BrdU (análogo de timidina que se incorpora a las células en la fase S del ciclo celular), como por una bajada de la expresión de la proteína nuclear Ki67 (expresada en todas las fases del ciclo celular excepto la G<sub>0</sub>). Estos resultados son paralelos a lo previamente descrito en animales *knockout* condicionales para  $\beta$ -catenina (Mao et al, 2009), por lo que el papel de esta proteína es esencial para la proliferación de progenitoras neurales, participando además en el mantenimiento de los nichos de células progenitoras (Zechner et al, 2003). En diversos trabajos que utilizan animales *knockout* para  $\beta$ -catenina u otros efectores de la vía en células progenitoras embrionarias o progenitoras neurales adultas, se observa que la pérdida de esta proteína o la inhibición de la vía, incrementa la probabilidad de que las células precursoras experimenten diferenciación en vez de una auto-renovación (Wexler et al, 2009; Woodhead et al, 2006). En esos casos, la menor activación

de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina conlleva además una reducción en el número de ANPs (Wexler et al, 2009), o incluso un aumento en la apoptosis (Zechner et al, 2003).

### **Expresión de marcadores de neurogénesis**

La disminución del marcador de neuronas inmaduras doblecortina (DCX) en el *hipocampo* de los ratones en los que se ha inactivado  $\beta$ -catenina es paralelo a la reducción de los marcadores de proliferación BrdU y Ki67, como se ha descrito previamente (Revest et al, 2009). De forma similar, estudios en cerebro adulto de rata, en los que se bloquea la actividad de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina mediante el uso de vectores lentivirales en progenitoras de *hipocampo*, indican una disminución en la población de neuronas inmaduras (Lie et al, 2005). Esta disminución en el número de neuronas inmaduras se correlaciona con la menor neurogénesis que presentan diferentes modelos animales de depresión (Alonso et al, 2004; Czeh et al, 2001; Ferrara et al, 2003; Gould & Tanapat, 1999; Malberg & Duman, 2003; Pham et al, 2003; Rosenbrock et al, 2005; Vollmayr et al, 2003).

El estudio morfológico de las neuronas con marcaje DCX mediante un análisis de *Sholl*, sin embargo, no mostró cambios en la arborización dendrítica en los ratones con  $\beta$ -catenina inactivada en la zona subgranular del *hipocampo*, de forma paralela a lo descrito en animales con una reducción de proliferación hipocampal (Revest et al, 2009). Estos resultados contradicen en parte estudios previos que relacionan la disminución de  $\beta$ -catenina en neuronas inmaduras de la capa subgranular del *hipocampo* de cerebro postnatal, con una fuerte malformación de estas nuevas neuronas que presentan ausencia de dendritas o una menor longitud y arborización de las mismas (Gao et al, 2007). Además, la ausencia de  $\beta$ -catenina en estado perinatal (Wang et al, 2015), o en cultivos celulares de neuronas procedentes de *hipocampo* (Yu & Malenka, 2003), también produce déficits morfológicos. Estos estudios, sin embargo, se han realizado en neuronas en diferenciación, mientras que en nuestro trabajo se elimina  $\beta$ -catenina en células progenitoras que expresan GLAST. Esto sugiere que las neuronas inmaduras de nuestros animales podrían provenir de las células ANPs que no expresan GLAST (Mira et al, 2010), y que por lo tanto mantienen inalterados los niveles de  $\beta$ -catenina y en consecuencia dan lugar a neuronas inmaduras normales.

Es indiscutible la participación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la formación de la circuitería neuronal a través del desarrollo tanto de axones como de dendritas, sin olvidar la formación de las espinas dendríticas y la sinaptogénesis. Sin embargo, además de la vía

canónica, existen otras vías no canónicas de señalización a través de Wnt como la Wnt/PCP, la cual juega un papel muy importante en la regulación del citoesqueleto (Rosso & Inestrosa, 2013). Por ello, cabe la posibilidad de que en los animales cKO, en las células en las que se ha inactivado  $\beta$ -catenina se produzcan una serie de cambios compensatorios mediante los cuales otras vías de señalización Wnt *no canónicas* podrían estar regulando los déficits ocasionados tras la manipulación genética en la arborización de las neuronas inmaduras. Es más, en los procesos de adhesión celular en los que  $\beta$ -catenina juega un importante papel, otras proteínas de la familia de las cateninas, como la  $\gamma$ -catenina (plakoglobina), podría adquirir el rol de su “hermana” proteica y restablecer las carencias ocasionadas (Huelsken et al, 2000).

### 1.1.2. EFECTO DE LA ESTABILIZACIÓN DE $\beta$ -CATENINA

#### **Expresión de marcadores de proliferación**

En los animales que estabilizan  $\beta$ -catenina los niveles de BrdU fueron similares a los de sus controles, mientras que los niveles de Ki67 se encontraron aumentados, indicando que no existen diferencias en el número de células que se encuentran en fase de división celular activa (BrdU<sup>+</sup>) entre los animales *wildtype* y los modificados genéticamente. Esta diferencia en la expresión de marcadores de proliferación en los animales que estabilizan  $\beta$ -catenina se ha descrito previamente en relación con un enlentecimiento del ciclo celular durante el proceso de corticogénesis (Chenn & Walsh, 2002; Mutch et al, 2010). En paralelo a nuestros resultados, estudios previos indican como la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina o la activación de la vía, conllevan una disminución del número de células que salen del ciclo celular y la inhibición de la diferenciación celular (Chenn & Walsh, 2002; Otero et al, 2004; Woodhead et al, 2006). Es más, la falta de un aumento en la incorporación de BrdU corrobora lo revelado en otros trabajos (Imura et al, 2010; Israsena et al, 2004), indicando que la estabilización de  $\beta$ -catenina, también puede inducir un aumento del ratio de apoptosis (Imura et al, 2010; Zechner et al, 2003). Por el contrario, otros autores describen un incremento tanto de la proliferación como de la diferenciación (Otero et al, 2004).

Diferentes estudios indican como la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina puede dar lugar a un agotamiento de precursores en la zona subventricular (SVZ) (Imura et al, 2010).

En este sentido, resultados de nuestro grupo muestran una disminución del número de QNPs en la zona subgranular del giro dentado en los ratones con  $\beta$ -catenina estabilizada (Vidal, Garro-Martínez, et al., *enviado para su publicación*). Esta reducción podría ser indicativa por un lado de un agotamiento de las QNPs de la zona subgranular del giro dentado como resultado de un agotamiento del nicho neurogénico (Encinas et al, 2011), y por otro de la transformación de QNPs en precursores neurales amplificadores (ANPs) (Encinas et al, 2011).

### **Expresión de marcadores de neurogénesis**

Nuestros resultados en animales que estabilizan  $\beta$ -catenina no muestran cambios en los niveles de neuronas inmaduras ni en su arborización, que podría ser debido a la inhibición de la diferenciación celular, y a la disminución en la capacidad de las progenitoras para salir del ciclo celular, como se ha descrito previamente tras la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina o la activación de la vía (Chenn & Walsh, 2002; Woodhead et al, 2006). Estudios en los que se activa la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina en cultivos de progenitoras neurales, describen como el incremento de proliferación va acompañado por una disminución de los marcadores neuronales y por un incremento de los de glía (Wexler et al, 2009), lo que está relacionado con una expansión del pool de progenitoras neurales (García et al, 2004; Sanai et al, 2004), o un agotamiento del nicho de progenitoras que se transforman en astrocitos (Encinas et al, 2011). El control temporal de la activación de esta vía es muy importante, como se ha visto en estudios en cultivos celulares de neuronas procedentes de *hipocampo* de rata, en los que la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina en células no progenitoras, induce por el contrario un incremento de la arborización dendrítica (Yu & Malenka, 2003).

Como se ha descrito previamente, el proceso de diferenciación neural requiere un descenso de los niveles de  $\beta$ -catenina (Wexler et al, 2009; Woodhead et al, 2006), por lo que la presencia de una forma de  $\beta$ -catenina mutada y estabilizada, impediría la disminución de los niveles de  $\beta$ -catenina intracelular para pasar a un proceso de diferenciación de las células que se han dividido, llegando incluso a la pérdida de las mismas por apoptosis (Imura et al, 2010; Zechner et al, 2003) o a un agotamiento de las mismas cuando son forzadas a proliferar (Mira et al, 2010). Esto podría explicar que los niveles de células inmaduras permanezcan invariables.

En este trabajo, la evaluación de los marcadores de proliferación y neuronas inmaduras se ha realizado un mes después de la inducción del animal transgénico, como se ha indicado al comienzo de la discusión. No podemos descartar entonces, que el incremento transitorio que se produce en la división celular inmediatamente después de la inducción, no sea ya evaluable mediante marcadores como la doblecortina, por haber alcanzado esas nuevas neuronas la madurez después de un mes tras la inducción del transgénico (Goncalves et al, 2016), y haber perdido por tanto la expresión de este marcador neuronal.

Los resultados obtenidos en los animales en los que se ha inactivado o estabilizado  $\beta$ -catenina en células progenitoras de la capa subgranular del giro dentado, confirman que la proteína  $\beta$ -catenina es necesaria para la proliferación y neurogénesis hipocampal.

## 1.2. ESTUDIOS CONDUCTUALES

Con la intención de determinar las consecuencias de inactivar o estabilizar la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina en progenitoras de *hipocampo* sobre la conducta, realizamos varios test para evaluar el comportamiento de tipo depresivo (test de la natación forzada y preferencia o ingesta de sacarosa), ansioso (test del campo claro/oscuro y test de campo abierto) o ambos (*novelty suppressed feeding test*). Todos ellos, igual que en los estudios de proliferación, se realizaron un mes después de la inducción del animal transgénico.

### 1.2.1. EFECTO DE LA INACTIVACIÓN DE $\beta$ -CATENINA

#### *Conducta de tipo depresivo*

Los animales que presentan  $\beta$ -catenina inactivada en células que expresan GLAST, mostraron un mayor tiempo de inmovilidad en el test de la natación forzada, indicando un fenotipo de tipo depresivo. Esto concuerda con antecedentes bibliográficos en los que ratones *knockout* condicionales para  $\beta$ -catenina y específicos de cerebro anterior presentan una conducta de tipo depresivo en un test similar como el test de suspensión de la cola (Gould et al, 2008). La menor activación de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina también conlleva un estado de tipo depresivo paralelo a un descenso de la proliferación (Mao et al, 2009; Zhou et al, 2016) como hemos observado en nuestro modelo.

Los animales cKO mostraron además un claro estado anhedónico. En este caso, no existen estudios previos en animales *knockout* para  $\beta$ -catenina que indiquen su implicación en este tipo de conducta. Sin embargo, sí se ha descrito una conducta paralela en animales que no expresan ligandos activadores de la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en *hipocampo* ventral (Zhou et al, 2016). Otros autores describen la asociación entre la reducción de marcadores de proliferación hipocampales y un estado anhedónico en roedores (Bessa et al, 2009; Snyder et al, 2011), y en primates no humanos (Perera et al, 2011). El *hipocampo* está implicado en la regulación de estructuras como el *núcleo accumbens* y el *área tegmental ventral* (*ventral tegmental area*, VTA). En concreto, la desregulación de la proyección excitatoria entre *hipocampo* y VTA, podría ser la responsable de la conducta observada en nuestros animales cKO  $\beta$ -catenina, ya que la desregulación de esta vía se ha relacionado con una disminución del tono dopaminérgico que contribuye a la conducta anhedónica (Warner-Schmidt & Duman, 2006).

#### ***Conducta de tipo depresivo/ansioso***

La presencia de rasgos ansiosos es habitual tanto en pacientes como en modelos animales de depresión (Hirschfeld, 2001), por ello, este tipo de conducta fue examinada mediante el *novelty suppressed feeding test* en nuestros animales. Éste es un buen test conductual para la evaluación de la acción ansiolítica y antidepresiva del tratamiento crónico con fármacos antidepresivos (Santarelli et al, 2003). La conducta en este test se correlaciona además con el efecto observado en pacientes con depresión mayor (Bodnoff et al, 1989; Dulawa & Hen, 2005). En este test conductual, los animales en los que se inactivó  $\beta$ -catenina presentaron una conducta de tipo ansioso/depresivo. La ausencia de diferencias en la ingesta de comida después del test, indica que los cambios observados entre los animales con  $\beta$ -catenina inactivada y sus respectivos animales *wildtype* se deben exclusivamente a cambios en la conducta ansiosa/depresiva, y no a diferencias en la conducta alimenticia.

Diferentes trabajos utilizan este test conductual para asociar una disminución de la neurogénesis hipocampal con una conducta ansiosa/depresiva (Bessa et al, 2009; Snyder et al, 2011). En paralelo a lo observado en nuestros animales cKO para  $\beta$ -catenina, encontramos trabajos donde la alteración de la neurogénesis, promueve un aumento de la conducta ansiosa/depresiva evaluada mediante el *novelty suppressed feeding test* en rata de forma basal (Bessa et al, 2009), o tras someter al animal a un modelo de depresión (Bessa

et al, 2009; Snyder et al, 2011). Otros autores, sin embargo, no observan cambios en este tipo de conducta asociada a una reducción de la neurogénesis (Meshi et al, 2006; Revest et al, 2009; Santarelli et al, 2003; Surget et al, 2008; Wang et al, 2008; Zhu et al, 2010).

### ***Conducta de tipo ansioso***

Es del todo conocida la elevada comorbilidad que presentan depresión y ansiedad (Hirschfeld, 2001; Kemp et al, 2012), así como la regulación negativa que el estrés ejerce sobre la génesis de las neuronas del *hipocampo* (Gould et al, 1992; Gould et al, 1991). Por ello decidimos evaluar si la reducción de los niveles de  $\beta$ -catenina y de proliferación y neurogénesis asociados, modulaba la respuesta conductual ansiosa en nuestros animales.

La inactivación de la proteína  $\beta$ -catenina en progenitoras de *hipocampo* tiene un efecto ansiogénico en los diferentes test conductuales empleados. Esta conducta es paralela a lo observado en animales tras la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, lo que ocasiona degeneración hipocampal (Kim et al, 2011a; Kivimae et al, 2011). El incremento de la conducta ansiosa también se ha descrito en animales con una deficiencia en la neurogénesis en el giro dentado del *hipocampo* (Revest et al, 2009), en paralelo a la reducción en proliferación que observamos en nuestros animales. Estos resultados sin embargo contrastan con lo descrito por otros autores, donde una supresión condicional y específica de  $\beta$ -catenina en cerebro anterior (Gould et al, 2008), o una reducción de la proliferación hipocampal (Saxe et al, 2006; Schloesser et al, 2010) no mostró efectos sobre la ansiedad.

La reducción en  $\beta$ -catenina, proliferación, y marcadores de neuronas inmaduras en los ratones en los que hemos inactivado  $\beta$ -catenina en progenitoras se correlaciona con resultados en pacientes diagnosticados de depresión mayor (Lucassen et al, 2010b) y con modelos animales de la enfermedad (Malberg & Duman, 2003). Sin embargo, otros autores describen la ausencia de cambios en parámetros de proliferación/plasticidad en individuos que padecen este trastorno (Boldrini et al, 2009), planteándose la hipótesis alternativa de que la disminución en proliferación en cerebro adulto no sería la causante de la depresión, sino una consecuencia de otra causa primaria (Deacon & Rawlins, 2006). Nuestros resultados en este modelo animal apoyan la importancia de la disminución de proliferación y/o plasticidad como causa primaria de esta enfermedad, además del papel de la  $\beta$ -catenina hipocampal en la modulación de la conducta de tipo ansioso/depresivo.

## 1.2.2. EFECTO DE LA ESTABILIZACIÓN DE $\beta$ -CATENINA

### *Conducta de tipo depresivo*

El animal en el que se estabilizó  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo* no muestra cambios un mes después de la inducción del animal transgénico, sin embargo, dos meses después de la inducción vemos un claro efecto antidepresivo en el test de la natación forzada. Este efecto antidepresivo está en línea con lo descrito en animales que sobreexpresan  $\beta$ -catenina en varias áreas cerebrales (Gould et al, 2007), y de forma específica en *núcleo accumbens* (Dias et al, 2014) o tras la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina mediante inhibidores de GSK-3 $\beta$  (Gould et al, 2007; Kaidanovich-Beilin et al, 2004). La ausencia de cambios significativos en el efecto antidepresivo un mes después de la inducción del animal transgénico evaluado mediante el test de la natación forzada, podría deberse al bajo tiempo de inmovilidad que presenta la cepa de ratones utilizada en este modelo. Esta baja inmovilidad basal se ha asociado en parte a diferencias fenotípicas conductuales asociadas al *background* genético de la cepa (Can et al, 2011). En nuestro caso, la reexposición de los animales al mismo test conductual un mes después (dos meses tras la inducción del transgénico), promovió un incremento en el tiempo de inmovilidad de los individuos control (Mezadri et al, 2011), haciendo de este modo más evidentes las diferencias en el tiempo de inmovilidad en los animales que estabilizan  $\beta$ -catenina, y por lo tanto, su conducta de tipo antidepresivo.

En el parámetro de anhedonia no observamos cambios asociados a la estabilización de  $\beta$ -catenina, si bien la reversión de la preferencia de sacarosa tras el tratamiento crónico con antidepresivos está asociada a una conducta anhedónica previa, característica de los modelos crónicos de depresión como el CUMS (*chronic unpredictable mild stress*) (Strekalova & Steinbusch, 2010), o la administración crónica de corticosterona (Gourley et al, 2008b).

### *Conducta de tipo depresivo/ansioso*

Este tipo de conducta evaluada mediante el *novelty suppressed feeding test*, muestra una conducta de tipo ansiolítico/antidepresivo, opuesta a la conducta de los animales en los que se inactivó  $\beta$ -catenina. La ausencia de diferencias en la ingesta de comida después de la realización del test conductual, indica que la menor latencia observada en estos animales es debida exclusivamente a un efecto ansiolítico/antidepresivo mediado por la

estabilización de  $\beta$ -catenina, y no a un incremento en la motivación para comer. La literatura actual no refleja ningún estudio donde se evalúe este tipo de conducta mediante el *novelty suppressed feeding test* tras la estabilización de  $\beta$ -catenina o incrementando la señalización canónica de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, por lo que es la primera vez que se describe este efecto conductual para este tipo de manipulación en progenitoras de la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo*. Así, la estabilización de  $\beta$ -catenina tiene un efecto conductual similar a la administración crónica de antidepresivos, donde este efecto está asociado a un incremento de  $\beta$ -catenina (Mostany et al, 2008; Pascual-Brazo et al, 2012).

### ***Conducta de tipo ansioso***

Los animales con  $\beta$ -catenina estabilizada en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo*, no presentan cambios en la conducta ansiosa pura. Esto sugiere que la estabilización de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina está más relacionada con conducta de tipo antidepresiva y no ansiolítica, al contrario que lo descrito tras la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina en *núcleo accumbens*, donde se aprecia ambos efectos antidepresivo y ansiolítico (Dias et al, 2014).

Considerando los datos obtenidos, podemos relacionar la inactivación de  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo*, con un fenotipo ansioso/depresivo, mientras que la estabilización de esta proteína promueve un fenotipo antidepresivo. Los resultados obtenidos, apoyan la relevancia de la hipótesis neuroproliferativa/neuroplástica como causante de la depresión o mediadora del efecto antidepresivo.

## **1.3. ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS**

Como se ha descrito en la introducción, la depresión mayor está relacionada también con diferentes sistemas de neurotransmisión, como el serotoninérgico (Garcia-Garcia et al, 2014). Es por ello que decidimos estudiar el estado de este sistema monoaminérgico tras eliminar o estabilizar  $\beta$ -catenina en progenitoras de la capa subgranular del giro dentado del *hipocampo* para conformar una base más sólida, sumándose a los datos aportados por los cambios en proliferación y neurogénesis que subyacen en los fenotipos conductuales observados en ambos grupos.

### 1.3.1. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub>

El análisis de la funcionalidad del sistema serotoninérgico, en particular de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, reveló cambios en la actividad de este subtipo de receptor en áreas cerebrales específicas tanto para los animales con  $\beta$ -catenina inactivada como estabilizada.

#### *Efecto de la inactivación de $\beta$ -catenina*

##### *a) Funcionalidad in vitro de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>*

Los animales en los que se eliminó  $\beta$ -catenina de la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo* presentaron una menor funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en un gran número de estructuras postsinápticas de gran importancia en depresión, como son la *corteza prefrontal*, el *caudado-putamen*, las áreas CA1, CA2-3 y el giro dentado del *hipocampo* y el *hipotálamo*. La evaluación de la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en *corteza prefrontal*, una de las áreas más relevantes en depresión (Drevets et al, 2008; Duman et al, 1997; Seminowicz et al, 2004), mediante estudios de fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S en membranas, confirmó esta reducción en la funcionalidad mediada por el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, no apreciándose cambios en el parámetro de concentración eficaz 50 (EC50). La disminución de la funcionalidad de este subtipo serotoninérgico podría deberse a una reducción de la densidad de estos receptores (Drevets et al, 1999; Drevets et al, 2007), y/o a un descenso en el acople de este subtipo de receptor con su correspondiente proteína Gi/o (Castro et al, 2003).

La reducción en la funcionalidad de los heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> correlaciona con lo descrito previamente en modelos animales de estrés (Hensler et al, 2007; Karten et al, 1999; Lopez et al, 1998; McKittrick et al, 1995; Watanabe et al, 1993). Esta menor funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> localizado postsinápticamente también se ha descrito en muestras de cerebro *postmortem* de pacientes diagnosticados de depresión mayor (Hsiung et al, 2003), o mediante estudios de PET escáner (Sargent et al, 2000; Savitz et al, 2009). Otros autores, sin embargo no encontraron cambios en la funcionalidad de este receptor (Bhagwagar et al, 2004).

La funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados en el *núcleo dorsal del rafe* no presentó modificaciones en los animales en los que se eliminó  $\beta$ -catenina con respecto

a sus controles. La literatura muestra discrepancias en los estudios referentes a la densidad de esta población de receptores en muestras *postmortem* de pacientes suicidas diagnosticados de MDD. Podemos encontrar trabajos que muestran aumento de su densidad (Boldrini et al, 2008; Stockmeier et al, 1998), mientras otros trabajos observan disminuciones en el *binding* del autorreceptor (Drevets et al, 1999; Drevets et al, 2007).

**b) Funcionalidad *in vivo* de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>**

La hipotermia inducida por el agonista selectivo (+) 8-OH-DPAT ha resultado ser un buen método para analizar la funcionalidad *in vivo* de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> tanto en ratón (Martin et al, 1992b), como en el ser humano (Lesch et al, 1990; Rausch et al, 2006).

La utilización de una dosis de 0,5 mg/kg de este agonista en los animales con  $\beta$ -catenina inactivada, no mostró diferencias en la hipotermia inducida por el autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> en comparación con sus animales *wildtype*. Para descartar que la dosis utilizada estuviera próxima al efecto hipotérmico máximo, lo cual nos impediría ver un incremento de la hipotermia en respuesta a una mayor funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, empleamos una dosis menor a la anterior (0,18 mg/kg) del agonista selectivo 5-HT<sub>1A</sub>. El análisis de la temperatura mostró en este caso una mayor respuesta hipotérmica inducida por 5-HT<sub>1A</sub> en los animales cKO  $\beta$ -catenina en comparación con sus respectivos *wildtype*. Estos resultados apoyan una mayor funcionalidad de los receptores presinápticos 5-HT<sub>1A</sub>, en línea a lo que sugerían su conducta ansioso/depresiva.

La respuesta hipotérmica mediada por dosis bajas del agonista (+) 8-OH-DPAT está mediada en parte por la activación de otros receptores como el receptor post-sináptico 5-HT<sub>7</sub> (Hedlund et al, 2004), el cual se encuentra asociado a trastornos depresivos y ansiedad (Hedlund, 2009). Por ello, no podemos descartar que otros receptores como el subtipo serotoninérgico 5-HT<sub>7</sub> esté participando tanto en la respuesta hipotérmica del agonista, como en la conducta depresivo/ansiosa que muestran los ratones con  $\beta$ -catenina inactivada.

El incremento de la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> presinápticos observado mediante los estudios *in vivo*, no se ajusta en parte con los resultados obtenidos en la autorradiografía funcional, donde no observamos cambios en la funcionalidad de este subtipo serotoninérgico en el *núcleo dorsal del rafe*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en esta técnica *in vitro* sólo se determina la funcionalidad del receptor tras su acople a

proteínas G, mientras que *in vivo*, la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> presinápticos puede estar activando otras vías de señalización como los canales de potasio (Luscher et al, 1997). Una regulación diferencial también se ha descrito en rata tras el tratamiento crónico con SSRIs y antidepresivos tricíclicos, donde no se aprecian cambios en el acople de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> a proteínas Gi, pero sí se aprecia una desensibilización evaluada mediante hipotermia y electrofisiología, debido a cambios en otros efectores acoplados a los receptores 5-HT<sub>1A</sub> como los canales iónicos (Rossi et al, 2006b).

Por otro lado, el modelo de hipertermia inducida por estrés (SIH) es un método que sirve para estudiar los efectos agudos del estrés sobre la temperatura corporal, mecanismo regulado por el sistema nervioso autónomo. Esta respuesta fisiológica es robusta en el tiempo, fácil de medir, se reproduce en muchas especies de mamíferos incluida la humana y posee una alta validez predictiva. Los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, entre otros, modulan tanto el incremento de temperatura a corto plazo tras enfrentarse a un estrés, como la temperatura basal (Bouwknicht et al, 2007), si bien este papel no es apoyado por otros trabajos (Pattij et al, 2001).

En nuestro estudio, los animales en los que se inactivó  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo* presentaron una mayor temperatura basal y una menor respuesta hipertérmica al estrés que los animales *wildtype*. Esta mayor temperatura corporal basal también se ha descrito en ratones doble *knockout* para los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> (Guilloux et al, 2011), postulando en este caso que el receptor 5-HT<sub>1B</sub> juega un papel más importante como regulador de esta temperatura basal, por lo que también hemos estudiado la funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> serotoninérgico en nuestros modelos animales, como se discutirá más adelante. Por otro lado, animales que sobreexpresan el receptor 5-HT<sub>1A</sub> postsináptico y que por tanto tienen un bajo ratio 5-HT<sub>1A</sub> pre/postsináptico, se caracterizan por una baja temperatura basal (Rosa, 2015), al contrario que la elevada temperatura basal en nuestros animales con  $\beta$ -catenina inactivada, donde el ratio 5-HT<sub>1A</sub> pre/post es mayor que en sus animales *wildtype*. Sin embargo, otros estudios en los que se sobreexpresa el receptor 5-HT<sub>1A</sub> presináptico (Richardson-Jones et al, 2010), o en el animal *knockout* constitutivo para este receptor (Pattij et al, 2001), no muestran diferencias en temperatura basal.

Cabe destacar que la elevada temperatura corporal también se ha asociado a niveles altos de citoquinas que producen una conducta “enferma”, que puede cursar con síntomas

de tipo depresivo (Silverman et al, 2005). Teniendo esto en cuenta, podemos especular que nuestros animales podrían presentar cambios paralelos, que explicasen el incremento de temperatura basal, así como su conducta depresiva/ansiosa. Experimentos en este sentido serían necesarios para evaluar esta posibilidad.

Los ratones en los que se inactivó  $\beta$ -catenina, presentan también una menor hipertermia inducida por estrés, sugiriendo que estos animales tienen alterada la respuesta a situaciones estresantes. Estudios en humano, indican que individuos con niveles elevados del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub>, son más susceptibles a sufrir alteraciones en su respuesta al estrés, adquiriendo vulnerabilidad a padecer trastornos psiquiátricos como la depresión (Anttila et al, 2007; Kraus et al, 2007; Neff et al, 2009). Además, estudios en ratones manipulados genéticamente en los que se sobreexpresó el receptor presináptico 5-HT<sub>1A</sub>, mostraron un menor incremento de la temperatura en respuesta a estrés, y por lo tanto una menor respuesta fisiológica al estrés (Richardson-Jones et al, 2010). Estos resultados, en línea con los obtenidos en nuestros animales con  $\beta$ -catenina inactivada, apoyan una mayor funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> presinápticos. El incremento de temperatura inducido por estrés está positivamente correlacionado con la actividad del eje HPA (Groenink et al, 1994), lo que sugiere que los animales en los que se inactivó  $\beta$ -catenina pueden presentar una menor liberación de corticosterona en respuesta a estrés. Esta desregulación del eje HPA se asocia a mecanismos regulatorios provocados por la exposición a eventos estresantes repetidamente y que preceden al desarrollo de depresión (Boyer, 2000).

De forma general, un aumento tanto en la densidad como en la funcionalidad de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>, se relaciona con una conducta de tipo depresivo y la falta de respuesta a antidepresivos clásicos en modelos animales (Richardson-Jones et al, 2010), así como a una mayor vulnerabilidad a padecer trastornos del estado de ánimo, y una peor respuesta al tratamiento en pacientes (Anttila et al, 2007; Lemonde et al, 2003; Neff et al, 2009). Este incremento de la densidad/funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> presináptico también se ha observado en individuos que portan el alelo G/G del polimorfismo del receptor 5-HT<sub>1A</sub> C(-1019)G, que promueve una desrepresión de la transcripción del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Lemonde et al, 2004)

### ***Efecto de la estabilización de $\beta$ -catenina***

#### ***a) Funcionalidad in vitro de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>***

En los animales en los que se estabilizó  $\beta$ -catenina no se observaron cambios en la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en ninguna de las áreas en las que este receptor tiene localización postsináptica, mientras que sí se observó una disminución de la funcionalidad en los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>, lo que sugiere la desensibilización de los mismos. Esta reducción en la funcionalidad de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> concuerda con la conducta antidepressiva que presentan estos animales, la cual ha sido descrita tras el tratamiento crónico con antidepressivos (Castro et al, 2003; Hervas et al, 2001; Le Poul et al, 2000). También, estudios realizados en ratón muestran que una menor densidad del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub>, en paralelo a una menor funcionalidad, está asociada con una conducta de tipo antidepressiva/ansiolítica, y mejor respuesta a antidepressivos (Richardson-Jones et al, 2010)

#### ***b) Funcionalidad in vivo de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>***

La evaluación de la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> *in vivo* en los animales con  $\beta$ -catenina estabilizada, mostró una hipotermia significativamente menor que la mostrada por sus controles, indicando una menor funcionalidad de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>. Este resultado confirma el obtenido mediante autorradiografía funcional, apuntando a la desensibilización de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> somatodendríticos. La menor funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> presinápticos está en línea con la conducta antidepressiva que muestran nuestros animales tras la estabilización de  $\beta$ -catenina. Además, para el establecimiento del efecto antidepressivo se ha descrito la necesidad de la desensibilización del receptor 5-HT<sub>1A</sub> localizado en el soma de las neuronas serotoninérgicas (Le Poul et al, 2000). Esta desensibilización del autorreceptor asociada al tratamiento crónico con antidepressivos, es evaluable mediante una reducción de la hipotermia en humanos (Mombereau et al, 2010; Navines et al, 2007; Rainer et al, 2012; Rausch et al, 2006), en animales *naïve* (Martin et al, 1992b; Rainer et al, 2012), en modelos animales de depresión (Rainer et al, 2012), o está asociado también a manipulaciones genéticas con acción antidepressiva rápida (Bortolozzi et al, 2012; Ferres-Coy et al, 2013a; Ferres-Coy et al, 2013c).

Los animales transgénicos en los que se estabilizó  $\beta$ -catenina, además, no mostraron cambios en las temperaturas basales, ni en la respuesta hipertérmica al estrés, sugiriendo que la respuesta hormonal del eje HPA no está desregulada, y/o que no hay alteraciones en los niveles de citoquinas proinflamatorias (como sugerían los datos en el cKO  $\beta$ -catenina). Estas hipótesis tendrían que ser corroboradas experimentalmente, si bien, estos cambios serían más fácilmente evaluables en modelos crónicos de la enfermedad.

Nuestros resultados apoyan la implicación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en los trastornos de ansiedad y depresión aunque existen discrepancias en los trabajos realizados en cerebro humano. En general los diversos estudios están en línea con nuestros resultados, mostrando una disminución de los heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>, y a un aumento de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>, localizados en el soma de las neuronas serotonérgicas.

### **1.3.2. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1B</sub>**

Teniendo en cuenta la implicación que tiene el receptor 5-HT<sub>1B</sub> en depresión, decidimos estudiar los cambios en la funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en los animales en los que se eliminó o estabilizó de forma constitutiva  $\beta$ -catenina en la capa subgranular del giro dentado del *hipocampo*.

#### ***Efecto de la inactivación de $\beta$ -catenina***

##### ***a) Funcionalidad in vitro de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>***

Debido a su localización dentro de la neurona, y a diferencia de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, los estudios de autorradiografía no nos permiten distinguir entre los 5-HT<sub>1B</sub> localizados como auto y heterorreceptores, ya que físicamente se encuentran muy próximos en los terminales axónicos (Boschert et al, 1994).

El estudio *in vitro* mediante autorradiografía funcional reveló, en los animales en los que se inactivó  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo*, una disminución en la capacidad específica del receptor 5-HT<sub>1B</sub> para acoplarse a proteínas G mediada por la estimulación con el agonista selectivo 5-HT<sub>1B</sub> CP94,253, en dos estructuras cerebrales: el *hipotálamo* y el *caudado-putamen*. Estas dos estructuras forman parte de la principal circuitería que regula el tono hedónico, así como las funciones cognitivas a través de conexiones recíprocas con regiones corticales (Sternat & Katzman, 2016). Además, el

*hipotálamo* juega un importante papel en el control del comportamiento emocional, así como la regulación del eje HPA, el cual se encuentra alterado en la patología depresiva (Arborelius et al, 1999; Bao et al, 2008; Pariante & Lightman, 2008; Swards & Swards, 2003). La menor funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> obtenida en el *hipotálamo* concuerda con el estudio realizado en un modelo animal de depresión en rata (Edwards et al, 1991). Otros modelos animales que presentan una conducta de tipo depresivo como es el ratón *knockout* de BDNF, presentan una reducción del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en áreas corticales (Warner-Schmidt et al, 2010).

Por otro lado, el *caudado-putamen* presenta una hipofuncionalidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en nuestros animales con  $\beta$ -catenina inactivada. En animales *knockout* del receptor 5-HT<sub>1B</sub> no se han descrito cambios conductuales (Nautiyal & Hen, 2017), sin embargo, en ratones *knockout* para la proteína p11, encargada de incrementar la localización de este subtipo de receptor serotoninérgico en la superficie de la membrana celular, se observa una menor funcionalidad 5-HT<sub>1B</sub> en otra estructura de los ganglios basales como es el *globo pálido*, así como una conducta de tipo depresivo y anhedonia (Svenningsson et al, 2006). Nuestros resultados concuerdan además con la reducida funcionalidad que presentan los receptores 5-HT<sub>1B</sub> en *ganglios basales* de individuos que padecen depresión mayor (Murrrough & Neumeister, 2011), y que presentan una peor respuesta a la activación por agonistas selectivos del receptor (Cleare et al, 1998; Whale et al, 2001). El *caudado* y el *putamen* forman parte del *núcleo estriado*, la parte ventral del cual, junto a la *corteza orbitofrontal*, contribuyen a las experiencias de placer (Der-Avakian & Markou, 2012). En individuos diagnosticados de depresión mayor se ha observado, mediante estudios de neuroimagen, una disminución en la actividad de ambas estructuras (Keedwell et al, 2005), corroborando la existencia de alteraciones en la circuitería de la recompensa asociadas a la enfermedad.

#### **b) Funcionalidad in vivo de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>**

En nuestros estudios, la menor hipotermia inducida tras la activación de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> en los animales en los que inactivamos  $\beta$ -catenina, concuerda con la menor funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> observada en *hipotálamo* mediante los estudios de autorradiografía. Esta área cerebral tiene gran importancia en el control de las respuestas fisiológicas emocionales como el deseo sexual, apetito, sed, sueño y temperatura corporal entre otras (Morrison & Nakamura, 2011; Swards & Swards, 2003). Por el contrario, la

mayor funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en *hipotálamo* y la mayor respuesta hipotérmica se ha descrito tras la activación de este subtipo de receptor en animales tratados crónicamente con antidepresivos duales (Vidal et al, 2013). Esto, junto con nuestros resultados, apoya no sólo la importancia del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en el efecto antidepresivo, sino también en la etiopatogenia de la enfermedad.

### ***Efecto de la estabilización de $\beta$ -catenina***

#### ***a) Funcionalidad in vitro de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>***

En los animales en los que se estabilizó  $\beta$ -catenina en el giro dentado del *hipocampo*, la funcionalidad de los recetores 5-HT<sub>1B</sub> se encontró aumentada en la región CA1 del *hipocampo* y, aunque de forma no estadísticamente significativa, en la *sustancia negra*. Estos datos concuerdan en parte con el efecto antidepresivo que se observa tras la activación del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en *sustancia negra* y *caudado-putamen*, mientras que tras la activación de este subtipo serotoninérgico en *hipocampo* no se aprecian cambios conductuales relacionados con la conducta depresiva (Chenu et al, 2008). Por el contrario, estudios realizados en rata mostraron un efecto ansiogénico tras la administración subcutánea de agonistas selectivos para este subtipo de receptor (Lin & Parsons, 2002).

Estudios utilizando animales que sobreexpresan la proteína p11, y que presentan asociada una elevada densidad y funcionalidad de receptores 5-HT<sub>1B</sub> en *sustancia negra*, muestran una conducta de tipo antidepresiva (Svenningsson et al, 2006). Además, se ha descrito la hiperfuncionalidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en otras estructuras como el *hipotálamo* tras el tratamiento crónico con antidepresivos (Vidal et al, 2013), si bien nosotros no apreciamos cambios en esta estructura. En este caso, sería de gran interés discriminar la implicación de los auto o los heterorreceptores 5-HT<sub>1B</sub>, ya que son estos últimos, los sugeridos como mediadores del efecto antidepresivo (Artigas, 2013b; Chenu et al, 2008).

#### ***b) Funcionalidad in vivo de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>***

En nuestros estudios, los animales en los que se estabilizó  $\beta$ -catenina no presentaron diferencias en la respuesta hipotérmica tras la activación de receptores 5-HT<sub>1B</sub>, lo que se corresponde con la ausencia de cambios que presenta este subtipo en *hipotálamo*. Este resultado contrasta con la mayor hipotermia descrita tras la administración crónica del antidepresivo venlafaxina en ratas *naïve* (Vidal et al, 2013).

Los resultados obtenidos *in vivo* mediante la evaluación de la hipotermia inducida por la activación del receptor 5-HT<sub>1B</sub>, coinciden con los estudios *in vitro* de autorradiografía funcional tanto en animales con  $\beta$ -catenina inactivada como estabilizada, apoyando así la participación tanto del *hipotálamo* como del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en el control de la temperatura y validando ambas técnicas empleadas para el estudio de la funcionalidad de este subtipo específico de receptor serotoninérgico. Por otro lado, sugieren la implicación de este subtipo serotoninérgico en la modulación de la conducta de tipo depresivo.

### 1.3.3. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>4</sub>

La asociación de este subtipo de receptor serotoninérgico con el trastorno depresivo es relativamente nueva y procede de evidencias tanto en humano (Madsen et al, 2015; Ohtsuki et al, 2002; Rosel et al, 2004), como en animales (Licht et al, 2010; Licht et al, 2009). Además, en los últimos años se ha descrito que agonistas parciales de este receptor poseen una acción antidepresiva rápida (Lucas et al, 2007; Pascual-Brazo et al, 2012; Vidal et al, 2014). Por todo ello, quisimos estudiar la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>4</sub> en nuestros animales con eliminación  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo*.

#### *Efecto de la inactivación de $\beta$ -catenina*

##### *a) Funcionalidad in vitro de los receptores 5-HT<sub>4</sub>*

La determinación de la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>4</sub> acoplados a proteínas Gs mediante autorradiografía funcional (<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S) muestra una elevada dificultad debido a las limitaciones que presenta la técnica (Milligan, 2003). Por ello, evaluamos la actividad de estos receptores 5-HT<sub>4</sub> a través de su capacidad para producir cAMP tras la activación de la enzima adenilato ciclasa (Bockaert et al, 1990; Dumuis et al, 1988). Estos ensayos se realizaron en homogenizados de *estriado*, ya que esta estructura posee una elevada densidad del subtipo 5-HT<sub>4</sub> (Mengod et al, 1996; Varnas et al, 2003). Además, se ha descrito que la activación de la señalización a través de cAMP en la parte ventral del *estriado*, modula las respuestas conductuales inducidas por el estrés (Plattner et al, 2015).

En nuestros experimentos los animales cKO  $\beta$ -catenina mostraron niveles basales de cAMP mayores que sus respectivos *wildtype*. De forma paralela se ha descrito una tendencia al alza en los valores basales de cAMP en la *corteza frontal* de muestras

*postmortem* de víctimas suicidas (Valdizan et al, 2010b), y en el modelo de bulbectomía olfatoria en rata (Pilar-Cuéllar, *datos sin publicar*). Sin embargo, otros autores no describen cambios (Hall, 1934; Lowther et al, 1996; Valdizan et al, 2003), o incluso una hipofuncionalidad del sistema cAMP/PKA en pacientes deprimidos la cual es revertida por la administración crónica de antidepresivos (Dwivedi & Pandey, 2008; Fujita et al, 2012; O'Donnell & Xu, 2012). En nuestro caso, los mayores valores basales de cAMP en el animal cKO  $\beta$ -catenina, se han relacionado con una sensibilización de la adenilato ciclasa (Valdizan et al, 2010b).

Por otra parte, en nuestros ratones cKO  $\beta$ -catenina se ha observado una disminución en los niveles del segundo mensajero tras la estimulación con el agonista selectivo 5-HT<sub>4</sub> zacoprida en *estriado*. Resultados similares se han observado en un modelo animal de bulbectomía olfatoria en rata (Pilar-Cuéllar, *datos sin publicar*). La asociación entre niveles bajos del receptor 5-HT<sub>4</sub> y conducta depresiva/ansiosa también se ha descrito en animales *knockout* para este receptor, los cuales muestran un fenotipo ansioso y estado anhedónico (Amigo et al, 2016; Compan et al, 2004). Además, estudios en sujetos sanos mediante PET escáner describen una correlación negativa entre el riesgo familiar a padecer depresión mayor y un menor *binding* del receptor 5-HT<sub>4</sub> en el *estriado*, pero no en otras áreas como el *neocortex* (Madsen et al, 2015). Estos cambios podrían deberse a múltiples factores como una menor afinidad de las proteínas Gs por los nucleótidos de guanina (Manji et al, 1991), una disminución en los niveles de proteínas Gs (Lesch et al, 1991; Lesch & Manji, 1992), una reducción en la capacidad de acoplarse a proteínas G (Watts, 2002), o una disminución de la densidad del receptor 5-HT<sub>4</sub>, por un incremento en la internalización mediada por agonista, y la posterior degradación del receptor (Ansanay et al, 1996).

Un efecto similar se ha descrito en modelos animales de depresión como las ratas *Flinders Sensitive Line*, en las cuales existe una reducción de la densidad de receptores 5-HT<sub>4</sub> (Licht et al, 2009). En este caso, esta disminución se ha asociado a una desensibilización de los transportadores de serotonina, lo que conduciría a un incremento local de serotonina, desencadenando por lo tanto una desensibilización del receptor 5-HT<sub>4</sub> (Licht et al, 2009). Teniendo esto en cuenta, no podemos descartar en nuestros animales *knockout* condicionales para  $\beta$ -catenina, la presencia de niveles elevados de serotonina en áreas como el *caudado-putamen*, conduciendo así a la desensibilización del receptor 5-HT<sub>4</sub> y/o de su cascada de transducción. De hecho, la eliminación de serotonina mediante la

lesión de neuronas serotoninérgicas, conducen a un incremento de la densidad de receptores 5-HT<sub>4</sub> en diversas áreas, entre las que se encuentra el *caudado-putamen* (Compan et al, 1996).

La menor funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>4</sub> en nuestros animales con conducta ansiosa/depresiva es un hecho curioso, por su similitud con los resultados tras la administración crónica de fluoxetina (Vidal et al, 2009), venlafaxina (Vidal et al, 2010), y el agonista parcial 5-HT<sub>4</sub> RS67,333 (Pascual-Brazo et al., 2012), en los que se describe también disminución en la capacidad de acumular cAMP mediada por este receptor. La disminución en la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>4</sub> en el *estriado* de los ratones cKO  $\beta$ -catenina, es paralela a una menor funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> en esta misma estructura. La disminución de ambos receptores plantea la posibilidad de la implicación de la proteína p11. En este sentido, la disminución de la proteína p11, ha sido relacionada directamente con una reducción de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>4</sub> en membrana (Svenningsson et al, 2006; Warner-Schmidt et al, 2009). Además, estudios en modelos animales de depresión, así como en muestras *postmortem* humanas, han descrito la reducción de esta proteína p11 (Svenningsson et al, 2006).

#### **1.3.4. ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN CORTEZA PREFRONTAL DEL ANIMAL cKO $\beta$ -CATENINA**

La microdiálisis intracerebral, ya sea en animal anestesiado o despierto, proporciona una información muy valiosa pues obtenemos medidas directas relacionadas con la transmisión sináptica, ya que en las muestras de dializado se encuentra el contenido del espacio extracelular donde se produce la comunicación entre las neuronas. Este dializado es por tanto el resultado del equilibrio entre la liberación de neurotransmisores y su recaptación mediante los transportadores específicos (Gardier, 2013).

El estudio de los niveles de neurotransmisores mediante microdiálisis *in vivo* fue realizado implantando las sondas mediante estereotaxia en la *corteza prefrontal medial*, área elegida por su gran implicación en la regulación de la respuesta al estrés (Luthi & Luscher, 2014; Tovote et al, 2015). Además, ciertos aspectos de la depresión mayor son el resultado de una mala adaptación al estrés provocando cambios neuroplásticos en diferentes áreas cerebrales, entre las que se encuentra la *corteza prefrontal medial* (Davidson, 2002; Drevets

et al, 2008; Krishnan & Nestler, 2008; Phillips et al, 2003). Esta estructura recibe conexiones monosinápticas y unidireccionales desde *hipocampo*, estructura cuyas funciones principales son la memoria a largo plazo, el procesamiento contextual y espacial, así como de las emociones (Fanselow & Dong, 2010). Por ello, esta vía *hipocampo-corteza prefrontal medial*, juega un papel crítico en aspectos cognitivos relacionados con la función ejecutiva y la regulación de las emociones (Godsil et al, 2013; Li et al, 2015). En nuestro modelo animal en el que hemos eliminado  $\beta$ -catenina del nicho neurogénico de la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo*, nos planteamos como hipótesis que esta alteración a nivel de proliferación hipocampal, podría producir deficiencias en las conexiones *hipocampo-corteza prefrontal medial*, de forma similar a lo observado en animales donde se modela el trastorno a través de esta vía (Spedding et al, 2005). Para ello, decidimos estudiar la transmisión serotoninérgica y la glutamatérgica, por el importante papel que tienen ambos sistemas de neurotransmisión tanto en la neurobiología de la depresión, como en su tratamiento (Ferrari & Villa, 2016; Lener et al, 2017).

La determinación de los niveles extracelulares de serotonina en los animales con  $\beta$ -catenina inactivada en progenitoras de *hipocampo*, se realizó a través de dos aproximaciones: i) la aplicación local de veratridina, alcaloide que produce una despolarización mediada por la apertura de canales de sodio y posterior liberación de los neurotransmisores (Hammond, 2015); y ii) la administración sistémica aguda del SSRI fluoxetina. La administración de veratridina de forma local a través de la sonda de microdiálisis, promueve un pulso despolarizante que reveló una liberación significativamente menor de 5-HT en los animales cKO  $\beta$ -catenina indicando una incapacidad para liberar niveles adecuados de neurotransmisor tras el estímulo. Los bajos niveles de serotonina liberados tras la activación de los canales de sodio, sugieren la existencia de un menor número de vesículas en el terminal presináptico (Cabin et al, 2002; Taschenberger et al, 2002), o una regulación a la baja de los canales de sodio. En este sentido, estudios recientes en los que se ha silenciado  $\beta$ -catenina en neuronas describen la existencia de una reducción del número de canales de sodio y una menor excitabilidad neuronal (Tapia et al, 2013). Sin embargo, la determinación de los niveles de glutamato mostró un patrón de respuesta similar a los animales *wildtype* tras el pulso despolarizante, aunque la liberación de glutamato se mantiene en el tiempo en los animales cKO  $\beta$ -catenina. Este hecho no concuerda con un posible déficit en la excitabilidad neuronal mediado por

los canales de sodio, siendo necesario un estudio más profundo de los sistemas implicados con el objetivo de esclarecer la disminución en la liberación de 5-HT en esta área y el incremento de glutamato. El sistema glutamatérgico en la *corteza prefrontal medial* presenta una regulación compleja y sus niveles extracelulares dependen de un gran número de estructuras cerebrales, principalmente del sistema límbico (Bennett, 2011), lo que dificulta su interpretación.

La menor liberación de 5-HT tras un estímulo excitatorio en los animales cKO  $\beta$ -catenina, respaldaría la incapacidad de respuesta o la respuesta maladaptativa al estrés que presentan estos animales en el test de la natación forzada (FST), donde unos niveles adecuados de 5-HT son necesarios para responder correctamente a este paradigma, y presentar bajos tiempos de inmovilidad (Aksoz et al, 2008; Detke et al, 1995). Estos resultados están además sustentados por un estudio reciente donde se correlaciona la administración unilateral de veratridina en mPFCx que promueve la liberación de 5-HT, con una disminución del tiempo de inmovilidad en el FST (Gasull-Camos et al, 2017).

En la segunda parte del experimento, tras la administración sistémica aguda de fluoxetina los niveles de 5-HT no se vieron afectados, lo que sugiere que estos animales cKO  $\beta$ -catenina poseen un patrón de respuesta similar a los animales *wildtype* ante el antidepresivo. Esto contrasta con estudios realizados en ratas que presentan una conducta de tipo depresivo, en las que la liberación de serotonina en la *corteza prefrontal medial* tras la administración aguda de un antidepresivo está disminuida (Yamada et al, 2013). Teniendo en cuenta que el control de la liberación de 5-HT en dicha estructura depende principalmente de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados en el *núcleo dorsal del rafe*, y que a su vez, la funcionalidad de este núcleo monoaminérgico es controlada por el *feedback* procedente de la propia *corteza prefrontal medial* (Celada et al, 2002), nuestros resultados no indican cambios relevantes en esta circuitería. En este caso, la mayor funcionalidad de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> que hemos observado mediante los estudios de hipotermia, no se correlaciona con cambios observables en el patrón de liberación de serotonina en respuesta a la administración aguda de fluoxetina. Por otro lado, los cambios producidos a nivel presináptico podrían verse compensados por cambios en la funcionalidad de los heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>, u otros receptores implicados en el control del *feedback* inhibitorio, como son los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Sharp et al, 2007). Por ello, no podemos descartar que la adecuada funcionalidad de la conexión DRN-mPFCx que se aprecia en los

animales cKO, sea el resultado de mecanismos compensatorios, que de manera indirecta regulen la liberación de 5-HT (Casanovas et al, 1999; Lopez-Gil et al, 2009). Con respecto al sistema glutamatérgico, la falta de cambios asociados a la administración aguda del antidepresivo sugiere la ausencia de cambios en la respuesta de este sistema de neurotransmisión.

En referencia a los niveles basales de ambos neurotransmisores, no se observaron cambios significativos en estos grupos, sin embargo, cabe destacar la existencia de un incremento no significativo de serotonina basal en los ratones cKO  $\beta$ -catenina. Un mayor nivel basal de este neurotransmisor podría explicar la desensibilización del receptor 5-HT<sub>4</sub> (Licht et al, 2009), o del heterorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> (Bosker et al, 2001) que observamos en nuestros animales, como cambio adaptativo a concentraciones locales elevadas de serotonina.

La 5-HT actúa también como uno de los factores reguladores más importantes de la neurogénesis hipocampal (Brezun & Daszuta, 1999), relacionándose el incremento de los niveles de serotonina promovido por el uso de los inhibidores de su recaptación, con un aumento de la neurogénesis (Djavadian, 2004; Malberg et al, 2000; Manev et al, 2001). En este proceso juega un importante papel el subtipo serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> (Radley & Jacobs, 2002; Santarelli et al, 2003) localizado en neuronas no serotoninérgicas en *hipocampo* (Banasr et al, 2004), no pudiendo descartar la participación de otros subtipos de receptores serotoninérgicos como los 5-HT<sub>4</sub> (Lucas et al, 2007; Mendez-David et al, 2014; Tamburella et al, 2009). De esta manera, nuestros resultados estarían apoyando el *link* entre la hipótesis clásica o monoaminérgica, en la que se postula que una disminución en la actividad serotoninérgica está asociada con la etiopatogenia de la depresión (Malberg et al, 2000; Manev et al, 2001), y la hipótesis neurotrófica (Duman et al, 1997), que asocia la patología con deficiencias en factores neurotróficos, proliferación y neuroplasticidad.

Todo ello sugiere una importante contribución de la  $\beta$ -catenina, a través de su papel en el control de los diferentes estadios presentes durante el proceso de la neurogénesis hipocampal adulta (proliferación, diferenciación y maduración), participando en el mantenimiento de la integridad de esta estructura y de las conexiones que establece con otras áreas cerebrales de relevancia en la patología depresiva. Los resultados encontrados sugieren que los cambios asociados a la modulación de los niveles de  $\beta$ -catenina, podrían influir de forma indirecta en la regulación de la actividad del sistema serotoninérgico cerebral.

El análisis de las modificaciones en el sistema serotoninérgico, asociadas a una disminución de  $\beta$ -catenina en progenitoras de *hipocampo*, ha mostrado por primera vez que la eliminación parcial del efector principal de la vía de señalización Wnt/  $\beta$ -catenina, reduce la proliferación y la neurogénesis hipocampal adulta y que esto conlleva en los animales un fenotipo ansioso/depresivo, así como la regulación a la baja de la funcionalidad de los heteroreceptores 5-HT<sub>1A</sub> en las principales áreas implicadas en la patofisiología de la depresión, en paralelo a lo descrito en cerebro humano *postmortem* de sujetos depresivos (Bhagwagar et al, 2004; Drevets et al, 2007). A su vez, presentan una disminución de la funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en áreas como el *hipotálamo*, y del 5-HT<sub>4</sub> en el *estriado*. Además, los ratones en los que se eliminó  $\beta$ -catenina muestran una liberación de 5-HT menor en respuesta a estímulo despolarizante.

Por el contrario, la estabilización de  $\beta$ -catenina resultó en un incremento de la proliferación hipocampal, y una conducta de tipo antidepresiva paralela a una desensibilización de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>. Como comentamos previamente, este dato es muy sugerente debido a su paralelismo con el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos (Artigas, 2013b), ya que el tratamiento crónico con estos fármacos, conlleva la desensibilización del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, y la consecuente desinhibición del *firing* de las neuronas serotoninérgicas presentes en los *núcleos del rafe* (Albert & Lemonde, 2004). Este bajo tono serotoninérgico a través del 5-HT<sub>1A</sub> presináptico se ha asociado con una menor conducta depresiva, además de ser crítico para establecer una correcta respuesta a tratamientos antidepresivos (Richardson-Jones et al, 2010).

#### 1.4. ESTUDIOS DE NEUROIMAGEN

Tras la aparición de la hipótesis neurotrófica de la depresión (Duman et al, 1997), se publicaron gran cantidad de estudios preclínicos que demostraron, la relación entre la exposición a acontecimientos estresantes y los cambios neuroplásticos que experimentan estructuras límbicas implicadas en emoción y cognición. La principal área cerebral estudiada hasta la actualidad es el *hipocampo*, debido a su importancia en funciones de aprendizaje y memoria (Leuner & Gould, 2010), y a que su neuroplasticidad es altamente sensible al estrés (Checkley, 1996). Los estudios de neuroimagen realizados con el objetivo

de determinar posibles cambios en el volumen hipocampal de pacientes diagnosticados con depresión mayor, han llevado a discrepancias en los resultados. Así, algunos autores han descrito una reducción bilateral (MacQueen et al, 2003; Sheline et al, 1999), la reducción del hemisferio derecho (Bell-McGinty et al, 2002; Steffens et al, 2000), o del hemisferio izquierdo (Bremner et al, 2000; Mervaala et al, 2000). Por el contrario, otros autores no muestran variaciones (Axelson et al, 1993; Frodl et al, 2002; Posener et al, 2003; Rusch et al, 2001; Vakili et al, 2000). No está claro si estas diferencias son causa o consecuencia de la enfermedad, ni los mecanismos por los que se observan estos cambios en el volumen hipocampal en los pacientes. Por ello se han postulado tres factores como causantes de los cambios en neuroplasticidad: elevados niveles de glucocorticoides (Checkley, 1996), pérdida neuronal mediante apoptosis o disminución de la neurogénesis (Lee et al, 2002; Sapolsky, 2000), o reducción en número de células gliales (Cotter et al, 2001a; Cotter et al, 2001b). Por otro lado, no se puede descartar que estos cambios sean producto de alteraciones en el balance de fluidos entre los ventrículos y los tejidos cerebrales, o de modificaciones en el espacio extracelular (Czeh & Lucassen, 2007; Videbech & Ravnkilde, 2004).

Para comprobar en los animales cKO para  $\beta$ -catenina si el fenotipo conductual observado, estaba asociado no solo a cambios en los marcadores de proliferación y neurogénesis, sino también a posibles cambios en el volumen hipocampal, estos animales fueron sometidos a un estudio de resonancia magnética nuclear. El análisis de las imágenes obtenidas no mostró diferencias entre los volúmenes del *hipocampo*, tal y como describen algunos de los estudios realizados en pacientes diagnosticados de depresión (Axelson et al, 1993; Frodl et al, 2002; Posener et al, 2003; Rusch et al, 2001; Vakili et al, 2000). Tampoco existieron diferencias en los valores de relajación T2, parámetro utilizado como herramienta indicadora en otras enfermedades cerebrales (Gareau et al, 2000; Pitkanen et al, 1996). Sin embargo, la reducción del volumen hipocampal está modulada no sólo por una reducción en proliferación y neurogénesis, sino también por la pérdida de ramificaciones dendríticas, la reducción del tamaño celular de neuronas y glía, procesos de apoptosis, menor número de células gliales, y/o reducción del fluido extracelular (Czeh & Lucassen, 2007), por lo que la reducción en proliferación y neurogénesis observada en el *hipocampo* en nuestro modelo cKO  $\beta$ -catenina puede no ser suficiente para ser visualizada como una reducción macroscópica de volumen hipocampal.

Hay que puntualizar que ciertos estudios proponen la existencia de una correlación positiva entre el número de episodios y la reducción del volumen hipocampal (Lupien et al, 1998; Neumeister et al, 2005; Sheline et al, 2003). Esto sugiere en nuestro caso, que los cambios provocados tras la inactivación de  $\beta$ -catenina, podrían no ser suficientes para generar cambios en el área hipocampal, pero que, tras la exposición de estos animales a diferentes situaciones estresantes o modelos animales de depresión, los cambios en el volumen hipocampal podrían hacerse patentes.

Para finalizar, no podemos descartar las limitaciones de la técnica, ya que, al seleccionar secuencias con un alto grado de resolución, estábamos reduciendo el número de cortes realizados y, en consecuencia, podríamos estar perdiendo pequeñas variaciones volumétricas o por el contrario, si reducimos la resolución, aumenta la dificultad de la segmentación de las imágenes para el recuento del área.

## **2. MODULACIÓN POR ANTIDEPRESIVOS EN EL RATÓN *KNOCKOUT* CONDICIONAL PARA $\beta$ -CATENINA**

Con el fin de validar los resultados obtenidos en los estudios conductuales, neuroquímicos y moleculares inducidos por la eliminación de  $\beta$ -catenina en la capa subgranular del giro dentado del *hipocampo*, sometimos a los animales a un tratamiento crónico con el SSRI fluoxetina, y a un tratamiento subcrónico durante 7 días con el agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub> RS67,333 (Eglen et al, 1995), ya que, como está descrito, es un compuesto con potencial antidepressivo en ensayos pre-clínicos (Lucas et al, 2007; Pascual-Brazo et al, 2012). Tras el tratamiento, los animales fueron caracterizados conductualmente, y en el caso de los animales tratados con el agonista 5-HT<sub>4</sub>, se evaluaron además diferentes marcadores del sistema serotoninérgico.

## 2.1. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON FLUOXETINA

### 2.1.1. IMPACTO SOBRE LA CONDUCTA DE TIPO ANSIOSO/DEPRESIVO

Un mes después de la inducción del modelo, se comenzó el tratamiento crónico con el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina fluoxetina. La conducta en el *novelty suppressed feeding test* no reveló cambios en el fenotipo ansioso/depresivo en los animales cKO con respecto a los *wildtype* tratados con vehículo. Además, la administración del fármaco antidepresivo no produjo efectos conductuales aparentes en este test en los animales cKO. En nuestro caso, la pérdida de la conducta ansiosa/depresiva que presentan los animales cKO  $\beta$ -catenina dos meses después de la inducción del transgénico se debería a la recuperación de la proliferación hipocampal (Vidal et al, 2014). En nuestros animales no se elimina por completo  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado, manteniéndose en células que no expresan GLAST, por lo que se mantendría la posibilidad de generar nuevas neuronas. Esta reversión de la proliferación se correlaciona con la reversión en la conducta ansioso/depresiva en el *novelty suppressed feeding test* (David et al, 2009; Santarelli et al, 2003; Surget et al, 2008), reforzando la utilidad de este test como predictivo del estado proliferativo y neuroplástico de los animales de estudio. En modelos animales en los que se elimina la proliferación en *hipocampo*, la conducta de tipo depresivo/ansioso en este test, se observa solamente tras someter a los animales a un estrés agudo (Snyder et al, 2011). En nuestro caso no hemos evaluado si la reversión conductual en nuestros animales es total, o estos animales *knockout* condicionales para  $\beta$ -catenina presentan una susceptibilidad incrementada a modelos de estrés. La ausencia de respuesta al tratamiento de la fluoxetina en los animales cKO, en comparación con sus controles, sugiere que otras modificaciones no relacionadas directamente con proliferación hipocampal en estos animales, no habrían revertido dos meses después de la inducción, dando lugar a una incapacidad para responder al tratamiento antidepresivo.

Por otro lado, el estado anhedónico que revelaron estos animales un mes después de la inducción del transgénico, se mantuvo en el tiempo. La conducta anhedónica, presente todavía dos meses después de la inducción del transgénico, sugiere que esta conducta que es dependiente de otras áreas cerebrales como el *estriado ventral (núcleo accumbens)* y la *corteza prefrontal ventral* (Der-Avakian & Markou, 2012; Keedwell et al, 2005), no

depende únicamente del grado de proliferación hipocampal, como algunos autores han descrito (Jayatissa et al, 2009), por lo que una recuperación de la proliferación en esta área, no tendría ninguna influencia sobre este rasgo depresivo. El tratamiento con fluoxetina sí originó en este caso un efecto hedónico en los animales *knockout*  $\beta$ -catenina, pues revertió el estado depresivo representado por un aumento en la preferencia por sacarosa respecto a los animales sin tratar, en paralelo a publicaciones previas (Bessa et al, 2009; David et al, 2009). Algunos autores han descrito la necesidad de un incremento de proliferación promovido por el tratamiento con fluoxetina para revertir el efecto anhedónico de modelos de depresión (Surget et al, 2008; Surget et al, 2011). De este modo, se recuperaría la modulación de la circuitería específica como son las vías aferentes al *área tegmental ventral* y *núcleo accumbens* desde el *hipocampo* (Pittenger & Duman, 2008), implicadas en la conducta hedónica (Warner-Schmidt & Duman, 2006).

En estos experimentos, la reversión del fenotipo ansioso/depresivo con el tiempo no nos permite caracterizar adecuadamente los cambios observados en conducta tras la administración del antidepresivo fluoxetina en el animal cKO. Posiblemente, la realización del tratamiento crónico con el antidepresivo inmediatamente después de la inducción del animal transgénico, nos hubiera posibilitado ver la existencia o no de una clara reversión de las conductas depresiva/ansiosa y anhedónica inducida tras la eliminación de  $\beta$ -catenina.

## **2.2. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL Y MOLECULAR TRAS EL TRATAMIENTO SUBCRÓNICO CON RS67,333**

### **2.2.1. EFECTO SOBRE LA CONDUCTA ANSIOSA/DEPRESIVA**

El tratamiento subcrónico con el agonista parcial del receptor 5-HT<sub>4</sub> en los animales en los que se eliminó  $\beta$ -catenina produjo una reversión de la conducta depresiva/ansiosa, lo que concuerda con estudios previos realizados en rata (Lucas et al, 2007; Pascual-Brazo et al, 2012), y en un modelo de depresión en ratón (Gomez-Lazaro et al, 2012). Es más, la administración subcrónica de este compuesto es capaz de revertir la conducta anhedónica en modelos animales (Lucas et al, 2007; Pascual-Brazo et al, 2012). Sin embargo, otros autores utilizando otros modelos animales de depresión, como el de administración crónica de corticosterona en ratón, indican la necesidad de administrar tratamientos crónicos con

este compuesto para obtener un efecto antidepresivo (Mendez-David et al, 2014). La reversión de la conducta depresiva tras siete días de tratamiento con RS67,333 observada en nuestros estudios, se ha asociado con un incremento de  $\beta$ -catenina y de la proliferación en el *hipocampo* (Mendez-David et al, 2014; Pascual-Brazo et al, 2012). Por ello, el efecto antidepresivo del compuesto RS67,333 observado en nuestros animales *knockout* para  $\beta$ -catenina podría estar mediado por un incremento de parámetros relacionados con proliferación.

### **2.1.2. EFECTO SOBRE LA FUNCIONALIDAD DEL SISTEMA SEROTONÉRGICO**

Teniendo en cuenta las alteraciones en el sistema serotoninérgico en los animales *knockout* para  $\beta$ -catenina en la capa subgranular del giro dentado del *hipocampo*, quisimos comprobar si la administración subcrónica del compuesto RS67,333 era capaz de revertir o compensar las disfunciones observadas.

#### ***Modulación de la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>***

Los ensayos de fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S en homogeneizados de membrana procedentes de *corteza prefrontal* se utilizaron para evaluar la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Como se ha indicado anteriormente, los animales *knockout*  $\beta$ -catenina presentaron una menor funcionalidad de los heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> en esta área, que fue revertida tras la administración subcrónica del compuesto RS67,333. El incremento de la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en *corteza prefrontal* podría deberse a un incremento de la densidad de estos receptores, y/o a un incremento del acople de este subtipo de receptor con su correspondiente proteína Gi/o. Sin embargo, tratamientos crónicos con fármacos antidepresivos muestran en general una ausencia de cambios en la densidad de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Hervas et al, 2001; Le Poul et al, 2000) y un incremento en la funcionalidad de los mismos (Castro et al, 2003).

Este incremento de funcionalidad en áreas donde el receptor 5-HT<sub>1A</sub> tiene localización postsináptica, se corresponde con un aumento de la actividad inhibitoria del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en *hipocampo* de animales tratados con RS67,333 (Lucas et al, 2007), o el incremento de su funcionalidad en regiones postsinápticas como el *hipocampo*, como se ha

descrito tras el tratamiento con fármacos antidepresivos clásicos (Castro et al, 2003). Estos resultados confirman la importancia que tiene la modulación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el efecto antidepresivo rápido del agonista parcial 5-HT<sub>4</sub> RS67,333.

El efecto antidepresivo mediado por el tratamiento subcrónico con RS67,333 también se corresponde según algunos autores con una desensibilización del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> (Lucas et al, 2007). Por ello, no podemos descartar esta posibilidad en la mediación del efecto antidepresivo en nuestros animales *knockout* para  $\beta$ -catenina dado que los animales en los que hemos eliminado  $\beta$ -catenina presentan una hipersensibilización de este receptor, como vimos en los experimentos de hipotermia inducida por la activación de este subtipo serotoninérgico.

#### ***Modulación de la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>4</sub>***

La evaluación del efecto de la administración subcrónica del compuesto RS67,333, sobre la funcionalidad de los receptores 5-HT<sub>4</sub> en animales cKO  $\beta$ -catenina en el giro dentado del *hipocampo*, se llevó a cabo mediante el estudio de la acumulación de cAMP en homogenizados de *núcleo estriado*. El tratamiento con RS67,333 en los animales *wildtype* mostró una reducción de la acumulación de cAMP inducida por el agonista 5-HT<sub>4</sub> zacoprida, que se corresponde con estudios previos en ratas *naïve* tras 7 días de tratamiento con RS67,333 (Pascual-Brazo et al, 2012), o tras el tratamiento crónico con antidepresivos clásicos (Reiersen et al, 2009; Vidal et al, 2009; Vidal et al, 2010). De forma paralela, se ha descrito la regulación a la baja de los receptores 5-HT<sub>4</sub> en algunas áreas cerebrales tras la administración crónica de antidepresivos como la paroxetina (Licht et al, 2009), como consecuencia de la elevación de los niveles de serotonina por efecto del tratamiento farmacológico (Hajos-Korcsok et al, 2000; Owen & Whitton, 2005), si bien en otras áreas como la *sustancia negra* no se observan cambios en la densidad de receptores 5-HT<sub>4</sub> (Gobbi et al, 1997). En nuestro caso, la disminución de la señalización mediada por los receptores 5-HT<sub>4</sub> en *estriado*, estaría debida a una regulación a la baja del receptor, o a una desensibilización del mismo, como consecuencia del aumento de los niveles de serotonina tras el tratamiento con RS67,333, como se ha descrito en *hipocampo* después de 3 días de tratamiento con este compuesto (Licht et al, 2010). Sin embargo, el tratamiento con RS6,7333 no mostró cambios en los niveles de cAMP en los animales cKO, posiblemente debido a que los niveles del segundo mensajero mediados por la activación del receptor 5-HT<sub>4</sub> en estos animales ya son bajos (como se discutió en el apartado 1.3.3.).

### 3. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DE UN MODELO DE DEPRESIÓN EN EL ANIMAL CON $\beta$ -CATENINA ESTABILIZADA

En la caracterización fenotípica del animal que presenta la forma estabilizada de  $\beta$ -catenina un mes después de la inducción, no se observaron en general cambios en la conducta depresiva/ansiosa, si bien en el *novelty suppressed feeding test*, la conducta antidepresiva/ansiolítica fue clara. Por ello, quisimos evaluar si la expresión de  $\beta$ -catenina constitutivamente activa inducía un fenotipo resistente o resiliente en un modelo animal de depresión realizado mediante la administración crónica de corticosterona en agua de bebida. Este modelo es muy utilizado para provocar cambios comportamentales de tipo anhedonia o indefensión aprendida, característicos de la patología depresiva (Ardayfio & Kim, 2006; David et al, 2009; Deroche et al, 1993; Gourley & Taylor, 2009).

Los animales con  $\beta$ -catenina estabilizada *naïve* (sin corticosterona) presentan una conducta antidepresiva y ansiolítica más clara dos meses después de la inducción del transgénico, que se corresponde con lo descrito tras el tratamiento crónico con antidepresivos en los que se incrementa  $\beta$ -catenina en la capa subgranular del giro dentado del *hipocampo* (Mostany et al, 2008; Pascual-Brazo et al, 2012). Además de por el incremento en marcadores de proliferación, los beneficios comportamentales que exhiben podrían estar en parte mediados por mecanismos independientes de neurogénesis hipocampal, pero dependientes de neuroplasticidad en otras áreas cerebrales de gran relevancia en depresión como la *corteza prefrontal* (Pittenger & Duman, 2008), o de cambios en sistemas de neurotransmisión, como ya hemos indicado anteriormente, como el sistema serotoninérgico (mediante desensibilización de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>). Estos bajos niveles del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub>, o de su funcionalidad se han relacionado con una respuesta más activa ante situaciones de estrés, y a un fenotipo resiliente a modelos de estrés crónico suave (*chronic mild stress*) (Richardson-Jones et al, 2010). En la misma línea, se ha descrito que  $\beta$ -catenina induce la síntesis de BDNF, regulador importante tanto de la neurogénesis (Rossi et al, 2006a; Scharfman et al, 2005), como de los efectos conductuales antidepresivos (Li et al, 2008; Sairanen et al, 2005; Schmidt & Duman, 2010).

Por ello, sería interesante estudiar los niveles del factor neurotrófico así como de su receptor TrkB en estos animales.

La administración crónica de corticosterona en los animales que presentan  $\beta$ -catenina estabilizada, indujo un menor efecto pro-depresivo y ansiogénico que en sus respectivos *wildtype*. Teniendo en cuenta el fenotipo ansioso/depresivo característico del modelo (David et al, 2009; Rainer et al, 2012), la estabilización condicional de  $\beta$ -catenina en la capa subgranular del giro dentado hipocampal, confiere a los animales resistencia frente a la inducción del estado patológico del modelo, resultando en un *fenotipo resistente* o *resiliente*. Esta misma característica se ha descrito tras la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina en *núcleo accumbens* (Dias et al, 2014), apoyando la importancia que tiene esta proteína en conferir un fenotipo conductual más adaptable a situaciones de estrés. Esta conducta resiliente se ha relacionado con la proteína Dicer1, que permiten la expresión de diversos miRNAs que tienen múltiples genes diana, entre los que se encuentran genes que regulan las sinapsis glutamatérgicas, o el gen del receptor 5-HT<sub>4</sub> (Dias et al, 2014).

La administración exógena de glucocorticoides, así como la exposición a estrés crónico, producen una reducción de la neurogénesis hipocampal (Brummelte & Galea, 2010; Cameron & Gould, 1994; David et al, 2009). Por el contrario, la neurogénesis hipocampal se ha definido como mecanismo de resistencia al estrés (Levone et al, 2015). Así, esta conducta de los animales que estabilizan  $\beta$ -catenina se podría explicar a través de cambios en la neuroplasticidad asociados al papel de esta proteína en membrana en asociación a N-caderina (Okuda et al, 2007; Uchida et al, 1996). Por todo lo comentado, estudiando en profundidad la proliferación y la neurogénesis, así como la densidad y morfología de la arborización y espinas dendríticas en estos animales tratados crónicamente con corticosterona, podríamos determinar si el fenotipo resistente que muestran los animales, se correlaciona con aumentos de fenómenos proliferativos y neuroplásticos.

En conjunto estos resultados sugieren que la vía de señalización a través de  $\beta$ -catenina puede contribuir tanto a la etiología del trastorno depresivo, como al desarrollo de resistencia o resiliencia al mismo.

## mTOR

### **4. SILENCIAMIENTO *IN VIVO* DE mTOR EN mPFCx: CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL, NEUROQUÍMICA Y MOLECULAR**

La segunda parte de este trabajo de tesis, gira en torno al silenciamiento *in vivo* de la proteína mTOR mediante la infusión intracerebral y unilateral de moléculas de siRNA específicas para mTOR en la *corteza prefrontal medial*. De forma aguda se administraron en la *corteza infralímbica* y la *corteza prelímbica* mientras que en el tratamiento subcrónico (7días) únicamente en la *corteza infralímbica*. La discusión de esta parte del trabajo se realizará integrando los dos tratamientos para evitar ser repetitivos en los argumentos de la evaluación del efecto del silenciamiento de mTOR sobre la conducta.

La ketamina, antagonista del receptor NMDA de glutamato, muestra una rápida y sostenida acción antidepresiva, que además es efectiva en pacientes resistentes (Berman et al, 2000; Zarate et al, 2006). En la búsqueda de los mecanismos moleculares que median la acción de la ketamina, así como de otros moduladores directos o indirectos del sistema glutamatérgico como los antagonistas de los receptores mGluR2/3 (Dwyer et al, 2012), o la administración del péptido leucina-isoleucina (Leu-Ile) (Furukawa-Hibi et al, 2011), señalan la vía de mTOR como la mediadora del efecto antidepresivo rápido y eficaz (Abdallah et al, 2015; Li et al, 2010a; Li et al, 2011; Liu et al, 2013; Szewczyk et al, 2015; Zhou et al, 2014).

## 4.1. SILENCIAMIENTO DE mTOR EN LA CORTEZA IL: CAMBIOS CONDUCTUALES

La gran mayoría de las investigaciones preclínicas realizadas hasta el momento que pretenden evidenciar los mecanismos por los cuales la administración de ketamina u otros compuestos antagonistas del receptor NMDA de glutamato ejercen sus efectos antidepresivos rápidos, se han centrado en la *corteza prefrontal medial*. No es de extrañar, ya que como se comentó previamente, esta estructura junto con el *hipocampo*, presenta una plasticidad sináptica muy sensible al estrés, lo que provoca alteraciones a nivel celular, atrofia dendrítica y pérdidas neuronales y gliales, tanto en humano como en modelos animales (Drevets, 1998; Liu & Aghajanian, 2008; Rajkowska et al, 1999). En nuestro caso, escogimos esta área cerebral por su elevada relación con la patología, así como por el importante papel que juega la vía de mTOR en el efecto antidepresivo rápido de algunos compuestos como la ketamina (Li et al, 2010a). La activación de esta área también está asociada con el efecto antidepresivo rápido de otras estrategias terapéuticas como la estimulación cerebral profunda (Veerakumar et al, 2014). Dentro de la corteza prefrontal, se ha descrito cómo la infusión de ketamina o la activación mediante optogenética en *corteza infralímbica*, y no en *prelímbica*, es capaz de producir efectos antidepresivos (Fuchikami et al, 2015). Por ello, nos planteamos si de forma opuesta, el silenciamiento de mTOR en *corteza infralímbica*, y no en *prelímbica*, podía dar lugar a cambios conductuales y/o neuroquímicos asociados a la patología depresiva.

### 4.1.1. CONDUCTA DE TIPO DEPRESIVO

El silenciamiento de mTOR en la *corteza infralímbica*, pero no en la *prelímbica*, desencadenó una conducta de tipo depresivo tras el tratamiento agudo, que es mantenida al menos durante 48 h. Este mismo efecto pro-depresivo se observó en los animales tras el silenciamiento subcrónico de mTOR en la *corteza infralímbica*. Es la primera vez que se describen los efectos del silenciamiento de mTOR en *corteza infralímbica* sobre la conducta de tipo depresivo. Los escasos trabajos donde se inhibe la vía de mTOR farmacológicamente revelan resultados opuestos. En línea con nuestros resultados, se ha descrito que la administración sistémica crónica de inhibidores de mTOR en ratón (Russo et al, 2016), y en rata (Russo et al, 2013), producen efectos prodepresivos. Además, en

muestras humanas de *corteza prefrontal* de pacientes diagnosticados de depresión mayor, se ha descrito una disminución en la activación de la vía de mTOR (Jernigan et al, 2011). Por el contrario, otros autores describen un efecto antidepresivo/ansiolítico inducido por la administración sistémica crónica de inhibidores de la vía de mTOR (Cambiaghi et al, 2013; Cleary et al, 2008; Halloran et al, 2012), o tras su administración aguda (Cleary et al, 2008; Russo et al, 2014). En nuestro caso, la aplicación de las moléculas de siRNAs para mTOR de forma precisa en la *corteza infralímbica*, evita interferencias debidas a la inhibición de la vía de mTOR en otras áreas cerebrales tras la administración sistémica de compuestos antagonistas, que podrían enmascarar el efecto real de la inhibición de la vía de mTOR sobre la conducta de tipo depresivo.

Además de la conducta de tipo depresivo evaluada mediante el grado de desesperación del animal en el test de la natación forzada o el test de suspensión de la cola, el silenciamiento subcrónico de mTOR en *corteza infralímbica* indujo anhedonia. Este síntoma se ha descrito previamente en tratamientos sistémicos crónicos con inhibidores de mTOR en rata (Russo et al, 2013). Por el contrario, la activación de la vía de mTOR mediante la administración de una sola dosis de ketamina, revierte el estado anhedónico característico de modelos animales como el de estrés crónico impredecible (*chronic unpredictable stress*, CUS) (Li et al, 2011). La reversión de la anhedonia se ha asociado habitualmente con tratamientos crónicos con antidepresivos, pero no agudos o subcrónicos (Willner, 2005). Esta rápida inducción del estado anhedónico tras el silenciamiento subcrónico de mTOR, así como la reversión que se observa de esta conducta tras una sola administración de activadores de la vía, muestra la importancia de la modulación de esta vía para el control de la conducta anhedónica.

En la misma línea, la estimulación de la *corteza infralímbica* mediante optogenética, tiene efectos antidepresivos similares a la ketamina (Fuchikami et al, 2015), produciendo en ratas *naïve* un efecto antidepresivo tras la activación unilateral y bilateral, mientras que la anhedonia sólo se revierte tras la activación bilateral. En este caso, la discrepancia existente entre el efecto anhedónico observado en nuestros resultados tras el silenciamiento subcrónico de mTOR unilateral, y la necesidad de la estimulación bilateral de la corteza infralímbica para inducir un estado hedónico en los animales, posiblemente se deba a que la activación de la corteza infralímbica mediante optogenética se realiza de forma aguda (Fuchikami et al, 2015).

#### 4.1.2. CONDUCTA DE TIPO ANSIOSO

La conducta que determina un tipo de ansiedad etológica (Calhoun & Tye, 2015), se analizó mediante el test de campo abierto (OF) en los animales silenciados para mTOR de forma aguda y subcrónica. Además, se evaluó la actividad locomotora para poder así descartar que la mayor inmovilidad observada en los test de desesperación conductual utilizados para evaluar depresión (FST y TST) en los animales en los que se silenció mTOR en la *corteza infralímbica*, no fuese el resultado de disfunciones motoras. Ambos parámetros, movilidad y ansiedad, no mostraron cambios tras la administración aguda y subcrónica de los siRNAs para mTOR. Esto refleja que el silenciamiento de mTOR tanto en *corteza infralímbica* como en *prelímbica*, no induce cambios asociados a la conducta ansiosa más primaria, en contra del efecto ansiolítico descrito tras la administración sistémica del inhibidor de mTOR rapamicina de forma crónica (Cambiaghi et al, 2013; Fifield et al, 2013; Halloran et al, 2012). Otros autores describen sin embargo, como la administración crónica de un inhibidor de mTOR, produce un efecto ansiogénico en ratones (Russo et al, 2016). Por el contrario, la administración aguda de ketamina no tiene efectos sobre la ansiedad cuando se administra de forma sistémica (Pham et al, 2017), pero administrada en la *corteza infralímbica* muestra efectos ansiolíticos (Fuchikami et al, 2015). Estas discrepancias podrían ser debidas a las diferencias metodológicas como la inhibición crónica *versus* aguda, silenciamiento molecular *versus* farmacológico, cepas de animales utilizadas o administración local *versus* sistémica.

Otro tipo de ansiedad, muy evaluada en modelos animales de depresión debido a su elevada validez predictiva tras tratamientos crónicos con antidepresivos (Santarelli et al, 2003), es la ansiedad conflictiva o hiponeofagia (Calhoun & Tye, 2015). El análisis de esta conducta en los animales silenciados durante 7 días no mostró diferencias en el tiempo de latencia a comer, en oposición con otros autores que describen que el tratamiento crónico con everolimus, inhibidor farmacológico de mTOR provoca un aumento significativo en el tiempo de latencia a comer reflejando el fenotipo ansioso de los animales (Russo et al, 2016). Estas discrepancias podrían deberse, como se ha indicado anteriormente, a diferencias metodológicas, no pudiendo descartar en nuestro caso que el silenciamiento crónico de mTOR pudiera dar lugar a dicha conducta ansiosa.

El efecto ansiogénico que presenta la inhibición de mTOR sistémica, frente a la ausencia de cambios tras el silenciamiento de mTOR local en *corteza IL*, puede estar promovido por el bloqueo de la vía de mTOR en otras áreas relevantes para la conducta ansiosa. Teniendo en cuenta que la activación de la vía de mTOR en otras áreas cerebrales como el *hipocampo* y la *amígdala* se ha relacionado con cambios neuroplásticos que podrían contribuir a un fenotipo ansiolítico, resistente al estrés, y antidepresivo (Lloyd et al, 2017), la inhibición de la vía de mTOR mediante administraciones sistémicas en esas áreas, podría explicar el efecto ansiogénico descrito por otros autores (Russo et al, 2016), así como la ausencia de cambios en ansiedad que observamos en nuestros resultados tras el silenciamiento de mTOR en *corteza infralímbica*.

Los resultados de este apartado sugieren, de forma atractiva, que una desregulación de la señalización mediante la vía de mTOR en *corteza infralímbica* es suficiente para desarrollar una conducta de tipo depresivo, mientras que la conducta ansiosa en ratones no estaría relacionada con la inhibición de esta vía de señalización en *corteza infralímbica*.

## **4.2. SILENCIAMIENTO DE mTOR EN LA mPFCx: CAMBIOS MOLECULARES**

### **4.2.1. INFLUENCIA DEL SILENCIAMIENTO AGUDO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL mRNA DE mTOR**

Para determinar la eficacia del silenciamiento de mTOR en la *corteza prefrontal medial* se realizó una hibridación *in situ* utilizando sondas específicas contra el mRNA que codifica para nuestra proteína diana tras una única infusión de los siRNAs específicos para mTOR. Los estudios de hibridación *in situ* de mTOR revelaron en los animales silenciados en la *corteza IL* una disminución del mRNA para esta proteína tanto en *corteza infralímbica* como *prelímbica*. Por el contrario, los animales silenciados en *corteza PL*, presentaban disminución de la expresión de mTOR solamente en la *corteza PL*, mientras que la IL situada a escasos milímetros por debajo de ésta, no mostró cambios. La disminución del mRNA para mTOR en PL tras la infusión de siRNA para mTOR en IL, sugiere que tras la retirada de la aguja con la que se administraron las moléculas de siRNA intracerebralmente, se pudo producir un reflujo de las moléculas de siRNA que afectaron también a la PL. A

pesar de este epifenómeno, podemos estar seguros de que el silenciamiento en *corteza PL* no ha influido en los resultados depresogénicos observados en los animales silenciados en la *corteza IL*, ya que el silenciamiento específico en la *corteza PL* no conlleva ningún efecto en la conducta de los animales.

La reducción de la expresión de mTOR tendrá que ser confirmada evaluando la expresión de la proteína de mTOR mediante inmunohistoquímica. Además, el estudio de otras proteínas importantes en plasticidad sináptica como es la PSD-95, cuya expresión se encuentra regulada por la vía de mTOR, y cuyos niveles se encuentran disminuidos en modelos animales de depresión (Seese et al, 2013), e incrementados tras tratamientos antidepresivos que median su efecto por la activación de esta vía (Li et al, 2010a; Li et al, 2011), nos ayudará a evaluar el alcance del silenciamiento de mTOR.

#### **4.2.2. INFLUENCIA DEL SILENCIAMIENTO AGUDO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL mRNA DE BDNF**

Cambios en los niveles de factores tróficos como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), se han asociado con las alteraciones sinápticas inducidas por estrés, así como por el efecto antidepresivo (Duman & Monteggia, 2006). En relación al efecto antidepresivo de la ketamina, u otros compuestos que actúan mediante la activación de la vía de mTOR, diversos trabajos proponen que aumentos en los niveles de BDNF contribuyen a tal efecto en roedores (Garcia et al, 2008; Szewczyk et al, 2015; Zhou et al, 2014). Es más, la activación de la vía de mTOR produce una disminución de la fosforilación del factor eucariótico de elongación eEF2, y el posterior incremento de la síntesis de BDNF (Autry et al, 2011). Por ello, nos planteamos la posibilidad de que los niveles de BDNF pudieran estar alterados tras el silenciamiento de mTOR, influyendo de este modo en la conducta de tipo depresivo que presentan estos animales.

Los resultados mostraron en los animales en los que se silenció mTOR en *corteza infralímbica*, una disminución de los niveles del mRNA de BDNF tanto en la región ipsilateral como contralateral de dicha estructura y en la región ipsilateral de la *corteza prelímbica*. Esta disminución de BDNF en *corteza prefrontal* paralela a la conducta de tipo depresivo de nuestros animales, está en línea con lo descrito en modelos animales de estrés (Castren & Rantamaki, 2010a; Duman & Monteggia, 2006; Krishnan & Nestler, 2008), así

como en muestras *postmortem* de pacientes diagnosticados de depresión mayor (Duman & Monteggia, 2006). En línea con la modulación de BDNF mediada por esta vía (Autry et al, 2011), el silenciamiento de mTOR en nuestros animales podría estar modulando la forma fosforilada del factor eEF2, con la consecuente disminución de la expresión de BDNF en esas áreas.

Sin embargo, la presencia de una reducción de la expresión de BDNF también en la *corteza infralímbica* contralateral (izquierda) en los animales en los que se silenció mTOR unilateralmente en la *corteza infralímbica*, no concuerda con niveles bajos de mTOR contralateral, no pudiendo relacionarse con un efecto directo del silenciamiento de mTOR. Por ello, la alteración en la expresión de BDNF en la región contralateral podría estar asociada a cambios en la circuitería de estas estructuras y sus proyecciones (Riga et al, 2014). En este sentido, una desregulación de uno de los hemisferios podría conllevar cambios en el opuesto por ejemplo, ya que las conexiones entre el área izquierda de la *corteza prefrontal medial* participan en la inhibición interhemisférica de las respuestas emocionales al estrés que dependen del lado derecho (Sullivan, 2004). Esto es congruente con que en los últimos años los trastornos mentales se han definido como “conectopatías”, con complejos mecanismos patológicos localizados a nivel de los circuitos y sus comunicaciones (Bargmann & Lieberman, 2014). Así, la alteración de la plasticidad sináptica de la *corteza prefrontal medial* podría afectar a las comunicaciones bidireccionales con las estructuras subcorticales, reflejándose a nivel de las reducciones observadas en BDNF.

La *corteza prefrontal medial* es además un área implicada en el control de las situaciones de estrés, modulando la respuesta neuroendocrina a través del eje HPA (Diorio et al, 1993; Herman & Cullinan, 1997; Lee et al, 2015). En concreto, se ha descrito la implicación preferencial de la *corteza prefrontal medial* derecha en la modulación de la respuesta fisiológica al estrés (Sullivan & Gratton, 1999). En nuestro caso, el silenciamiento de mTOR que se realizó en la *corteza infralímbica* derecha, podría conducir a una deficiencia en la activación del eje HPA y por lo tanto a una respuesta inadecuada al estrés. Este tipo de deficiencias en el control del estrés, o la presencia de una respuesta exagerada al mismo, se ha relacionado con patologías como la depresión mayor (Gotlib et al, 2008; Pariante & Lightman, 2008). Es más, el desbalance entre la activación de los

hemisferios derecho e izquierdo también se ha asociado con estados depresivos (George et al, 1996; Henriques & Davidson, 1991; Schaffer et al, 1983).

#### **4.2.3. INFLUENCIA DEL SILENCIAMIENTO SUBCRÓNICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE c-FOS**

Para profundizar en los efectos del silenciamiento de mTOR durante 7 días en la *corteza infralímbica*, se analizó mediante inmunohistoquímica la expresión de la proteína c-Fos, que se considera como marcador de actividad neuronal (Dragunow & Faull, 1989), en la *corteza prefrontal medial* y el *núcleo dorsal del rafe*. De las diferentes vías que parten de la mPFCx, una de las más relevantes es la que va al *núcleo dorsal del rafe*, ya que la activación mediante esta vía de interneuronas GABAérgicas situadas en el DRN conduce a una inhibición de la descarga de las neuronas serotoninérgicas, lo que se ha relacionado con efectos prodepresivos (Challis et al, 2014). Además, se ha propuesto que la conexión mPFCx-DRN puede contribuir al efecto antidepresivo de la ketamina (Pham et al, 2017), aunque no es la única conexión propuesta, por lo que sería de gran interés analizar la expresión de esta proteína en otras estructuras como la *amígdala* (Myers-Schulz & Koenigs, 2012). La cuantificación de células positivas para c-Fos en el DRN, donde se encuentran los somas de las neuronas serotoninérgicas, no mostró variaciones significativas dando a entender que la inactivación de mTOR, no tiene consecuencias en esta área al menos a través de este tipo de análisis. Estos datos concuerdan con un estudio publicado recientemente, en el que la exposición al estrés no promueve cambios en la expresión de c-Fos en DRN (Pizzo et al, 2017), mientras que otros autores describen un incremento (de Medeiros et al, 2005). Por el contrario, estrategias antidepresivas en las que se estimula la *corteza infralímbica* en ratas mediante DBS no presentan cambios de la expresión de c-Fos en DRN (Jimenez-Sanchez et al, 2016), mientras que otros autores describen un incremento de la expresión de esta proteína (Veerakumar et al, 2014).

La expresión de c-Fos también se determinó en las subregiones de la *corteza prefrontal medial* tanto ipsi- como contralateral de los animales sometidos a la administración subcrónica de siRNAs contra mTOR. Mientras en las *cortezas infralímbica* y *prelímbica* contralaterales se observan tendencias a un mayor número de células positivas para c-Fos, en las áreas ipsilaterales de los animales silenciados para mTOR, la expresión

de c-Fos no sufrió ningún cambio. Este resultado, podría explicarse por el papel que tiene la vía de mTOR sobre la expresión de c-Fos. Estudios en cultivos celulares han descrito que la inhibición de la vía de mTOR bloquea la fosforilación de 4EBP1, produciéndose una reducción de la síntesis de c-Fos (Takeuchi et al, 2001). Además, como hemos indicado anteriormente, la *corteza prefrontal medial* izquierda (contralateral), juega un importante papel en la regulación de la parte derecha (Sullivan, 2004), por lo que el incremento de la activación de c-Fos en este hemisferio, podría evidenciar un intento de modulación de la actividad de la mPFCx derecha.

Las funciones de las *cortezas infralímbica* y *prelímbica* son opuestas. Por un lado, la inactivación de la IL conduciría a un efecto antidepresivo (Slattery et al, 2011), mientras que la obtención del mismo resultado conductual se obtiene mediante la activación de la PL (Kumar et al, 2013). Sin embargo, los resultados obtenidos de la expresión de c-Fos nos indican una ausencia de cambios en el sitio de infusión. A su vez, la *corteza infralímbica* realiza un papel inhibitor sobre la *corteza prelímbica*, y de activación sobre regiones subcorticales (Ji & Neugebauer, 2012), por lo que un mal funcionamiento de esta *corteza infralímbica* podría dar lugar a una desregulación de estas conexiones, como las existentes con *núcleo accumbens* (Britt et al, 2012), o con el *núcleo dorsal del rafe* (Challis et al, 2014), dando como resultado los cambios observados en la conducta depresiva.

Estudios de colocalización mediante inmunofluorescencia para estudiar qué poblaciones neuronales (serotonérgicas, glutamatérgicas y/o gabaérgicas) están expresando la proteína c-Fos en las diferentes áreas estudiadas, daría más luz a esta parte con la que hoy por hoy sólo podemos especular. Más aún, estos resultados de expresión de c-Fos no están realizados en su pico máximo de expresión dos horas después del estímulo (Nestler et al, 2001), por lo que el estudio de la respuesta aguda a estrés dentro de este periodo, nos podría mostrar de forma más precisa la respuesta en áreas como la *corteza infralímbica* relacionada con depresión (Etkin, 2010; Mayberg et al, 1999), o con respuestas maladaptativas al estrés (Wang et al, 2014).

#### **4.2.4. INFLUENCIA DEL SILENCIAMIENTO SUBCRÓNICO SOBRE LA PROLIFERACIÓN HIPOCAMPAL**

Ya se ha comentado en este trabajo que la hipótesis neurotrófica postula una disminución de la proliferación hipocampal en el estado depresivo (Duman & Li, 2012), y por el contrario, el requerimiento de la proliferación y neurogénesis para que determinados fármacos antidepresivos ejerzan sus efectos en modelos animales de depresión (David et al, 2009; Santarelli et al, 2003). Atendiendo a los resultados presentados en esta tesis, hemos visto como una disminución de la proteína  $\beta$ -catenina en la zona subgranular del giro dentado del *hipocampo*, promueve una disminución de la proliferación en hipocampo, acompañada de una respuesta conductual de tipo ansioso/depresivo. Por ello, quisimos determinar si el silenciamiento subcrónico de mTOR en *corteza infralímbica*, producía cambios en la proliferación en giro dentado del *hipocampo* que pudiera explicar en parte la conducta depresiva. El análisis mediante inmunohistoquímica de la proteína nuclear Ki67, comúnmente utilizada como marcador de proliferación (Scholzen & Gerdes, 2000), no mostró alteraciones, por lo que el silenciamiento de mTOR no implica cambios proliferativos en el giro dentado del *hipocampo*, al menos tras el silenciamiento subcrónico de mTOR. Este resultado está en línea con la ausencia de cambios de BDNF que hemos observado en el *hipocampo*. No descartamos sin embargo, que silenciamiento de mTOR de forma crónica pudiera dar lugar a modificaciones en proliferación, como el incremento descrito después de tres semanas de la administración de un inhibidor de esta vía (Russo et al, 2016).

#### **4.3. SILENCIAMIENTO DE mTOR EN LA CORTEZA IL: INFLUENCIA SOBRE LA LIBERACIÓN DE 5-HT EN DRN**

Dentro de los posibles mecanismos de acción de la ketamina y los antagonistas de los receptores metabotrópicos de glutamato mGlu2/3 en la respuesta antidepresiva y ansiolítica, se ha descrito la implicación de la neurotransmisión serotoninérgica, confirmada mediante el bloqueo del efecto antidepresivo tras la administración del inhibidor de la TPH para-clorofenilalanina (PCPA) (Fukumoto et al, 2014; Pham et al, 2017). Además, las proyecciones de la *corteza prefrontal medial* juegan un papel importante sobre la regulación del *núcleo dorsal del rafe*, estructura de gran relevancia en la patología

depresiva y su tratamiento (Arango et al, 2002). Por ello, nos planteamos determinar si el silenciamiento agudo de mTOR en *corteza infralímbica* producía alteraciones en los niveles y modulación de la liberación del neurotransmisor serotonina en el *DRN*, estructura cuya actividad se encuentra regulada mediante proyecciones neuronales procedentes de la *corteza infralímbica*. Esto nos permitiría formular una hipótesis del efecto pro-depresivo que induce el silenciamiento de mTOR en *corteza IL* basándonos en evidencias moleculares.

Los niveles basales de serotonina en los dos grupos experimentales fueron similares, sugiriendo que los sistemas participantes en el control de la liberación de 5-HT en las inmediaciones de los somas de las neuronas serotonérgicas no han sufrido cambios después del silenciamiento agudo de mTOR. Es más, la administración local de veratridina que provoca una despolarización química, activando los canales de  $\text{Na}^+$ , no mostró diferencias en las áreas bajo la curva de cada grupo lo que indica que, de forma basal, el patrón de liberación del neurotransmisor es similar. Sin embargo, en la curva de liberación de neurotransmisor frente al tiempo, se aprecia un ligero desplazamiento de la curva hacia la derecha en los animales silenciados para mTOR en *corteza infralímbica*, sugiriendo un retraso en la respuesta al estímulo. Este efecto podría ser concomitante al silenciamiento de mTOR, ya que la inhibición de esta vía provoca un aumento de la expresión de los canales de potasio Kv1.1, incrementando el umbral de excitabilidad, hecho que se ha asociado con una reducción de convulsiones en epilepsia (Niere & Raab-Graham, 2017; Raab-Graham et al, 2006).

La administración local de dos dosis diferentes de bicuculina —antagonista del receptor  $\text{GABA}_A$ —, intra-DRN, elimina la acción inhibitoria de las interneuronas  $\text{GABA}_A$ érgicas que regulan la actividad de las neuronas serotonérgicas en este núcleo. Las áreas bajo la curva de ambas dosis de bicuculina no mostraron diferencias en los niveles de 5-HT entre los animales con mTOR silenciado en *corteza infralímbica* y sus controles. En cambio, se aprecia un diferente perfil de respuesta en la liberación de 5-HT en los animales silenciados, observándose un mayor y más rápido pico de liberación del neurotransmisor, tras la administración de la dosis de bicuculina 100  $\mu\text{M}$ , sugiriendo la existencia de un mayor tono  $\text{GABA}_A$ érgico actuando sobre las neuronas serotonérgicas del *núcleo dorsal del rafe*. El control mediado por las neuronas piramidales procedentes de la *corteza prefrontal medial* sobre las neuronas serotonérgicas del DRN se produce a través de conexiones

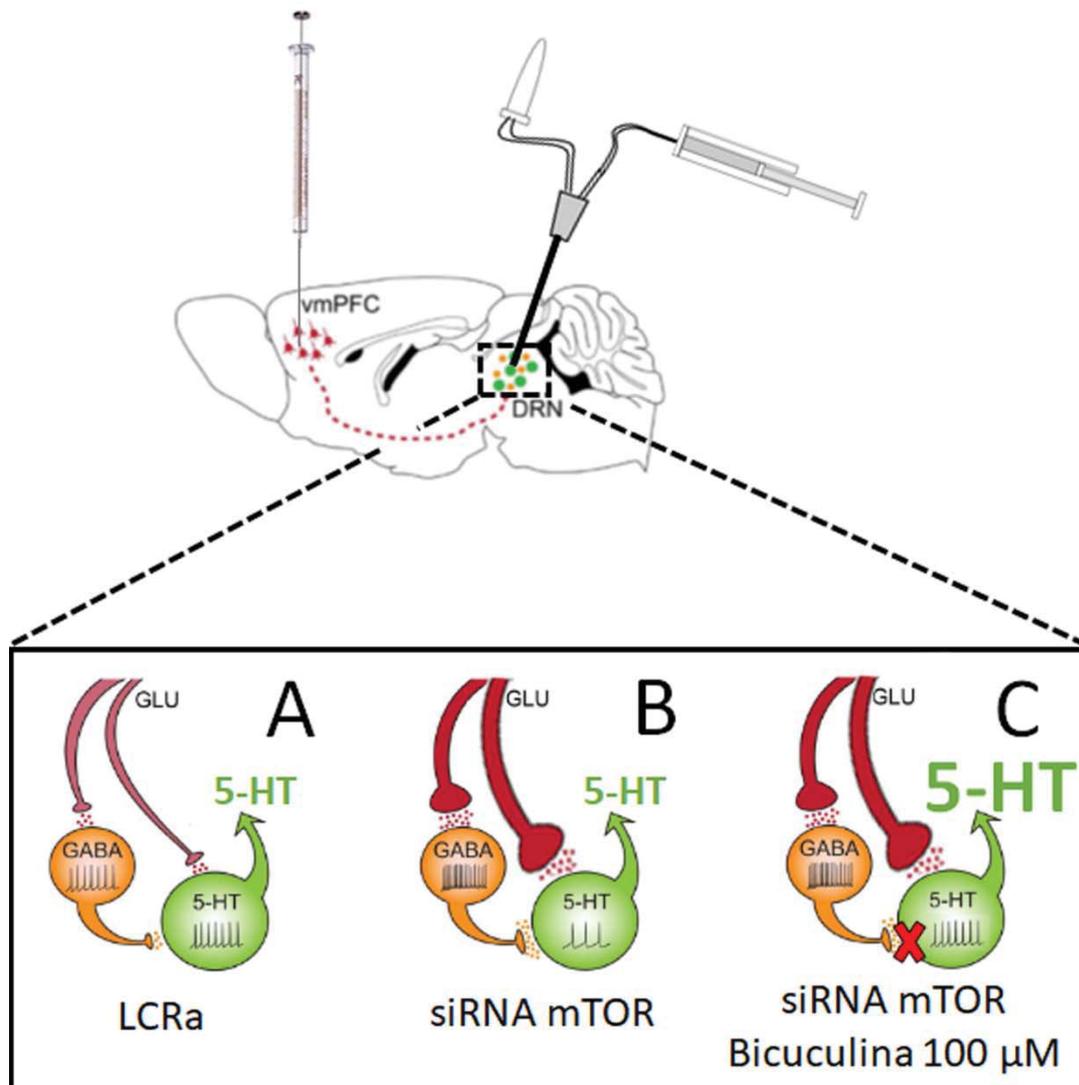
directas, o bien de forma indirecta a través de conexiones GABAérgicas (Celada et al, 2001), si bien algunos autores describen una predominancia de la conexión GABAérgica (Jankowski & Sesack, 2004) o de la conexión glutamatérgica (Mokler et al, 2009). El incremento de serotonina observado tras el bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> en nuestros animales con mTOR silenciado en *corteza IL*, sugiere un mayor tono inhibitorio en el DRN, que apunta a la posible existencia de un mayor tono excitatorio procedente de la *corteza infralímbica*. Esta hipótesis se sustenta en trabajos en los que se ha descrito un pico rápido de liberación de 5-HT en DRN en respuesta a la infusión de glutamato (Mokler et al, 2009). La rápida disminución de los niveles de serotonina en el núcleo dorsal del rafe podría estar mediado por la activación de autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> en esta estructura, como se ha descrito previamente tras la estimulación directa del DRN mediante glutamato (Mokler et al., 2009).

Otros trabajos indican además la disminución de la excitabilidad de neuronas serotonérgicas, y un incremento de la inhibición por hiperexcitabilidad de las interneuronas GABAérgicas en el *núcleo dorsal del rafe* en modelos de depresión como el de “derrota social” (*social defeat*) (Challis et al, 2014; Challis et al, 2013), además, de un aumento de glutamato en DRN por la activación de vías procedentes de la *corteza infralímbica* (Challis et al, 2014; Challis et al, 2013; Venzala et al, 2013).

Basándonos en nuestros resultados y los datos publicados, planteamos como hipótesis la sobreactivación de la vía glutamatérgica mPFCx-DRN. El efecto directo sobre neuronas serotonérgicas e indirecto sobre GABAérgicas, no promovería cambios en los niveles basales de serotonina liberados. Sin embargo, el bloqueo de la señal inhibitoria ejercido por GABA permite visualizar ese elevado tono excitatorio (glutamato) (fig. 65). Experimentos adicionales son necesarios para determinar de forma precisa la modulación del circuito mPFCx-DRN en los animales tras el silenciamiento de mTOR en *corteza infralímbica*.

Los resultados de los que disponemos hasta la fecha muestran la *validez de constructo o etiológico*, debido a la disminución de mTOR en PFCx, en paralelo a los estudios en muestras *postmortem* de pacientes diagnosticados con depresión mayor (Jernigan et al, 2011). Es más, también presentan *validez aparente*, determinada a través de los test conductuales que muestran signos asociados a síntomas presentes en los pacientes

de esta enfermedad, como es el estado anhedónico. Por esto, las evidencias aquí expuestas sugieren que nuestros animales podrían ser un buen modelo animal de depresión.



**Figura 65.** Hipótesis neuroquímica de las posibles adaptaciones en la circuitería *vmPFC-DRN* tras el silenciamiento agudo de mTOR en la corteza IL. El esquema muestra el estado de la circuitería en condiciones normales (administración de LCRa) (A), tras el silenciamiento de mTOR (B), y tras la administración local de bicuculina en animales siRNA-mTOR (C). El silenciamiento de mTOR estaría induciendo una potenciación de la vía excitatoria glutamatérgica desde la *vmPFC* al *DRN* (B). La infusión del antagonista GABA<sub>A</sub> bicuculina en *DRN* eliminaría el control GABA sobre la actividad serotoninérgica, provocando por tanto el aumento en la liberación de 5-HT perisomática (C). Modificado de Challis *et al.* 2015.

## 5. ESTUDIO DE LA VÍA DE mTOR EN MUESTRAS *POSTMORTEM* DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE DEPRESIÓN MAYOR

En la actualidad sólo existe un trabajo que asocia la disfuncionalidad de la vía de mTOR con la patología depresiva en cerebro humano *postmortem* (Jernigan et al, 2011). En este estudio se muestra como en la *corteza frontal* de pacientes diagnosticados con depresión mayor, se encuentran disminuidos los niveles de mTOR y sus efectores p70S6K y eIF4B. Por lo tanto, en nuestro estudio, quisimos dar un paso más y comprobar por primera vez, si los antidepresivos de uso en clínica regulaban esta vía de señalización en muestras de cerebro humano *postmortem*, de forma paralela a lo observado en estudios preclínicos (Dagestad et al, 2006; Liu et al, 2015). Nuestros resultados no mostraron diferencias en la expresión de mTOR a nivel de mRNA entre los controles y los grupos de pacientes tratados o sin tratar. En relación a la expresión a nivel de proteína, el grupo de pacientes diagnosticados de depresión mayor sin tratar no mostró diferencias en mTOR, en contra de lo descrito previamente (Jernigan et al, 2011). Sin embargo, estos autores no estudiaron la proteína fosforilada y, por lo tanto, la forma activa de mTOR. En este sentido, en nuestras muestras observamos un aumento significativo del ratio de proteína mTOR fosforilada frente a la total en las muestras de pacientes tratados con antidepresivos frente a los no tratados, indicando que estos antidepresivos de uso común en clínica, administrados de forma crónica, aumentarían la actividad de la vía de mTOR en FCx. Estos resultados están en línea con lo que se ha descrito para estudios preclínicos con antidepresivos clásicos como el escitalopram y la paroxetina en *hipocampo* (Park et al, 2014) y otros de acción rápida como la ketamina en PFCx, (Li et al, 2010a) mientras que antidepresivos comunes como la fluoxetina no modulan la vía de mTOR (Park et al, 2014).

El estudio de los efectores de la cascada de señalización que se encuentran por debajo de mTOR se realizó determinando los niveles de 4EBP1, su forma fosforilada y de p70S6K. La proteína 4EBP1 se encuentra unida al factor de iniciación de la traducción eIF4E, bloqueando así la expresión de proteínas específicas. La activación de 4EBP1 tras su fosforilación mediada por mTOR, induce el desbloqueo del factor eIF4E (Laplante & Sabatini, 2009). En nuestros resultados observamos una disminución, aunque no

estadísticamente significativa en el grupo libre de antidepresivo con respecto al grupo control, que estaría en línea con la disminución de la vía que se ha descrito en *corteza prefrontal* de cerebros *postmortem* de suicidas diagnosticados con el trastorno (Jernigan et al, 2011). Con respecto a la forma fosforilada, no se observó una reversión en el grupo de pacientes tratados con antidepresivos, en contraste al efecto que se describe en estudios en *hipocampo* de roedores tras el tratamiento con antidepresivos de uso en clínica (Park et al, 2014) o de la ketamina (Li et al, 2010a). En nuestro caso, las muestras *postmortem* utilizadas proceden de cerebros de pacientes suicidas, por lo que podemos sugerir que la falta de reversión de la fosforilación en 4-EBP1, se podría correlacionar con una ausencia de efecto antidepresivo. La falta de fosforilación de 4EBP1 en este caso parece necesaria para la instauración de un completo efecto antidepresivo. En este estudio no obtuvimos resultados significativos, posiblemente debido al bajo número de muestras de las que disponíamos, así como a la gran heterogeneidad que presentan las muestras humanas en comparación con las de los animales de experimentación (Ferrer et al, 2007; Siew et al, 2004). Los estudios de expresión génica de la proteína 4EBP1 revelaron una disminución significativa a nivel de su mRNA, en los individuos diagnosticados de depresión, sin y con tratamiento, lo que correlaciona con la tendencia observada para esta proteína. Cabe destacar que aunque en nuestro caso los resultados encontrados en proteína y mRNA son paralelos, la utilización de los niveles de mRNA para la predicción de los niveles de proteína no siempre correlaciona de forma directa (Guo et al, 2008). Como comentamos previamente, la peculiaridad de que los niveles de mRNA también se encuentren disminuidos en las muestras tratadas, podría indicar la incapacidad de los antidepresivos de modular esta vía y la carencia de efecto antidepresivo en los sujetos.

En referencia al estudio de la vía a través del efector p70S6K, sólo se pudieron realizar los estudios de su expresión a nivel de mRNA los niveles del cual, no presentaron diferencias entre los grupos experimentales. De forma indirecta, los resultados no apoyan el único estudio que existe sobre el estudio de la vía en humanos ya que, éste muestra una reducción de los niveles de la proteína p70S6K (Jernigan et al, 2011).

Los resultados obtenidos en muestras de pacientes apoyan la importancia de la activación de mTOR en la respuesta al tratamiento antidepresivo, si bien la activación de 4EBP1 parece un punto clave para la obtención de un efecto antidepresivo completo.

## **VI. CONCLUSIONES**



1. La eliminación de  $\beta$ -catenina en células del giro dentado del *hipocampo* que expresan GLAST induce una conducta de tipo depresivo/ansioso, y una reducción de la proliferación y neurogénesis hipocampal. Además, ello se acompaña de una reducción de la funcionalidad del heterorreceptor 5-HT<sub>1A</sub>, y un incremento de la funcionalidad del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> *in vivo*; la reducción de la funcionalidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en áreas como el *hipotálamo* y del receptor 5-HT<sub>4</sub> en *estriado*; y una disminución de la liberación de serotonina en respuesta a la administración de veratridina. El tratamiento subcrónico con la molécula de perfil antidepressivo RS67,333 induce un efecto antidepressivo en el ratón en el cual se ha eliminado la  $\beta$ -catenina en nichos proliferativos hipocampales, revirtiendo la funcionalidad del heterorreceptor 5-HT<sub>1A</sub>.
2. En su conjunto, estos resultados revelan la importancia de  $\beta$ -catenina en el establecimiento de la conducta depresiva/ansiosa conjuntamente con su papel en la proliferación/neurogénesis hipocampal, reforzando además la función reguladora del sistema serotoninérgico, que conlleva cambios asociados a la patología depresiva.
3. La estabilización de  $\beta$ -catenina en el giro dentado del *hipocampo* en células que expresan GLAST induce una conducta de tipo ansiolítica/antidepressiva, además de un incremento de la proliferación hipocampal y una disminución de la funcionalidad del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub>.
4. La estabilización de  $\beta$ -catenina en nichos proliferativos del *hipocampo* muestra un fenotipo resiliente en un modelo animal de la enfermedad.
5. El silenciamiento unilateral de mTOR en *corteza infralímbica* y no en *prelímbica* induce un fenotipo de tipo depresivo y no ansioso. Este silenciamiento va asociado a una reducción del mRNA de BDNF en *corteza infralímbica* ipsi y contralateral, y a cambios en la regulación gabaérgica del *núcleo dorsal del rafe*.
6. En muestras *postmortem* de pacientes con depresión mayor tratados con antidepressivos se observa un incremento de la activación de mTOR en *corteza frontal*. El efector 4EBP1 no muestra cambios en respuesta al tratamiento.
7. El presente estudio demuestra la relevancia de las vías de Wnt/ $\beta$ -catenina y mTOR en la etiopatogenia de la depresión mayor, por lo que podrían considerarse dianas terapéuticas de interés para la búsqueda de nuevos fármacos antidepressivos.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Abdallah CG, Sanacora G, Duman RS, Krystal JH (2015) Ketamine and rapid-acting antidepressants: a window into a new neurobiology for mood disorder therapeutics. *Annu Rev Med* **66**: 509-523
- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* **16**: 3797-3804
- Adachi K, Mirzadeh Z, Sakaguchi M, Yamashita T, Nikolcheva T, Gotoh Y, Peltz G, Gong L, Kawase T, Alvarez-Buylla A, Okano H, Sawamoto K (2007) Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells* **25**: 2827-2836
- Adell A, Artigas F (1991) Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An in vivo brain microdialysis study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **343**: 237-244
- Adell A, Artigas F (1998) A microdialysis study of the in vivo release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat. *Br J Pharmacol* **125**: 1361-1367
- Adell A, Carceller A, Artigas F (1991) Regional distribution of extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the brain of freely moving rats. *J Neurochem* **56**: 709-712
- Adell A, Castro E, Celada P, Bortolozzi A, Pazos A, Artigas F (2005) Strategies for producing faster acting antidepressants. *Drug Discov Today* **10**: 578-585
- Adell A, Celada P, Abellan MT, Artigas F (2002) Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev* **39**: 154-180
- Adell A, Celada P, Artigas F (2001) The role of 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the regulation of serotonin cell firing and release in the rat brain. *J Neurochem* **79**: 172-182
- Akimova E, Lanzenberger R, Kasper S (2009) The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biol Psychiatry* **66**: 627-635
- Aksoz E, Aksoz T, Bilge SS, Ilkaya F, Celik S, Diren HB (2008) Antidepressant-like effects of echo-planar magnetic resonance imaging in mice determined using the forced swimming test. *Brain Res* **1236**: 194-199
- Albert PR, Lemonde S (2004) 5-HT<sub>1A</sub> receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist* **10**: 575-593
- Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C (2014) Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression. *Front Behav Neurosci* **8**: 199
- Alex KD, Pehek EA (2007) Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther* **113**: 296-320
- Alonso R, Griebel G, Pavone G, Stemmelin J, Le Fur G, Soubrie P (2004) Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. *Mol Psychiatry* **9**: 278-286, 224
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* **124**: 319-335
- American Psychiatric Association (2014) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), APA Press
- Amigo J, Diaz A, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Martin A, Compan V, Pazos A, Castro E (2016) The absence of 5-HT<sub>4</sub> receptors modulates depression- and anxiety-like responses and influences the response of fluoxetine in olfactory bulbectomised mice: Adaptive changes in hippocampal neuroplasticity markers and 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor. *Neuropharmacology* **111**: 47-58
- Andersen SL, Teicher MH (2008) Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends Neurosci* **31**: 183-191

- Andrade R, Chaput Y (1991) 5-Hydroxytryptamine<sub>4</sub>-like receptors mediate the slow excitatory response to serotonin in the rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* **257**: 930-937
- Andrade R, Malenka RC, Nicoll RA (1986) A G protein couples serotonin and GABA<sub>B</sub> receptors to the same channels in hippocampus. *Science* **234**: 1261-1265
- Andrews PW, Thomson JA, Jr. (2009) The bright side of being blue: depression as an adaptation for analyzing complex problems. *Psychol Rev* **116**: 620-654
- Anisman H, Du L, Palkovits M, Faludi G, Kovacs GG, Szontagh-Kishazi P, Merali Z, Poulter MO (2008) Serotonin receptor subtype and p11 mRNA expression in stress-relevant brain regions of suicide and control subjects. *J Psychiatry Neurosci* **33**: 131-141
- Ansanay H, Sebben M, Bockaert J, Dumuis A (1996) Pharmacological comparison between [3H]GR 113808 binding sites and functional 5-HT<sub>4</sub> receptors in neurons. *Eur J Pharmacol* **298**: 165-174
- Anthony JP, Sexton TJ, Neumaier JF (2000) Antidepressant-induced regulation of 5-HT(1b) mRNA in rat dorsal raphe nucleus reverses rapidly after drug discontinuation. *J Neurosci Res* **61**: 82-87
- Anttila S, Huuhka K, Huuhka M, Rontu R, Hurme M, Leinonen E, Lehtima T (2007) Interaction between 5-HT<sub>1A</sub> and BDNF genotypes increases the risk of treatment-resistant depression. *J Neural Transm* **114**: 1065-1068
- Arango V, Ernsberger P, Marzuk PM, Chen JS, Tierney H, Stanley M, Reis DJ, Mann JJ (1990) Autoradiographic demonstration of increased serotonin 5-HT<sub>2</sub> and beta-adrenergic receptor binding sites in the brain of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* **47**: 1038-1047
- Arango V, Huang YY, Underwood MD, Mann JJ (2003) Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. *J Psychiatr Res* **37**: 375-386
- Arango V, Underwood MD, Gubbi AV, Mann JJ (1995) Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res* **688**: 121-133
- Arango V, Underwood MD, Mann JJ (2002) Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Prog Brain Res* **136**: 443-453
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* **160**: 1-12
- Ardafio P, Kim KS (2006) Anxiogenic-like effect of chronic corticosterone in the light-dark emergence task in mice. *Behav Neurosci* **120**: 249-256
- Arora RC, Meltzer HY (1989) Serotonergic measures in the brains of suicide victims: 5-HT<sub>2</sub> binding sites in the frontal cortex of suicide victims and control subjects. *Am J Psychiatry* **146**: 730-736
- Arranz B, Eriksson A, Mellerup E, Plenge P, Marcusson J (1994) Brain 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, and 5-HT<sub>2</sub> receptors in suicide victims. *Biol Psychiatry* **35**: 457-463
- Artigas F (2013a) Future directions for serotonin and antidepressants. *ACS Chem Neurosci* **4**: 5-8
- Artigas F (2013b) Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther* **137**: 119-131
- Artigas F, Adell A, Celada P (2006) Pindolol augmentation of antidepressant response. *Curr Drug Targets* **7**: 139-147
- Artigas F, Bel N, Casanovas JM, Romero L (1996) Adaptive changes of the serotonergic system after antidepressant treatments. *Adv Exp Med Biol* **398**: 51-59
- Asberg M (1997) Neurotransmitters and suicidal behavior. The evidence from cerebrospinal fluid studies. *Ann N Y Acad Sci* **836**: 158-181
- Ashcroft GW, Crawford TB, Eccleston D, Sharman DF, MacDougall EJ, Stanton JB, Binns JK (1966) 5-hydroxyindole compounds in the cerebrospinal fluid of patients with psychiatric or neurological diseases. *Lancet* **2**: 1049-1052

- Auerbach SB, Hjorth S (1995) Effect of chronic administration of the selective serotonin (5-HT) uptake inhibitor citalopram on extracellular 5-HT and apparent autoreceptor sensitivity in rat forebrain in vivo. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* **352**: 597-606
- Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, Kavalali ET, Monteggia LM (2011) NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* **475**: 91-95
- Autry AE, Monteggia LM (2012) Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* **64**: 238-258
- Axelson DA, Doraiswamy PM, McDonald WM, Boyko OB, Tupler LA, Patterson LJ, Nemeroff CB, Ellinwood EH, Jr., Krishnan KR (1993) Hypercortisolemia and hippocampal changes in depression. *Psychiatry Res* **47**: 163-173
- Azmitia EC, Gannon PJ, Kheck NM, Whitaker-Azmitia PM (1996) Cellular localization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology* **14**: 35-46
- Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Krobert KA, Brattelid T, Kaumann AJ, Levy FO (2001) 5HT<sub>4</sub>(a) and 5-HT<sub>4</sub>(b) receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* **363**: 146-160
- Bamji SX, Shimazu K, Kimes N, Huelsken J, Birchmeier W, Lu B, Reichardt LF (2003) Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly. *Neuron* **40**: 719-731
- Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, Behar KL, Sanacora G (2010) Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry* **15**: 501-511
- Banasr M, Duman RS (2007) Regulation of neurogenesis and gliogenesis by stress and antidepressant treatment. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **6**: 311-320
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A (2004) Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology* **29**: 450-460
- Bang SJ, Jensen P, Dymecki SM, Commons KG (2012) Projections and interconnections of genetically defined serotonin neurons in mice. *Eur J Neurosci* **35**: 85-96
- Banki CM (1977) Correlation between cerebrospinal fluid amine metabolites and psychomotor activity in affective disorders. *J Neurochem* **28**: 255-257
- Bao AM, Meynen G, Swaab DF (2008) The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev* **57**: 531-553
- Bao J, Ma HY, Schuster A, Lin YM, Yan W (2013) Incomplete cre-mediated excision leads to phenotypic differences between Stra8-iCre; Mov1011(lox/lox) and Stra8-iCre; Mov1011(lox/Delta) mice. *Genesis* **51**: 481-490
- Bargmann CI, Lieberman JA (2014) What the BRAIN Initiative means for psychiatry. *Am J Psychiatry* **171**: 1038-1040
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**: 1083-1152
- Barth AI, Pollack AL, Altschuler Y, Mostov KE, Nelson WJ (1997) NH<sub>2</sub>-terminal deletion of beta-catenin results in stable colocalization of mutant beta-catenin with adenomatous polyposis coli protein and altered MDCK cell adhesion. *J Cell Biol* **136**: 693-706
- Barthet G, Framery B, Gaven F, Pellissier L, Reiter E, Claeysen S, Bockaert J, Dumuis A (2007) 5-hydroxytryptamine 4 receptor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway depends on Src activation but not on G protein or beta-arrestin signaling. *Mol Biol Cell* **18**: 1979-1991
- Bel N, Artigas F (1992) Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: an in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol* **229**: 101-103

- Bell-McGinty S, Butters MA, Meltzer CC, Greer PJ, Reynolds CF, 3rd, Becker JT (2002) Brain morphometric abnormalities in geriatric depression: long-term neurobiological effects of illness duration. *Am J Psychiatry* **159**: 1424-1427
- Bender E, Pindon A, van Oers I, Zhang YB, Gommeren W, Verhasselt P, Jurzak M, Leysen J, Luyten W (2000) Structure of the human serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor gene and cloning of a novel 5-HT<sub>4</sub> splice variant. *J Neurochem* **74**: 478-489
- Benloucif S, Keegan MJ, Galloway MP (1993) Serotonin-facilitated dopamine release in vivo: pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **265**: 373-377
- Bennett MR (2011) The prefrontal-limbic network in depression: A core pathology of synapse regression. *Prog Neurobiol* **93**: 457-467
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* **47**: 351-354
- Berton O, Nestler EJ (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* **7**: 137-151
- Beskow J, Gottfries CG, Roos BE, Winblad B (1976) Determination of monoamine and monoamine metabolites in the human brain: post mortem studies in a group of suicides and in a control group. *Acta Psychiatr Scand* **53**: 7-20
- Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N (2009) The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry* **14**: 764-773, 739
- Bhagwagar Z, Rabiner EA, Sargent PA, Grasby PM, Cowen PJ (2004) Persistent reduction in brain serotonin<sub>1A</sub> receptor binding in recovered depressed men measured by positron emission tomography with [<sup>11</sup>C]WAY-100635. *Mol Psychiatry* **9**: 386-392
- Biegon A, Israeli M (1988) Regionally selective increases in beta-adrenergic receptor density in the brains of suicide victims. *Brain Res* **442**: 199-203
- Bierut LJ, Heath AC, Bucholz KK, Dinwiddie SH, Madden PAF, Statham DJ, Dunne MP, Martin NG (1999) Major depressive disorder in a community-based twin sample - Are there different genetic and environmental contributions for men and women? *Arch Gen Psychiat* **56**: 557-563
- Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C (2007) Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* **316**: 1619-1622
- Blendy JA (2006) The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* **59**: 1144-1150
- Blier P, Chaput Y, de Montigny C (1988) Long-term 5-HT reuptake blockade, but not monoamine oxidase inhibition, decreases the function of terminal 5-HT autoreceptors: an electrophysiological study in the rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **337**: 246-254
- Blier P, De Montigny C (1983) Electrophysiological investigations on the effect of repeated zimelidine administration on serotonergic neurotransmission in the rat. *J Neurosci* **3**: 1270-1278
- Blondel O, Vandecasteele G, Gastineau M, Leclerc S, Dahmoune Y, Langlois M, Fischmeister R (1997) Molecular and functional characterization of a 5-HT<sub>4</sub> receptor cloned from human atrium. *FEBS Lett* **412**: 465-474
- Blugeot A, Rivat C, Bouvier E, Molet J, Mouchard A, Zeau B, Bernard C, Benoliel JJ, Becker C (2011) Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers. *J Neurosci* **31**: 12889-12899
- Bockaert J, Sebben M, Dumuis A (1990) Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine<sub>4</sub>(5-HT<sub>4</sub>) receptors positively coupled to adenylate cyclase in adult guinea pig hippocampal membranes: effect of substituted benzamide derivatives. *Mol Pharmacol* **37**: 408-411

- Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Aitken DH, Quirion R, Meaney MJ (1988) The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* **95**: 298-302
- Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Quirion R, Meaney MJ (1989) A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* **97**: 277-279
- Bokor H, Csaki A, Kocsis K, Kiss J (2002) Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *Eur J Neurosci* **16**: 1227-1239
- Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, John Mann J, Arango V (2009) Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **34**: 2376-2389
- Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V (2008) Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res* **42**: 433-442
- Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H (2011) In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell* **145**: 1142-1155
- Bonaventure P, Schotte A, Cras P, Leysen JE (1997) Autoradiographic mapping of 5-HT1B- and 5-HT1D receptors in human brain using [3H]alniditan, a new radioligand. *Receptors Channels* **5**: 225-230
- Bortolozzi A, Amargos-Bosch M, Toth M, Artigas F, Adell A (2004) In vivo efflux of serotonin in the dorsal raphe nucleus of 5-HT1A receptor knockout mice. *J Neurochem* **88**: 1373-1379
- Bortolozzi A, Castane A, Semakova J, Santana N, Alvarado G, Cortes R, Ferres-Coy A, Fernandez G, Carmona MC, Toth M, Perales JC, Montefeltro A, Artigas F (2012) Selective siRNA-mediated suppression of 5-HT1A autoreceptors evokes strong anti-depressant-like effects. *Mol Psychiatry* **17**: 612-623
- Boschert U, Amara DA, Segu L, Hen R (1994) The mouse 5-hydroxytryptamine1B receptor is localized predominantly on axon terminals. *Neuroscience* **58**: 167-182
- Bosker FJ, Cremers TI, Jongasma ME, Westerink BH, Wikstrom HV, den Boer JA (2001) Acute and chronic effects of citalopram on postsynaptic 5-hydroxytryptamine(1A) receptor-mediated feedback: a microdialysis study in the amygdala. *J Neurochem* **76**: 1645-1653
- Bosker FJ, van Esseveldt KE, Klompmakers AA, Westenberg HG (1995) Chronic treatment with fluvoxamine by osmotic minipumps fails to induce persistent functional changes in central 5-HT1A and 5-HT1B receptors, as measured by in vivo microdialysis in dorsal hippocampus of conscious rats. *Psychopharmacology (Berl)* **117**: 358-363
- Bouhelal R, Smounya L, Bockaert J (1988) 5-HT1B receptors are negatively coupled with adenylate cyclase in rat substantia nigra. *Eur J Pharmacol* **151**: 189-196
- Bouwknicht JA, Olivier B, Paylor RE (2007) The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: A review of pharmacological and genetic studies in the mouse. *Neurosci Biobehav R* **31**: 41-59
- Bowley MP, Drevets WC, Ongur D, Price JL (2002) Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **52**: 404-412
- Boyer P (2000) Do anxiety and depression have a common pathophysiological mechanism? *Acta Psychiatr Scand Suppl*: 24-29
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G (2003) Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* **24**: 603-613
- Braut V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, Sommer L, Boussadia O, Kemler R (2001) Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* **128**: 1253-1264

- Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W (2004) Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* **18**: 2225-2230
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* **157**: 115-118
- Brezun JM, Daszuta A (1999) Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* **89**: 999-1002
- Britt JP, Benaliouad F, McDevitt RA, Stuber GD, Wise RA, Bonci A (2012) Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron* **76**: 790-803
- Bruinvels AT, Palacios JM, Hoyer D (1993) Autoradiographic characterisation and localisation of 5-HT1D compared to 5-HT1B binding sites in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **347**: 569-582
- Brummelte S, Galea LA (2010) Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats. *Neuroscience* **168**: 680-690
- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL (2002) Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci* **22**: 8797-8807
- Calhoun GG, Tye KM (2015) Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat Neurosci* **18**: 1394-1404
- Callado LF, Meana JJ, Grijalba B, Pazos A, Sastre M, Garcia-Sevilla JA (1998) Selective increase of alpha2A-adrenoceptor agonist binding sites in brains of depressed suicide victims. *J Neurochem* **70**: 1114-1123
- Cambiaghi M, Cursi M, Magri L, Castoldi V, Comi G, Minicucci F, Galli R, Leocani L (2013) Behavioural and EEG effects of chronic rapamycin treatment in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Neuropharmacology* **67**: 1-7
- Cameron HA, Gould E (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* **61**: 203-209
- Cammalleri M, Lutjens R, Berton F, King AR, Simpson C, Francesconi W, Sanna PP (2003) Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14368-14373
- Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM (2004) Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry* **161**: 598-607
- Can A, Blackwell RA, Piantadosi SC, Dao DT, O'Donnell KC, Gould TD (2011) Antidepressant-like responses to lithium in genetically diverse mouse strains. *Genes Brain Behav* **10**: 434-443
- Carola V, Gross C (2010) BDNF moderates early environmental risk factors for anxiety in mouse. *Genes Brain Behav* **9**: 379-389
- Casanovas JM, Hervas I, Artigas F (1999) Postsynaptic 5-HT1A receptors control 5-HT release in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroreport* **10**: 1441-1445
- Cassel JC, Jeltsch H, Neufang B, Lauth D, Szabo B, Jackisch R (1995) Downregulation of muscarinic- and 5-HT1B-mediated modulation of [3H]acetylcholine release in hippocampal slices of rats with fimbria-fornix lesions and intrahippocampal grafts of septal origin. *Brain Res* **704**: 153-166
- Castren E, Rantamaki T (2010a) The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol* **70**: 289-297
- Castren E, Rantamaki T (2010b) Role of brain-derived neurotrophic factor in the aetiology of depression: implications for pharmacological treatment. *CNS Drugs* **24**: 1-7
- Castro M, Diaz A, del Olmo E, Pazos A (2003) Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT1A receptors in rat brain. *Neuropharmacology* **44**: 93-101

- Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F (2001) Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* **21**: 9917-9929
- Celada P, Puig MV, Martin-Ruiz R, Casanovas JM, Artigas F (2002) Control of the serotonergic system by the medial prefrontal cortex: potential role in the etiology of PTSD and depressive disorders. *Neurotox Res* **4**: 409-419
- Ciani L, Salinas PC (2005) WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* **6**: 351-362
- Clark MS, Sexton TJ, McClain M, Root D, Kohen R, Neumaier JF (2002) Overexpression of 5-HT1B receptor in dorsal raphe nucleus using Herpes Simplex Virus gene transfer increases anxiety behavior after inescapable stress. *J Neurosci* **22**: 4550-4562
- Cleare AJ, Murray RM, Sherwood RA, O'Keane V (1998) Abnormal 5-HT1D receptor function in major depression: a neuropharmacological challenge study using sumatriptan. *Psychol Med* **28**: 295-300
- Cleary C, Linde JA, Hiscock KM, Hadas I, Belmaker RH, Agam G, Flaisher-Grinberg S, Einat H (2008) Antidepressive-like effects of rapamycin in animal models: Implications for mTOR inhibition as a new target for treatment of affective disorders. *Brain Res Bull* **76**: 469-473
- Compan V, Daszuta A, Salin P, Sebben M, Bockaert J, Dumuis A (1996) Lesion study of the distribution of serotonin 5-HT4 receptors in rat basal ganglia and hippocampus. *Eur J Neurosci* **8**: 2591-2598
- Compan V, Zhou M, Grailhe R, Gazzara RA, Martin R, Gingrich J, Dumuis A, Brunner D, Bockaert J, Hen R (2004) Attenuated response to stress and novelty and hypersensitivity to seizures in 5-HT4 receptor knock-out mice. *J Neurosci* **24**: 412-419
- Cook SC, Wellman CL (2004) Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* **60**: 236-248
- Cotter D, Mackay D, Chana G, Beasley C, Landau S, Everall IP (2002) Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb Cortex* **12**: 386-394
- Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I (2001a) Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* **58**: 545-553
- Cotter DR, Pariante CM, Everall IP (2001b) Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res Bull* **55**: 585-595
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* **21**: 1-14
- Crawley J, Goodwin FK (1980) Preliminary-Report of a Simple Animal Behavior Model for the Anxiolytic Effects of Benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Be* **13**: 167-170
- Crow TJ, Cross AJ, Cooper SJ, Deakin JFW, Ferrier IN, Johnson JA, Joseph MH, Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Corsellis JAN, Chambers DR, Blessed G, Perry EK, Perry RH, Tomlinson BE (1984) Neurotransmitter Receptors and Monoamine Metabolites in the Brains of Patients with Alzheimer-Type Dementia and Depression, and Suicides. *Neuropharmacology* **23**: 1561-1569
- Cryan JF, Dinan TG (2012) Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* **13**: 701-712
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* **23**: 238-245
- Czeh B, Lucassen PJ (2007) What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **257**: 250-260

- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E (2001) Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12796-12801
- Challis C, Beck SG, Berton O (2014) Optogenetic modulation of descending prefrontocortical inputs to the dorsal raphe bidirectionally bias socioaffective choices after social defeat. *Front Behav Neurosci* **8**: 43
- Challis C, Boulden J, Veerakumar A, Espallergues J, Vassoler FM, Pierce RC, Beck SG, Berton O (2013) Raphe GABAergic neurons mediate the acquisition of avoidance after social defeat. *J Neurosci* **33**: 13978-13988, 13988a
- Chattarji S, Tomar A, Suvrathan A, Ghosh S, Rahman MM (2015) Neighborhood matters: divergent patterns of stress-induced plasticity across the brain. *Nat Neurosci* **18**: 1364-1375
- Checkley S (1996) The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *Br Med Bull* **52**: 597-617
- Cheetham SC, Crompton MR, Katona CL, Horton RW (1990) Brain 5-HT<sub>1</sub> binding sites in depressed suicides. *Psychopharmacology (Berl)* **102**: 544-548
- Chen AC, Shirayama Y, Shin KH, Neve RL, Duman RS (2001a) Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect. *Biol Psychiatry* **49**: 753-762
- Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (2001b) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* **50**: 260-265
- Chen YC, Tan QR, Dang W, Wang HN, Zhang RB, Li ZY, Lin H, Liu R (2012) The effect of citalopram on chronic stress-induced depressive-like behavior in rats through GSK3 $\beta$ /beta-catenin activation in the medial prefrontal cortex. *Brain Res Bull* **88**: 338-344
- Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, Lee FS (2006) Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* **314**: 140-143
- Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, Lee FS (2004) Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci* **24**: 4401-4411
- Chenn A, Walsh CA (2002) Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* **297**: 365-369
- Chenu F, David DJ, Leroux-Nicollet I, Le Maitre E, Gardier AM, Bourin M (2008) Serotonin<sub>1B</sub> heteroreceptor activation induces an antidepressant-like effect in mice with an alteration of the serotonergic system. *J Psychiatry Neurosci* **33**: 541-550
- Choi M, Lee SH, Wang SE, Ko SY, Song M, Choi JS, Kim YS, Duman RS, Son H (2015) Ketamine produces antidepressant-like effects through phosphorylation-dependent nuclear export of histone deacetylase 5 (HDAC5) in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 15755-15760
- Chourbaji S, Hellweg R, Brandis D, Zorner B, Zacher C, Lang UE, Henn FA, Hortnagl H, Gass P (2004) Mice with reduced brain-derived neurotrophic factor expression show decreased choline acetyltransferase activity, but regular brain monoamine levels and unaltered emotional behavior. *Brain Res Mol Brain Res* **121**: 28-36
- D'Haenen H, Bossuyt A, Mertens J, Bossuyt-Piron C, Gijsemans M, Kaufman L (1992) SPECT imaging of serotonin<sub>2</sub> receptors in depression. *Psychiatry Res* **45**: 227-237
- D'Sa C, Eisch AJ, Bolger GB, Duman RS (2005) Differential expression and regulation of the cAMP-selective phosphodiesterase type 4A splice variants in rat brain by chronic antidepressant administration. *Eur J Neurosci* **22**: 1463-1475
- Dagestad G, Kuipers SD, Messaoudi E, Bramham CR (2006) Chronic fluoxetine induces region-specific changes in translation factor eIF4E and eEF2 activity in the rat brain. *Eur J Neurosci* **23**: 2814-2818

- Dahlstrom A, Fuxe K (1964) Evidence for Existence of Monoamine-Containing Neurons in Central Nervous System .I. Demonstration of Monoamines in Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand* **62**: 1-55
- Dale O, Somogyi AA, Li Y, Sullivan T, Shavit Y (2012) Does intraoperative ketamine attenuate inflammatory reactivity following surgery? A systematic review and meta-analysis. *Anesth Analg* **115**: 934-943
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R (2009) Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* **62**: 479-493
- Davidson RJ (2002) Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biol Psychiatry* **51**: 68-80
- Dawson LA, Nguyen HQ (2000) The role of 5-HT(1A) and 5-HT(1B/1D) receptors on the modulation of acute fluoxetine-induced changes in extracellular 5-HT: the mechanism of action of (+/-)pindolol. *Neuropharmacology* **39**: 1044-1052
- De Bellis MD, Gold PW, Geraciotti TD, Jr., Listwak SJ, Kling MA (1993) Association of fluoxetine treatment with reductions in CSF concentrations of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in patients with major depression. *Am J Psychiatry* **150**: 656-657
- de Medeiros MA, Carlos Reis L, Eugenio Mello L (2005) Stress-induced c-Fos expression is differentially modulated by dexamethasone, diazepam and imipramine. *Neuropsychopharmacology* **30**: 1246-1256
- De Paermentier F, Cheetham SC, Crompton MR, Katona CL, Horton RW (1990) Brain beta-adrenoceptor binding sites in antidepressant-free depressed suicide victims. *Brain Res* **525**: 71-77
- Deacon RM (2006) Appetitive position discrimination in the T-maze. *Nat Protoc* **1**: 13-15
- Deacon RM, Rawlins JN (2006) T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc* **1**: 7-12
- DeCarolis NA, Mechanic M, Petrik D, Carlton A, Ables JL, Malhotra S, Bachoo R, Gotz M, Lagace DC, Eisch AJ (2013) In vivo contribution of nestin- and GLAST-lineage cells to adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* **23**: 708-719
- Dedic N, Walser SM, Deussing JM (2011) Mouse Models of Depression. En: Psychiatric disorders – Trends and Developments. Uehara T (Ed.). InTech. pp. 185-222
- Der-Avakian A, Markou A (2012) The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci* **35**: 68-77
- Derkach V, Surprenant A, North RA (1989) 5-HT<sub>3</sub> receptors are membrane ion channels. *Nature* **339**: 706-709
- Deroche V, Piazza PV, Deminiere JM, Le Moal M, Simon H (1993) Rats orally self-administer corticosterone. *Brain Res* **622**: 315-320
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* **121**: 66-72
- Dias C, Feng J, Sun H, Shao NY, Mazei-Robison MS, Damez-Werno D, Scobie K, Bagot R, LaBonte B, Ribeiro E, Liu X, Kennedy P, Vialou V, Ferguson D, Pena C, Calipari ES, Koo JW, Mouzon E, Ghose S, Tamminga C, Neve R, Shen L, Nestler EJ (2014) beta-catenin mediates stress resilience through Dicer1/microRNA regulation. *Nature* **516**: 51-55
- Dillingham CM, Erichsen JT, O'Mara SM, Aggleton JP, Vann SD (2015) Fornical and nonfornical projections from the rat hippocampal formation to the anterior thalamic nuclei. *Hippocampus* **25**: 977-992
- Dillon KA, Gross-Isseroff R, Israeli M, Biegon A (1991) Autoradiographic analysis of serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in the human brain postmortem: effects of age and alcohol. *Brain Res* **554**: 56-64
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ (1993) The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* **13**: 3839-3847

- Djavadian RL (2004) Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **64**: 189-200
- Dragunow M, Faull R (1989) The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* **29**: 261-265
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI (2005) Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**: 903-915
- Drevets WC (1998) Functional neuroimaging studies of depression: the anatomy of melancholia. *Annu Rev Med* **49**: 341-361
- Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Greer PJ, Mathis C (2000) Serotonin type-1A receptor imaging in depression. *Nucl Med Biol* **27**: 499-507
- Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C (1999) PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry* **46**: 1375-1387
- Drevets WC, Price JL, Furey ML (2008) Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct* **213**: 93-118
- Drevets WC, Thase ME, Moses-Kolko EL, Price J, Frank E, Kupfer DJ, Mathis C (2007) Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl Med Biol* **34**: 865-877
- Dulawa SC, Hen R (2005) Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neurosci Biobehav Rev* **29**: 771-783
- Duman CH, Schlesinger L, Kodama M, Russell DS, Duman RS (2007) A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* **61**: 661-670
- Duman RS, Aghajanian GK (2012) Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* **338**: 68-72
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* **54**: 597-606
- Duman RS, Li N (2012) A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**: 2475-2484
- Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C (2000) Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry* **48**: 732-739
- Duman RS, Malberg J, Thome J (1999) Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* **46**: 1181-1191
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* **59**: 1116-1127
- Duman RS, Voleti B (2012) Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci* **35**: 47-56
- Duman RS (2007) Neurotrophic factors in etiology and treatment of mood disorders. En: Handbook of Contemporary Neuropharmacology. Sibley DR, Hanin I, Kuhar M, Skolnick P (Eds). John Wiley & Sons, Inc.
- Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, Bockaert J (1988) A 5-Ht Receptor in the Central Nervous-System, Positively Coupled with Adenylate-Cyclase, Is Antagonized by Ics-205-930. *European Journal of Pharmacology* **146**: 187-188
- Dwivedi Y, Pandey GN (2008) Adenylyl cyclase-cyclicAMP signaling in mood disorders: role of the crucial phosphorylating enzyme protein kinase A. *Neuropsychiatr Dis Treat* **4**: 161-176
- Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN (2003) Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* **60**: 804-815

- Dwyer JM, Lepack AE, Duman RS (2012) mTOR activation is required for the antidepressant effects of mGluR(2)/(3) blockade. *Int J Neuropsychopharmacol* **15**: 429-434
- Eckenhoff MF, Rakic P (1984) Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J Comp Neurol* **223**: 1-21
- Edwards E, Harkins K, Wright G, Henn FA (1991) 5-HT<sub>1b</sub> receptors in an animal model of depression. *Neuropharmacology* **30**: 101-105
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* **112**: 257-269
- Eglen RM, Bonhaus DW, Johnson LG, Leung E, Clark RD (1995) Pharmacological characterization of two novel and potent 5-HT<sub>4</sub> receptor agonists, RS 67333 and RS 67506, in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **115**: 1387-1392
- Eisenberg DP, Ianni AM, Wei SM, Kohn PD, Kolachana B, Apud J, Weinberger DR, Berman KF (2013) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val(66)Met polymorphism differentially predicts hippocampal function in medication-free patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry* **18**: 713-720
- El Mansari M, Blier P (2005) Responsiveness of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat orbitofrontal cortex after long-term serotonin reuptake inhibition. *J Psychiatry Neurosci* **30**: 268-274
- Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G (2011) Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* **8**: 566-579
- Encinas JM, Vahtokari A, Enikolopov G (2006) Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8233-8238
- Eom TY, Joep RS (2009) Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\alpha$ /beta impairs in vivo neural precursor cell proliferation. *Biol Psychiatry* **66**: 494-502
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* **25**: 10074-10086
- Etkin A (2010) Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective. *Curr Top Behav Neurosci* **2**: 251-277
- Fagni L, Dumuis A, Sebben M, Bockaert J (1992) The 5-HT<sub>4</sub> receptor subtype inhibits K<sup>+</sup> current in colliculi neurones via activation of a cyclic AMP-dependent protein kinase. *Br J Pharmacol* **105**: 973-979
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* **65**: 7-19
- Feil S, Valtcheva N, Feil R (2009) Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol* **530**: 343-363
- Felix-Ortiz AC, Burgos-Robles A, Bhagat ND, Leppla CA, Tye KM (2016) Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* **321**: 197-209
- Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F (2003) Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol* **162**: 1881-1893
- Ferrari F, Villa RF (2016) The Neurobiology of Depression: an Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence. *Mol Neurobiol*
- Ferrer I, Santpere G, Arzberger T, Bell J, Blanco R, Boluda S, Budka H, Carmona M, Giaccone G, Krebs B, Limido L, Parchi P, Puig B, Strammiello R, Strobel T, Kretzschmar H (2007) Brain protein preservation largely depends on the postmortem storage temperature: implications for study of proteins in human neurologic diseases and management of brain banks: a BrainNet Europe Study. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**: 35-46

- Ferres-Coy A, Galofre M, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Paz V, Ruiz-Bronchal E, Campa L, Pazos A, Caso JR, Leza JC, Alvarado G, Montefeltro A, Valdizan EM, Artigas F, Bortolozzi A (2016) Therapeutic antidepressant potential of a conjugated siRNA silencing the serotonin transporter after intranasal administration. *Mol Psychiatry* **21**: 328-338
- Ferres-Coy A, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Galofre M, Paz V, Campa L, Montefeltro A, Valdizan EM, Artigas F, Bortolozzi A (2013a) Serotonin transporter-siRNA rapidly exerts antidepressant effects following internalisation into serotonergic neurons. *Eur Neuropsychopharm* **23**: S313-S314
- Ferres-Coy A, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Paz V, Masana M, Cortes R, Carmona MC, Campa L, Pazos A, Montefeltro A, Valdizan EM, Artigas F, Bortolozzi A (2013b) RNAi-mediated serotonin transporter suppression rapidly increases serotonergic neurotransmission and hippocampal neurogenesis. *Transl Psychiatry* **3**: e211
- Ferres-Coy A, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Paz V, Masana M, Cortes R, Carmona MC, Campa L, Pazos A, Montefeltro A, Valdizan EM, Artigas F, Bortolozzi A (2013c) RNAi-mediated serotonin transporter suppression rapidly increases serotonergic neurotransmission and hippocampal neurogenesis. *Transl Psychiat* **3**
- Fertuzinhos SM, Oliveira JR, Nishimura AL, Pontual D, Carvalho DR, Sougey EB, Otto PA, Zatz M (2004) Analysis of IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RA [correction of IL-RA] polymorphisms in dysthymia. *J Mol Neurosci* **22**: 251-256
- Fifield K, Hebert M, Angel R, Adamec R, Blundell J (2013) Inhibition of mTOR kinase via rapamycin blocks persistent predator stress-induced hyperarousal. *Behav Brain Res* **256**: 457-463
- File SE, Gonzalez LE, Andrews N (1998) Endogenous acetylcholine in the dorsal hippocampus reduces anxiety through actions on nicotinic and muscarinic1 receptors. *Behav Neurosci* **112**: 352-359
- Fink KB, Gothert M (2007) 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev* **59**: 360-417
- Flint J, Kendler KS (2014) The genetics of major depression. *Neuron* **81**: 484-503
- Flórez J, Pazos A (2014) Neurotransmisión en el sistema nervioso central. En: Farmacología Humana. Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A (Eds.). Elsevier Masson. pp. 407-428
- Frodl T, Meisenzahl EM, Zetzsche T, Born C, Groll C, Jager M, Leinsinger G, Bottlender R, Hahn K, Moller HJ (2002) Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression. *Am J Psychiatry* **159**: 1112-1118
- Frodl TS, Koutsouleris N, Bottlender R, Born C, Jager M, Scupin I, Reiser M, Moller HJ, Meisenzahl EM (2008) Depression-related variation in brain morphology over 3 years: effects of stress? *Arch Gen Psychiatry* **65**: 1156-1165
- Fuchikami M, Thomas A, Liu R, Wohleb ES, Land BB, DiLeone RJ, Aghajanian GK, Duman RS (2015) Optogenetic stimulation of infralimbic PFC reproduces ketamine's rapid and sustained antidepressant actions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 8106-8111
- Fujita M, Hines CS, Zoghbi SS, Mallinger AG, Dickstein LP, Liow JS, Zhang Y, Pike VW, Drevets WC, Innis RB, Zarate CA, Jr. (2012) Downregulation of brain phosphodiesterase type IV measured with <sup>11</sup>C-(R)-rolipram positron emission tomography in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **72**: 548-554
- Fukumoto K, Iijima M, Chaki S (2014) Serotonin-1A receptor stimulation mediates effects of a metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonist, 2S-2-amino-2-(1S,2S-2-carboxycycloprop-1-yl)-3-(xanth-9-yl)propanoic acid (LY341495), and an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, ketamine, in the novelty-suppressed feeding test. *Psychopharmacology (Berl)* **231**: 2291-2298
- Fukumoto K, Iijima M, Chaki S (2016) The Antidepressant Effects of an mGlu2/3 Receptor Antagonist and Ketamine Require AMPA Receptor Stimulation in the mPFC and Subsequent Activation of the 5-HT Neurons in the DRN. *Neuropsychopharmacology* **41**: 1046-1056

- Furukawa-Hibi Y, Nitta A, Ikeda T, Morishita K, Liu W, Ibi D, Alkam T, Nabeshima T, Yamada K (2011) The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF. *Behav Brain Res* **220**: 271-280
- Galceran J, Miyashita-Lin EM, Devaney E, Rubenstein JL, Grosschedl R (2000) Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* **127**: 469-482
- Galloway MP, Suchowski CS, Keegan MJ, Hjorth S (1993) Local Infusion of the Selective 5ht-1b Agonist Cp-93,129 Facilitates Striatal Dopamine Release in-Vivo. *Synapse* **15**: 90-92
- Gao X, Arlotta P, Macklis JD, Chen J (2007) Conditional knock-out of beta-catenin in postnatal-born dentate gyrus granule neurons results in dendritic malformation. *J Neurosci* **27**: 14317-14325
- Gao Y, Zhou JJ, Zhu Y, Wang L, Kosten TA, Zhang X, Li DP (2017) Neuroadaptations of presynaptic and postsynaptic GABAB receptor function in the paraventricular nucleus in response to chronic unpredictable stress. *Br J Pharmacol* **174**: 2929-2940
- Garcia-Garcia AL, Newman-Tancredi A, Leonardo ED (2014) 5-HT(1A) [corrected] receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology (Berl)* **231**: 623-636
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* **7**: 1233-1241
- Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, Stertz L, Fries GR, Gavioli EC, Kapczinski F, Quevedo J (2008) Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **32**: 140-144
- Gardier AM (2013) Antidepressant activity: contribution of brain microdialysis in knock-out mice to the understanding of BDNF/5-HT transporter/5-HT autoreceptor interactions. *Front Pharmacol* **4**: 98
- Gardier AM, Malagie I, Trillat AC, Jacquot C, Artigas F (1996) Role of 5-HT1A autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundam Clin Pharmacol* **10**: 16-27
- Gareau PJ, Rutt BK, Karlik SJ, Mitchell JR (2000) Magnetization transfer and multicomponent T2 relaxation measurements with histopathologic correlation in an experimental model of MS. *J Magn Reson Imaging* **11**: 586-595
- Garza JC, Guo M, Zhang W, Lu XY (2012) Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3beta/beta-catenin signaling. *Mol Psychiatry* **17**: 790-808
- Gasull-Camos J, Tarres-Gatius M, Artigas F, Castane A (2017) Glial GLT-1 blockade in infralimbic cortex as a new strategy to evoke rapid antidepressant-like effects in rats. *Transl Psychiatry* **7**: e1038
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* **439**: 589-593
- George MS, Ketter TA, Parekh PI, Herscovitch P, Post RM (1996) Gender differences in regional cerebral blood flow during transient self-induced sadness or happiness. *Biol Psychiatry* **40**: 859-871
- Gerhard DM, Wohleb ES, Duman RS (2016) Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discovery Today* **21**: 454-464
- Gobbi M, Crespi D, Foddi MC, Fracasso C, Mancini L, Parotti L, Mennini T (1997) Effects of chronic treatment with fluoxetine and citalopram on 5-HT uptake, 5-HT1B autoreceptors, 5-HT3 and 5-HT4 receptors in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**: 22-28
- Godsil BP, Kiss JP, Spedding M, Jay TM (2013) The hippocampal-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders? *Eur Neuropsychopharmacol* **23**: 1165-1181

- Gomez-Lazaro E, Garmendia L, Beitia G, Perez-Tejada J, Azpiroz A, Arregi A (2012) Effects of a putative antidepressant with a rapid onset of action in defeated mice with different coping strategies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **38**: 317-327
- Goncalves JT, Schafer ST, Gage FH (2016) Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* **167**: 897-914
- Gong R, Park CS, Abbassi NR, Tang SJ (2006) Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Biol Chem* **281**: 18802-18815
- González Pinto A, López Peña P, Zorrilla Martínez I (2009) Depresión unipolar y otras depresiones. En: Manual de psiquiatría. Palomo T y Jiménez-Arriero MA (Eds.). Madrid: ENE Publicidad. pp. 325-343
- Goodfellow NM, Benekareddy M, Vaidya VA, Lambe EK (2009) Layer II/III of the prefrontal cortex: Inhibition by the serotonin 5-HT1A receptor in development and stress. *J Neurosci* **29**: 10094-10103
- Goodwin FK, Post RM, Dunner DL, Gordon EK (1973) Cerebrospinal fluid amine metabolites in affective illness: the probenecid technique. *Am J Psychiatry* **130**: 73-79
- Gosselin RD, Gibney S, O'Malley D, Dinan TG, Cryan JF (2009) Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. *Neuroscience* **159**: 915-925
- Gotlib IH, Joormann J, Minor KL, Hallmayer J (2008) HPA axis reactivity: a mechanism underlying the associations among 5-HTTLPR, stress, and depression. *Biol Psychiatry* **63**: 847-851
- Gottardi CJ, Gumbiner BM (2004) Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol* **167**: 339-349
- Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS (1992) Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* **12**: 3642-3650
- Gould E, Tanapat P (1999) Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* **46**: 1472-1479
- Gould E, Woolley CS, Cameron HA, Daniels DC, McEwen BS (1991) Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: II. Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on cell birth. *J Comp Neurol* **313**: 486-493
- Gould TD, Chen G, Manji HK (2004a) In vivo evidence in the brain for lithium inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Neuropsychopharmacology* **29**: 32-38
- Gould TD, Einat H, Bhat R, Manji HK (2004b) AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int J Neuropsychopharmacol* **7**: 387-390
- Gould TD, Einat H, O'Donnell KC, Picchini AM, Schloesser RJ, Manji HK (2007) Beta-catenin overexpression in the mouse brain phenocopies lithium-sensitive behaviors. *Neuropsychopharmacology* **32**: 2173-2183
- Gould TD, O'Donnell KC, Picchini AM, Dow ER, Chen G, Manji HK (2008) Generation and behavioral characterization of beta-catenin forebrain-specific conditional knock-out mice. *Behav Brain Res* **189**: 117-125
- Gourley SL, Kedves AT, Olausson P, Taylor JR (2009) A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropsychopharmacology* **34**: 707-716
- Gourley SL, Taylor JR (2009) Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 9**: Unit 9 32
- Gourley SL, Wu FJ, Kiraly DD, Ploski JE, Kedves AT, Duman RS, Taylor JR (2008a) Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biol Psychiatry* **63**: 353-359
- Gourley SL, Wu FJ, Taylor JR (2008b) Corticosterone regulates pERK1/2 map kinase in a chronic depression model. *Ann N Y Acad Sci* **1148**: 509-514

- Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav* **54**: 129-141
- Groenink L, van der Gugten J, Zethof T, van der Heyden J, Olivier B (1994) Stress-induced hyperthermia in mice: hormonal correlates. *Physiol Behav* **56**: 747-749
- Gross C, Hen R (2004) The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci* **5**: 545-552
- Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R (2002) Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* **416**: 396-400
- Guertin DA, Sabatini DM (2007) Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* **12**: 9-22
- Guilloux JP, David DJ, Guiard BP, Chenu F, Reperant C, Toth M, Bourin M, Gardier AM (2006) Blockade of 5-HT1A receptors by (+/-)-pindolol potentiates cortical 5-HT outflow, but not antidepressant-like activity of paroxetine: microdialysis and behavioral approaches in 5-HT1A receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* **31**: 2162-2172
- Guilloux JP, David DJ, Xia L, Nguyen HT, Rainer Q, Guiard BP, Reperant C, Deltheil T, Toth M, Hen R, Gardier AM (2011) Characterization of 5-HT(1A/1B)-/- mice: an animal model sensitive to anxiolytic treatments. *Neuropharmacology* **61**: 478-488
- Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**: 345-357
- Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao GG, Liu Y, Chen X, Li L, Wu S, Chen Y, Jiang H, Tan L, Xie J, Zhu X, Liang S, Deng H (2008) How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**: 426-436
- Gureje O, Kola L, Afolabi E (2007) Epidemiology of major depressive disorder in elderly Nigerians in the Ibadan Study of Ageing: a community-based survey. *Lancet* **370**: 957-964
- Hajek T, Kopecek M, Hoschl C (2012) Reduced hippocampal volumes in healthy carriers of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism: meta-analysis. *World J Biol Psychiatry* **13**: 178-187
- Hajos-Korcsok E, McTavish SF, Sharp T (2000) Effect of a selective 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitor on brain extracellular noradrenaline: microdialysis studies using paroxetine. *Eur J Pharmacol* **407**: 101-107
- Hall H, Lundkvist C, Halldin C, Farde L, Pike VW, McCarron JA, Fletcher A, Cliffe IA, Barf T, Wikstrom H, Sedvall G (1997) Autoradiographic localization of 5-HT1A receptors in the post-mortem human brain using [3H]WAY-100635 and [11C]way-100635. *Brain Res* **745**: 96-108
- Halloran J, Hussong SA, Burbank R, Podlutskaya N, Fischer KE, Sloane LB, Austad SN, Strong R, Richardson A, Hart MJ, Galvan V (2012) Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin by rapamycin modulates cognitive and non-cognitive components of behavior throughout lifespan in mice. *Neuroscience* **223**: 102-113
- Hallpike CS, Rawdon-Smith AF (1934) The origin of the Wever and Bray phenomenon. *J Physiol* **83**: 243-254
- Hamani C, Diwan M, Macedo CE, Brandao ML, Shumake J, Gonzalez-Lima F, Raymond R, Lozano AM, Fletcher PJ, Nobrega JN (2010) Antidepressant-like effects of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. *Biol Psychiatry* **67**: 117-124
- Hamblin MW, Metcalf MA (1991) Primary structure and functional characterization of a human 5-HT1D-type serotonin receptor. *Mol Pharmacol* **40**: 143-148
- Hamilton JP, Etkin A, Furman DJ, Lemus MG, Johnson RF, Gotlib IH (2012) Functional neuroimaging of major depressive disorder: a meta-analysis and new integration of base line activation and neural response data. *Am J Psychiatry* **169**: 693-703

- Hamon M, Gozlan H, el Mestikawy S, Emerit MB, Bolanos F, Schechter L (1990) The central 5-HT<sub>1A</sub> receptors: pharmacological, biochemical, functional, and regulatory properties. *Ann N Y Acad Sci* **600**: 114-129; discussion 129-131
- Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, Oshima M, Taketo MM (1999) Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J* **18**: 5931-5942
- Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R, Polakis P (1999) The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* **9**: 207-210
- Harwood FC, Shu L, Houghton PJ (2008) mTORC1 signaling can regulate growth factor activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases through protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **283**: 2575-2585
- Hashimoto K (2009) Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev* **61**: 105-123
- Hasler G, Drevets WC, Manji HK, Charney DS (2004) Discovering endophenotypes for major depression. *Neuropsychopharmacology* **29**: 1765-1781
- Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* **18**: 1926-1945
- Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* **287**: 2262-2267
- Haynes LE, Barber D, Mitchell IJ (2004) Chronic antidepressant medication attenuates dexamethasone-induced neuronal death and sublethal neuronal damage in the hippocampus and striatum. *Brain Res* **1026**: 157-167
- Hedlund PB (2009) The 5-HT<sub>7</sub> receptor and disorders of the nervous system: an overview. *Psychopharmacology (Berl)* **206**: 345-354
- Hedlund PB, Kelly L, Mazur C, Lovenberg T, Sutcliffe JG, Bonaventure P (2004) 8-OH-DPAT acts on both 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors to induce hypothermia in rodents. *Eur J Pharmacol* **487**: 125-132
- Heim C, Binder EB (2012) Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. *Exp Neurol* **233**: 102-111
- Heim C, Shugart M, Craighead WE, Nemeroff CB (2010) Neurobiological and psychiatric consequences of child abuse and neglect. *Dev Psychobiol* **52**: 671-690
- Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15049-15054
- Heitman J, Movva NR, Hall MN (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**: 905-909
- Henn FA, Vollmayr B (2004) Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? *Biol Psychiatry* **56**: 146-150
- Henriques JB, Davidson RJ (1991) Left frontal hypoactivation in depression. *J Abnorm Psychol* **100**: 535-545
- Hensler JG, Advani T, Monteggia LM (2007) Regulation of serotonin-1A receptor function in inducible brain-derived neurotrophic factor knockout mice after administration of corticosterone. *Biol Psychiatry* **62**: 521-529
- Herman JP, Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* **20**: 78-84
- Hervas I, Queiroz CM, Adell A, Artigas F (2000) Role of uptake inhibition and autoreceptor activation in the control of 5-HT release in the frontal cortex and dorsal hippocampus of the rat. *Br J Pharmacol* **130**: 160-166

- Hervas I, Vilaro MT, Romero L, Scorza MC, Mengod G, Artigas F (2001) Desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose effect of the concurrent administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology* **24**: 11-20
- Heuberger J, Birchmeier W (2010) Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a002915
- Hirschfeld RM (2001) The Comorbidity of Major Depression and Anxiety Disorders: Recognition and Management in Primary Care. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* **3**: 244-254
- Hirvonen J, Karlsson H, Kajander J, Lepola A, Markkula J, Rasi-Hakala H, Nagren K, Salminen JK, Hietala J (2008) Decreased brain serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor availability in medication-naive patients with major depressive disorder: an in-vivo imaging study using PET and [carbonyl-<sup>11</sup>C]WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol* **11**: 465-476
- Hjorth S, Auerbach SB (1994) Lack of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor desensitization following chronic citalopram treatment, as determined by in vivo microdialysis. *Neuropharmacology* **33**: 331-334
- Hjorth S, Bengtsson HJ, Milano S (1996) Raphe 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors, but not postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors or beta-adrenoceptors, restrain the citalopram-induced increase in extracellular 5-hydroxytryptamine in vivo. *Eur J Pharmacol* **316**: 43-47
- Hjorth S, Sharp T (1991) Effect of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. *Life Sci* **48**: 1779-1786
- Hoeffler CA, Klann E (2010) mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* **33**: 67-75
- Homayoun H, Moghaddam B (2007) NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci* **27**: 11496-11500
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **71**: 533-554
- Hrculak D, Kolar M, Strnad H, Korinek V (2016) TCF/LEF Transcription Factors: An Update from the Internet Resources. *Cancers (Basel)* **8**
- Hsiung S, Adlersberg M, Arango V, Mann JJ, Tamir H, Liu KP (2003) Attenuated 5-HT<sub>1A</sub> receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of adenylyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and mitogen-activated protein kinase. *Journal of Neurochemistry* **87**: 182-194
- Huang YY, Grailhe R, Arango V, Hen R, Mann JJ (1999) Relationship of psychopathology to the human serotonin<sub>1B</sub> genotype and receptor binding kinetics in postmortem brain tissue. *Neuropsychopharmacology* **21**: 238-246
- Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C, Birchmeier W (2000) Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* **148**: 567-578
- Hughes ZA, Starr KR, Scott CM, Newson MJ, Sharp T, Watson JM, Hagan JJ, Dawson LA (2007) Simultaneous blockade of 5-HT<sub>1A/B</sub> receptors and 5-HT transporters results in acute increases in extracellular 5-HT in both rats and guinea pigs: in vivo characterization of the novel 5-HT<sub>1A/B</sub> receptor antagonist/5-HT transport inhibitor SB-649915-B. *Psychopharmacology (Berl)* **192**: 121-133
- Hussaini SM, Choi CI, Cho CH, Kim HJ, Jun H, Jang MH (2014) Wnt signaling in neuropsychiatric disorders: ties with adult hippocampal neurogenesis and behavior. *Neurosci Biobehav Rev* **47**: 369-383
- Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Vourc'h P, Leman S, Andres CR, Gardier AM, Belzung C (2009) Deficit in BDNF does not increase vulnerability to stress but dampens antidepressant-like effects in the unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res* **202**: 245-251
- Imura T, Wang X, Noda T, Sofroniew MV, Fushiki S (2010) Adenomatous polyposis coli is essential for both neuronal differentiation and maintenance of adult neural stem cells in subventricular zone and hippocampus. *Stem Cells* **28**: 2053-2064

- Inestrosa NC, Varela-Nallar L (2015) Wnt signalling in neuronal differentiation and development. *Cell Tissue Res* **359**: 215-223
- Insel TR, Cuthbert BN (2015) Medicine. Brain disorders? Precisely. *Science* **348**: 499-500
- Israsena N, Hu M, Fu W, Kan L, Kessler JA (2004) The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Dev Biol* **268**: 220-231
- Iwai Y, Hirota Y, Ozaki K, Okano H, Takeichi M, Uemura T (2002) DN-cadherin is required for spatial arrangement of nerve terminals and ultrastructural organization of synapses. *Mol Cell Neurosci* **19**: 375-388
- Iyer RN, Bradberry CW (1996) Serotonin-mediated increase in prefrontal cortex dopamine release: pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **277**: 40-47
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rugg MA, Hall A, Hall MN (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* **6**: 1122-1128
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* **72**: 165-229
- Jacobs BL, van Praag H, Gage FH (2000) Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry* **5**: 262-269
- Jamieson C, Sharma M, Henderson BR (2012) Wnt signaling from membrane to nucleus: beta-catenin caught in a loop. *Int J Biochem Cell Biol* **44**: 847-850
- Jankowski MP, Sesack SR (2004) Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* **468**: 518-529
- Jayatissa MN, Henningsen K, West MJ, Wiborg O (2009) Decreased cell proliferation in the dentate gyrus does not associate with development of anhedonic-like symptoms in rats. *Brain Res* **1290**: 133-141
- Jernigan CS, Goswami DB, Austin MC, Iyo AH, Chandran A, Stockmeier CA, Karolewicz B (2011) The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **35**: 1774-1779
- Ji G, Neugebauer V (2012) Modulation of medial prefrontal cortical activity using in vivo recordings and optogenetics. *Mol Brain* **5**: 36
- Jimenez-Sanchez L, Castane A, Perez-Caballero L, Grifoll-Escoda M, Lopez-Gil X, Campa L, Galofre M, Berrocoso E, Adell A (2016) Activation of AMPA Receptors Mediates the Antidepressant Action of Deep Brain Stimulation of the Infralimbic Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex* **26**: 2778-2789
- Johnson SW, Mercuri NB, North RA (1992) 5-hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptors block the GABAB synaptic potential in rat dopamine neurons. *J Neurosci* **12**: 2000-2006
- Jope RS, Bijur GN (2002) Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3beta and cell survival. *Mol Psychiatry* **7 Suppl 1**: S35-45
- Jourdi H, Hsu YT, Zhou M, Qin Q, Bi X, Baudry M (2009) Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA translation. *J Neurosci* **29**: 8688-8697
- Joyce JN, Shane A, Lexow N, Winokur A, Casanova MF, Kleinman JE (1993) Serotonin uptake sites and serotonin receptors are altered in the limbic system of schizophrenics. *Neuropsychopharmacology* **8**: 315-336
- Jun TY, Pae CU, Hoon H, Chae JH, Bahk WM, Kim KS, Serretti A (2003) Possible association between -G308A tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism and major depressive disorder in the Korean population. *Psychiatr Genet* **13**: 179-181
- Jungblut M, Tiveron MC, Barral S, Abrahamsen B, Knobel S, Pennartz S, Schmitz J, Perraut M, Pfrieger FW, Stoffel W, Cremer H, Bosio A (2012) Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1. *Glia* **60**: 894-907

- Jungling K, Eulenburg V, Moore R, Kemler R, Lessmann V, Gottmann K (2006) N-cadherin transsynaptically regulates short-term plasticity at glutamatergic synapses in embryonic stem cell-derived neurons. *J Neurosci* **26**: 6968-6978
- Kai K, Miyoshi A, Tokunaga O, Kitahara K, Takahashi T, Miyake S, Egashira Y, Irie H, Noshiro H, Miyazaki K (2010) A hepatocellular neoplasm accompanied with massive histiocyte infiltration. *Clin J Gastroenterol* **3**: 40-44
- Kaidanovich-Beilin O, Milman A, Weizman A, Pick CG, Eldar-Finkelman H (2004) Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus. *Biol Psychiatry* **55**: 781-784
- Karege F, Perroud N, Burkhardt S, Fernandez R, Ballmann E, La Harpe R, Malafosse A (2012a) Protein levels of beta-catenin and activation state of glycogen synthase kinase-3beta in major depression. A study with postmortem prefrontal cortex. *J Affect Disord* **136**: 185-188
- Karege F, Perroud N, Burkhardt S, Fernandez R, Ballmann E, La Harpe R, Malafosse A (2012b) Protein levels of beta-catenin and activation state of glycogen synthase kinase-3beta in major depression. A study with postmortem prefrontal cortex. *J Affect Disord* **136**: 185-188
- Karten YJ, Nair SM, van Essen L, Sibug R, Joels M (1999) Long-term exposure to high corticosterone levels attenuates serotonin responses in rat hippocampal CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13456-13461
- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ (1981) Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* **5**: 247-251
- Keedwell PA, Andrew C, Williams SC, Brammer MJ, Phillips ML (2005) The neural correlates of anhedonia in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **58**: 843-853
- Kemp AH, Quintana DS, Felmingham KL, Matthews S, Jelinek HF (2012) Depression, comorbid anxiety disorders, and heart rate variability in physically healthy, unmedicated patients: implications for cardiovascular risk. *PLoS One* **7**: e30777
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* **27**: 447-452
- Kempermann G, Song H, Gage FH (2015) Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**: a018812
- Kendler KS, Gardner CO, Neale MC, Prescott CA (2001) Genetic risk factors for major depression in men and women: similar or different heritabilities and same or partly distinct genes? *Psychol Med* **31**: 605-616
- Khawaja X (1995) Quantitative autoradiographic characterisation of the binding of [3H]WAY-100635, a selective 5-HT1A receptor antagonist. *Brain Res* **673**: 217-225
- Kim H, Won S, Hwang DY, Lee JS, Kim M, Kim R, Kim W, Cha B, Kim T, Kim D, Costantini F, Jho EH (2011a) Downregulation of Wnt/beta-catenin signaling causes degeneration of hippocampal neurons in vivo. *Neurobiol Aging* **32**: 2316 e2311-2315
- Kim TH, Lee JY, Baek JA, Lee JC, Yang X, Taketo MM, Jiang R, Cho ES (2011b) Constitutive stabilization of ss-catenin in the dental mesenchyme leads to excessive dentin and cementum formation. *Biochem Biophys Res Commun* **412**: 549-555
- Kim YK, Lee HP, Won SD, Park EY, Lee HY, Lee BH, Lee SW, Yoon D, Han C, Kim DJ, Choi SH (2007) Low plasma BDNF is associated with suicidal behavior in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**: 78-85
- Kivimae S, Martin PM, Kapfhamer D, Ruan Y, Heberlein U, Rubenstein JL, Cheyette BN (2011) Abnormal behavior in mice mutant for the Disc1 binding partner, Dixdc1. *Transl Psychiatry* **1**: e43
- Klein PS, Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8455-8459

- Knobelman DA, Hen R, Blendy JA, Lucki I (2001) Regional patterns of compensation following genetic deletion of either 5-hydroxytryptamine(1A) or 5-hydroxytryptamine(1B) receptor in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* **298**: 1092-1100
- Koike H, Iijima M, Chaki S (2011) Involvement of the mammalian target of rapamycin signaling in the antidepressant-like effect of group II metabotropic glutamate receptor antagonists. *Neuropharmacology* **61**: 1419-1423
- Kossel AH, Cambridge SB, Wagner U, Bonhoeffer T (2001) A caged Ab reveals an immediate/instructive effect of BDNF during hippocampal synaptic potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14702-14707
- Kraus MR, Al-Taie O, Schafer A, Pfersdorff M, Lesch KP, Scheurlen M (2007) Serotonin-1A receptor gene HTR1A variation predicts interferon-induced depression in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **132**: 1279-1286
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* **32**: 149-184
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* **455**: 894-902
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G (2003) Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* **467**: 455-463
- Kronmuller KT, Pantel J, Kohler S, Victor D, Giesel F, Magnotta VA, Mundt C, Essig M, Schroder J (2008) Hippocampal volume and 2-year outcome in depression. *Br J Psychiatry* **192**: 472-473
- Krystal JH, Sanacora G, Duman RS (2013) Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. *Biol Psychiatry* **73**: 1133-1141
- Kumar S, Black SJ, Hultman R, Szabo ST, DeMaio KD, Du J, Katz BM, Feng G, Covington HE, 3rd, Dzirasa K (2013) Cortical control of affective networks. *J Neurosci* **33**: 1116-1129
- Laplante M, Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* **122**: 3589-3594
- Le Francois B, Czesak M, Steubl D, Albert PR (2008) Transcriptional regulation at a HTR1A polymorphism associated with mental illness. *Neuropharmacology* **55**: 977-985
- Le Poul E, Boni C, Hanoun N, Laporte AM, Laaris N, Chauveau J, Hamon M, Lanfumey L (2000) Differential adaptation of brain 5-HT1A and 5-HT1B receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology* **39**: 110-122
- Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM (2002) Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord* **4**: 117-128
- Lee E, Hong J, Park YG, Chae S, Kim Y, Kim D (2015) Left brain cortical activity modulates stress effects on social behavior. *Sci Rep* **5**: 13342
- Lemondé S, Du L, Bakish D, Hrdina P, Albert PR (2004) Association of the C(-1019)G 5-HT1A functional promoter polymorphism with antidepressant response. *Int J Neuropsychopharmacol* **7**: 501-506
- Lemondé S, Turecki G, Bakish D, Du LS, Hrdina PD, Bown CD, Sequeira A, Kushwaha N, Morris SJ, Basak A, Ou XM, Albert PR (2003) Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *Journal of Neuroscience* **23**: 8788-8799
- Lener MS, Niciu MJ, Ballard ED, Park M, Park LT, Nugent AC, Zarate CA, Jr. (2017) Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid Systems in the Pathophysiology of Major Depression and Antidepressant Response to Ketamine. *Biol Psychiatry* **81**: 886-897
- Lesch KP, Aulakh CS, Tolliver TJ, Hill JL, Wolozin BL, Murphy DL (1991) Differential effects of long-term lithium and carbamazepine administration on Gs alpha and Gi alpha protein in rat brain. *Eur J Pharmacol* **207**: 355-359
- Lesch KP, Manji HK (1992) Signal-transducing G proteins and antidepressant drugs: evidence for modulation of alpha subunit gene expression in rat brain. *Biol Psychiatry* **32**: 549-579

- Lesch KP, Poten B, Sohle K, Schulte HM (1990) Pharmacology of the hypothermic response to 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation in humans. *Eur J Clin Pharmacol* **39**: 17-19
- Leuner B, Gould E (2010) Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol* **61**: 111-140, C111-113
- Levine ES, Crozier RA, Black IB, Plummer MR (1998) Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10235-10239
- Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR (1995) Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8074-8077
- Levinson DF (2006) The genetics of depression: a review. *Biol Psychiatry* **60**: 84-92
- Levone BR, Cryan JF, O'Leary OF (2015) Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. *Neurobiol Stress* **1**: 147-155
- Li F, Chong ZZ, Maiese K (2005) Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Curr Neurovasc Res* **2**: 331-340
- Li L, Yuan H, Weaver CD, Mao J, Farr GH, 3rd, Sussman DJ, Jonkers J, Kimelman D, Wu D (1999) Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J* **18**: 4233-4240
- Li M, Long C, Yang L (2015) Hippocampal-prefrontal circuit and disrupted functional connectivity in psychiatric and neurodegenerative disorders. *Biomed Res Int* **2015**: 810548
- Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (2010a) mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* **329**: 959-964
- Li N, Liu RJ, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (2011) Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry* **69**: 754-761
- Li WJ, Yu H, Yang JM, Gao J, Jiang H, Feng M, Zhao YX, Chen ZY (2010b) Anxiolytic effect of music exposure on BDNF<sup>Met/Met</sup> transgenic mice. *Brain Res* **1347**: 71-79
- Li Y, Luikart BW, Birnbaum S, Chen J, Kwon CH, Kernie SG, Bassel-Duby R, Parada LF (2008) TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* **59**: 399-412
- Licht CL, Kirkegaard L, Zueger M, Chourbaji S, Gass P, Aznar S, Knudsen GM (2010) Changes in 5-HT<sub>4</sub> receptor and 5-HT transporter binding in olfactory bulbectomized and glucocorticoid receptor heterozygous mice. *Neurochem Int* **56**: 603-610
- Licht CL, Marcussen AB, Wegener G, Overstreet DH, Aznar S, Knudsen GM (2009) The brain 5-HT<sub>4</sub> receptor binding is down-regulated in the Flinders Sensitive Line depression model and in response to paroxetine administration. *J Neurochem* **109**: 1363-1374
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* **437**: 1370-1375
- Lin D, Parsons LH (2002) Anxiogenic-like effect of serotonin(1B) receptor stimulation in the rat elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* **71**: 581-587
- Lindholm JS, Autio H, Vesa L, Antila H, Lindemann L, Hoener MC, Skolnick P, Rantamaki T, Castren E (2012) The antidepressant-like effects of glutamatergic drugs ketamine and AMPA receptor potentiator LY 451646 are preserved in bdnf(+/-) heterozygous null mice. *Neuropharmacology* **62**: 391-397
- Lindsay RM, Wiegand SJ, Altar CA, DiStefano PS (1994) Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci* **17**: 182-190

- Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M (1994) Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* **17**: 490-496
- Linge R, Jimenez-Sanchez L, Campa L, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Pazos A, Adell A, Diaz A (2016) Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Neuropharmacology* **103**: 16-26
- Liu R, Dang W, Jianting M, Su C, Wang H, Chen Y, Tan Q (2012) Citalopram alleviates chronic stress induced depression-like behaviors in rats by activating GSK3 $\beta$  signaling in dorsal hippocampus. *Brain Res* **1467**: 10-17
- Liu RJ, Aghajanian GK (2008) Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 359-364
- Liu RJ, Fuchikami M, Dwyer JM, Lepack AE, Duman RS, Aghajanian GK (2013) GSK-3 inhibition potentiates the synaptogenic and antidepressant-like effects of subthreshold doses of ketamine. *Neuropsychopharmacology* **38**: 2268-2277
- Liu XL, Luo L, Mu RH, Liu BB, Geng D, Liu Q, Yi LT (2015) Fluoxetine regulates mTOR signalling in a region-dependent manner in depression-like mice. *Sci Rep* **5**: 16024
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ C(T)</sup> Method. *Methods* **25**: 402-408
- Lo DC (1995) Neurotrophic factors and synaptic plasticity. *Neuron* **15**: 979-981
- Loewith R, Jacinto E, Wullschlegel S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* **10**: 457-468
- Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 781-810
- Lohof AM, Ip NY, Poo MM (1993) Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* **363**: 350-353
- Lopez-Gil X, Artigas F, Adell A (2009) Role of different monoamine receptors controlling MK-801-induced release of serotonin and glutamate in the medial prefrontal cortex: relevance for antipsychotic action. *Int J Neuropsychopharmacol* **12**: 487-499
- Lopez JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ (1998) A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin<sub>1A</sub>, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry* **43**: 547-573
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275
- Lowther S, Crompton MR, Katona CL, Horton RW (1996) GTP gamma S and forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity in post-mortem brain from depressed suicides and controls. *Mol Psychiatry* **1**: 470-477
- Lowther S, De Paermentier F, Cheetham SC, Crompton MR, Katona CL, Horton RW (1997) 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding sites in post-mortem brain samples from depressed suicides and controls. *J Affect Disord* **42**: 199-207
- Lucas G, Debonnel G (2002) 5-HT<sub>4</sub> receptors exert a frequency-related facilitatory control on dorsal raphe nucleus 5-HT neuronal activity. *Eur J Neurosci* **16**: 817-822
- Lucas G, Rymar VV, Du J, Mnie-Filali O, Bisgaard C, Manta S, Lambas-Senas L, Wiborg O, Haddjeri N, Pineyro G, Sadikot AF, Debonnel G (2007) Serotonin<sub>4</sub> (5-HT<sub>4</sub>) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron* **55**: 712-725
- Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E, Oomen CA, Czeh B (2010a) Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol* **20**: 1-17

- Lucassen PJ, Stumpel MW, Wang Q, Aronica E (2010b) Decreased numbers of progenitor cells but no response to antidepressant drugs in the hippocampus of elderly depressed patients. *Neuropharmacology* **58**: 940-949
- Luo Z, Zhuang X, Kumar D, Wu X, Yue C, Han C, Lv J (2013) The correlation of hippocampal T2-mapping with neuropsychology test in patients with Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**: e76203
- Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NP, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ (1998) Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat Neurosci* **1**: 69-73
- Luscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* **19**: 687-695
- Luthi A, Luscher C (2014) Pathological circuit function underlying addiction and anxiety disorders. *Nat Neurosci* **17**: 1635-1643
- Lyashenko N, Winter M, Migliorini D, Biechele T, Moon RT, Hartmann C (2011) Differential requirement for the dual functions of beta-catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation. *Nat Cell Biol* **13**: 753-761
- Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L (1999) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15239-15244
- Lloyd BA, Hake HS, Ishiwata T, Farmer CE, Loetz EC, Fleshner M, Bland ST, Greenwood BN (2017) Exercise increases mTOR signaling in brain regions involved in cognition and emotional behavior. *Behav Brain Res* **323**: 56-67
- MacMaster FP, Mirza Y, Szeszko PR, Kmiecik LE, Easter PC, Taormina SP, Lynch M, Rose M, Moore GJ, Rosenberg DR (2008) Amygdala and hippocampal volumes in familial early onset major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **63**: 385-390
- MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, Macdonald K, Amano S, Joffe RT, Nahmias C, Young LT (2003) Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1387-1392
- MacQueen GM, Ramakrishnan K, Croll SD, Siuciak JA, Yu G, Young LT, Fahnstock M (2001) Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression. *Behav Neurosci* **115**: 1145-1153
- Madsen K, Torstensen E, Holst KK, Haahr ME, Knorr U, Frokjaer VG, Brandt-Larsen M, Iversen P, Fisher PM, Knudsen GM (2014) Familial risk for major depression is associated with lower striatal 5-HT(4) receptor binding. *Int J Neuropsychopharmacol* **18**
- Madsen K, Torstensen E, Holst KK, Haahr ME, Knorr U, Frokjaer VG, Brandt-Larsen M, Iversen P, Fisher PM, Knudsen GM (2015) Familial Risk for Major Depression is Associated with Lower Striatal 5-HT4 Receptor Binding. *Int J Neuropsychoph* **18**
- Madsen TM, Newton SS, Eaton ME, Russell DS, Duman RS (2003) Chronic electroconvulsive seizure up-regulates beta-catenin expression in rat hippocampus: role in adult neurogenesis. *Biol Psychiatry* **54**: 1006-1014
- Maeng S, Zarate CA, Jr., Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK (2008) Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry* **63**: 349-352
- Maes M (1999) Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv Exp Med Biol* **461**: 25-46
- Magarinos AM, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E (1996) Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci* **16**: 3534-3540

- Maguschak KA, Ressler KJ (2008) Beta-catenin is required for memory consolidation. *Nat Neurosci* **11**: 1319-1326
- Maheu ME, Devorak J, Freibauer A, Davoli MA, Turecki G, Mechawar N (2015) Increased doublecortin (DCX) expression and incidence of DCX-immunoreactive multipolar cells in the subventricular zone-olfactory bulb system of suicides. *Front Neuroanat* **9**: 74
- Malberg JE, Duman RS (2003) Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* **28**: 1562-1571
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* **20**: 9104-9110
- Manev H, Uz T, Manev R, Zhang Z (2001) Neurogenesis and neuroprotection in the adult brain. A putative role for 5-lipoxygenase? *Ann N Y Acad Sci* **939**: 45-51
- Manji HK, Bitran JA, Masana MI, Chen GA, Hsiao JK, Risby ED, Rudorfer MV, Potter WZ (1991) Signal transduction modulation by lithium: cell culture, cerebral microdialysis and human studies. *Psychopharmacol Bull* **27**: 199-208
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* **7**: 541-547
- Mann JJ (1999) Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* **21**: 99S-105S
- Mann JJ, Stanley M, McBride PA, McEwen BS (1986) Increased serotonin<sub>2</sub> and beta-adrenergic receptor binding in the frontal cortices of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* **43**: 954-959
- Mannoury la Cour C, El Mestikawy S, Hanoun N, Hamon M, Lanfumey L (2006) Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Mol Pharmacol* **70**: 1013-1021
- Manuel-Apolinar L, Rocha L, Pascoe D, Castillo E, Castillo C, Meneses A (2005) Modifications of 5-HT<sub>4</sub> receptor expression in rat brain during memory consolidation. *Brain Res* **1042**: 73-81
- Mao Y, Ge X, Frank CL, Madison JM, Koehler AN, Doud MK, Tassa C, Berry EM, Soda T, Singh KK, Biechele T, Petryshen TL, Moon RT, Haggarty SJ, Tsai LH (2009) Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3 $\beta$ /beta-catenin signaling. *Cell* **136**: 1017-1031
- Marazziti D, Palego L, Giromella A, Mazzoni MR, Borsini F, Mayer N, Naccarato AG, Lucacchini A, Cassano GB (2002) Region-dependent effects of flibanserin and buspirone on adenylyl cyclase activity in the human brain. *Int J Neuropsychopharmacol* **5**: 131-140
- Marcilhac A, Maurel D, Anglade G, Ixart G, Mekaouche M, Hery F, Siaud P (1997) Effects of bilateral olfactory bulbectomy on circadian rhythms of ACTH, corticosterone, motor activity and body temperature in male rats. *Arch Physiol Biochem* **105**: 552-559
- Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P (2005) ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9182-9187
- Maroteaux L, Saudou F, Amlaiky N, Boschert U, Plassat JL, Hen R (1992) Mouse 5HT<sub>1B</sub> serotonin receptor: cloning, functional expression, and localization in motor control centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3020-3024
- Martin KF, Hannon S, Phillips I, Heal DJ (1992a) Opposing roles for 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the control of 5-HT release in rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol* **106**: 139-142
- Martin KF, Phillips I, Hearson M, Prow MR, Heal DJ (1992b) Characterization of 8-OH-DPAT-induced hypothermia in mice as a 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor response and its evaluation as a model to selectively identify antidepressants. *Br J Pharmacol* **107**: 15-21
- Mato S, Aso E, Castro E, Martin M, Valverde O, Maldonado R, Pazos A (2007) CB1 knockout mice display impaired functionality of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors. *J Neurochem* **103**: 2111-2120

- Matrisciano F, Busceti CL, Bucci D, Orlando R, Caruso A, Molinaro G, Cappuccio I, Rizzo B, Gradini R, Motolese M, Caraci F, Copani A, Scaccianoce S, Melchiorri D, Bruno V, Battaglia G, Nicoletti F (2011) Induction of the Wnt antagonist Dickkopf-1 is involved in stress-induced hippocampal damage. *PLoS One* **6**: e16447
- Matsumoto M, Togashi H, Mori K, Ueno K, Ohashi S, Kojima T, Yoshioka M (2001) Evidence for involvement of central 5-HT(4) receptors in cholinergic function associated with cognitive processes: behavioral, electrophysiological, and neurochemical studies. *J Pharmacol Exp Ther* **296**: 676-682
- Maura G, Raiteri M (1986) Cholinergic terminals in rat hippocampus possess 5-HT1B receptors mediating inhibition of acetylcholine release. *Eur J Pharmacol* **129**: 333-337
- Mayberg HS, Liotti M, Brannan SK, McGinnis S, Mahurin RK, Jerabek PA, Silva JA, Tekell JL, Martin CC, Lancaster JL, Fox PT (1999) Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. *Am J Psychiatry* **156**: 675-682
- McKay MS, Zakzanis KK (2010) The impact of treatment on HPA axis activity in unipolar major depression. *J Psychiatr Res* **44**: 183-192
- McKinnon MC, Yucel K, Nazarov A, MacQueen GM (2009) A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci* **34**: 41-54
- McKittrick CR, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR (1995) Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress. *Biol Psychiatry* **37**: 383-393
- Meana JJ, Barturen F, Garcia-Sevilla JA (1992) Alpha 2-adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression. *Biol Psychiatry* **31**: 471-490
- Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, Butters MA, Ziolkowski SK, Moses-Kolko E, Mazumdar S, Mulsant BH, Houck PR, Lopresti BJ, Weissfeld LA, Reynolds CF (2004) Serotonin 1A receptor binding and treatment response in late-life depression. *Neuropsychopharmacology* **29**: 2258-2265
- Meller E, Goldstein M, Bohmaker K (1990) Receptor reserve for 5-hydroxytryptamine1A-mediated inhibition of serotonin synthesis: possible relationship to anxiolytic properties of 5-hydroxytryptamine1A agonists. *Mol Pharmacol* **37**: 231-237
- Mendels J, Frazer A, Fitzgerald RG, Ramsey TA, Stokes JW (1972) Biogenic amine metabolites in cerebrospinal fluid of depressed and manic patients. *Science* **175**: 1380-1382
- Mendez-David I, David DJ, Darcet F, Wu MV, Kerdine-Romer S, Gardier AM, Hen R (2014) Rapid anxiolytic effects of a 5-HT(4) receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology* **39**: 1366-1378
- Mendez-David I, Guilloux JP, Papp M, Tritschler L, Mocaer E, Gardier AM, Bretin S, David DJ (2017) S 47445 Produces Antidepressant- and Anxiolytic-Like Effects through Neurogenesis Dependent and Independent Mechanisms. *Front Pharmacol* **8**: 462
- Mengod G, Vilaro MT, Raurich A, Lopez-Gimenez JF, Cortes R, Palacios JM (1996) 5-HT receptors in mammalian brain: receptor autoradiography and in situ hybridization studies of new ligands and newly identified receptors. *Histochem J* **28**: 747-758
- Mervaala E, Fohr J, Kononen M, Valkonen-Korhonen M, Vainio P, Partanen K, Partanen J, Tiihonen J, Viinamaki H, Karjalainen AK, Lehtonen J (2000) Quantitative MRI of the hippocampus and amygdala in severe depression. *Psychol Med* **30**: 117-125
- Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci* **9**: 729-731
- Meyer-Bernstein EL, Morin LP (1998) Destruction of serotonergic neurons in the median raphe nucleus blocks circadian rhythm phase shifts to triazolam but not to novel wheel access. *J Biol Rhythms* **13**: 494-505

- Meyer JH, Kapur S, Houle S, DaSilva J, Owczarek B, Brown GM, Wilson AA, Kennedy SH (1999) Prefrontal cortex 5-HT<sub>2</sub> receptors in depression: an [<sup>18</sup>F]setoperone PET imaging study. *Am J Psychiatry* **156**: 1029-1034
- Mezadri TJ, Batista GM, Portes AC, Marino-Neto J, Lino-de-Oliveira C (2011) Repeated rat-forced swim test: reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. *J Neurosci Methods* **195**: 200-205
- Mialet J, Berque-Bestel I, Eftekhari P, Gastineau M, Giner M, Dahmoune Y, Donzeau-Gouge P, Hoebeke J, Langlois M, Sicsic S, Fischmeister R, Lezoualc'h F (2000) Isolation of the serotonergic 5-HT<sub>4</sub>(e) receptor from human heart and comparative analysis of its pharmacological profile in C6-glia and CHO cell lines. *Br J Pharmacol* **129**: 771-781
- Mich JK, Signer RA, Nakada D, Pineda A, Burgess RJ, Vue TY, Johnson JE, Morrison SJ (2014) Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *Elife* **3**: e02669
- Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G (2004) Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol* **469**: 311-324
- Miguel-Hidalgo JJ, Baucom C, Dilley G, Overholser JC, Meltzer HY, Stockmeier CA, Rajkowska G (2000) Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **48**: 861-873
- Millan MJ, Marin P, Bockaert J, Mannoury la Cour C (2008) Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 454-464
- Miller AH, Maletic V, Raison CL (2009) Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* **65**: 732-741
- Miller AH, Raison CL (2016) The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol* **16**: 22-34
- Milligan G (2003) Principles: extending the utility of [<sup>35</sup>S]GTP gamma S binding assays. *Trends Pharmacol Sci* **24**: 87-90
- Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortiguera R, Marques-Torrejon MA, Nakashima K, Colak D, Gotz M, Farinas I, Gage FH (2010) Signaling through BMPRII regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* **7**: 78-89
- Mnie-Filali O, Faure C, Lambas-Senas L, El Mansari M, Belblidia H, Gondard E, Etievant A, Scarna H, Didier A, Berod A, Blier P, Haddjeri N (2011) Pharmacological blockade of 5-HT<sub>7</sub> receptors as a putative fast acting antidepressant strategy. *Neuropsychopharmacology* **36**: 1275-1288
- Mokler DJ, Dugal JR, Hoffman JM, Morgane PJ (2009) Functional interrelations between nucleus raphe dorsalis and nucleus raphe medianus: a dual probe microdialysis study of glutamate-stimulated serotonin release. *Brain Res Bull* **78**: 132-138
- Mombereau C, Gur TL, Onksen J, Blendy JA (2010) Differential effects of acute and repeated citalopram in mouse models of anxiety and depression. *Int J Neuropsychopharmacol* **13**: 321-334
- Mongeau R, Blier P, de Montigny C (1993) In vivo electrophysiological evidence for tonic activation by endogenous noradrenaline of alpha 2-adrenoceptors on 5-hydroxytryptamine terminals in the rat hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **347**: 266-272
- Mongeau R, de Montigny C, Blier P (1994) Electrophysiologic evidence for desensitization of alpha 2-adrenoceptors on serotonin terminals following long-term treatment with drugs increasing norepinephrine synaptic concentration. *Neuropsychopharmacology* **10**: 41-51
- Monteggia LM, Luikart B, Barrot M, Theobald D, Malkovska I, Nef S, Parada LF, Nestler EJ (2007) Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biol Psychiatry* **61**: 187-197

- Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N (2002) The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**: 1644-1646
- Moon RT, Brown JD, Torres M (1997) WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet* **13**: 157-162
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* **5**(9):691-701
- Moret C, Briley M (2000) The possible role of 5-HT<sub>1B/D</sub> receptors in psychiatric disorders and their potential as a target for therapy. *European Journal of Pharmacology* **404**: 1-12
- Mori T, Tanaka K, Buffo A, Wurst W, Kuhn R, Gotz M (2006) Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* **54**: 21-34
- Morilak DA, Frazer A (2004) Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* **7**: 193-218
- Morin LP, Blanchard J (1991) Serotonergic modulation of the hamster wheelrunning rhythm: response to lighting conditions and food deprivation. *Brain Res* **566**: 186-192
- Morrison SF, Nakamura K (2011) Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci (Landmark Ed)* **16**: 74-104
- Mostany R, Valdizan EM, Pazos A (2008) A role for nuclear beta-catenin in SNRI antidepressant-induced hippocampal cell proliferation. *Neuropharmacology* **55**: 18-26
- Mullins N, Lewis CM (2017) Genetics of Depression: Progress at Last. *Curr Psychiatry Rep* **19**: 43
- Murray F, Smith DW, Hutson PH (2008) Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol* **583**: 115-127
- Murrough JW, Abdallah CG, Mathew SJ (2017) Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects. *Nat Rev Drug Discov* **16**: 472-486
- Murrough JW, Neumeister A (2011) The serotonin 1B receptor: a new target for depression therapeutics? *Biol Psychiatry* **69**: 714-715
- Murrough JW, Perez AM, Pillemer S, Stern J, Parides MK, aan het Rot M, Collins KA, Mathew SJ, Charney DS, Iosifescu DV (2013) Rapid and Longer-Term Antidepressant Effects of Repeated Ketamine Infusions in Treatment-Resistant Major Depression. *Biol Psychiat* **74**: 250-256
- Mutch CA, Schulte JD, Olson E, Chenn A (2010) Beta-catenin signaling negatively regulates intermediate progenitor population numbers in the developing cortex. *PLoS One* **5**: e12376
- Myers-Schulz B, Koenigs M (2012) Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. *Mol Psychiatry* **17**: 132-141
- Nations KR, Bursi R, Dogterom P, Ereshefsky L, Gertsik L, Mant T, Schipper J (2012) Maximum tolerated dose evaluation of the AMPA modulator Org 26576 in healthy volunteers and depressed patients: a summary and method analysis of bridging research in support of phase II dose selection. *Drugs R D* **12**: 127-139
- Nautiyal KM, Hen R (2017) Serotonin receptors in depression: from A to B. *FI000Res* **6**: 123
- Navines R, Martin-Santos R, Gomez-Gil E, Martinez de Osaba MJ, Imaz ML, Gasto C (2007) Effects of citalopram treatment on hypothermic and hormonal responses to the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist buspirone in patients with major depression and therapeutic response. *Psychoneuroendocrinology* **32**: 411-416
- Nazari-Serenjeh F, Rezayof A, Zarrindast MR (2011) Functional correlation between GABAergic and dopaminergic systems of dorsal hippocampus and ventral tegmental area in passive avoidance learning in rats. *Neuroscience* **196**: 104-114

- Neff CD, Abkevich V, Packer JCL, Chen Y, Potter J, Riley R, Davenport C, Warren JD, Jammulapati S, Bhatena A, Choi WS, Kroeger PE, Metzger RE, Gutin A, Skolnick MH, Shattuck D, Katz DA (2009) Evidence for HTR1A and LHPP as interacting genetic risk factors in major depression. *Mol Psychiatr* **14**: 621-630
- Nemeroff CB, Bissette G, Akil H, Fink M (1991) Neuropeptide concentrations in the cerebrospinal fluid of depressed patients treated with electroconvulsive therapy. Corticotrophin-releasing factor, beta-endorphin and somatostatin. *Br J Psychiatry* **158**: 59-63
- Nemeroff CB, Owens MJ, Bissette G, Andorn AC, Stanley M (1988) Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* **45**: 577-579
- Nemeroff CB, Vale WW (2005) The neurobiology of depression: Inroads to treatment and new drug discovery. *J Clin Psychiat* **66**: 5-13
- Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W (1984) Elevated Concentrations of Csf Corticotropin-Releasing Factor-Like Immunoreactivity in Depressed-Patients. *Science* **226**: 1342-1344
- Nestler EJ (2015) Role of the Brain's Reward Circuitry in Depression: Transcriptional Mechanisms. *Int Rev Neurobiol* **124**: 151-170
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* **34**: 13-25
- Nestler EJ, Barrot M, Self DW (2001) DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11042-11046
- Nestler EJ, Hyman SE (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* **13**: 1161-1169
- Neumaier JF, Edwards E, Plotsky PM (2002) 5-HT(1B) mRNA regulation in two animal models of altered stress reactivity. *Biol Psychiatry* **51**: 902-908
- Neumeister A, Wood S, Bonne O, Nugent AC, Luckenbaugh DA, Young T, Bain EE, Charney DS, Drevets WC (2005) Reduced hippocampal volume in unmedicated, remitted patients with major depression versus control subjects. *Biol Psychiatry* **57**: 935-937
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* **15**: 7539-7547
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS (1996) Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* **16**: 2365-2372
- Niere F, Raab-Graham KF (2017) mTORC1 Is a Local, Postsynaptic Voltage Sensor Regulated by Positive and Negative Feedback Pathways. *Front Cell Neurosci* **11**: 152
- Ninkovic J, Mori T, Gotz M (2007) Distinct modes of neuron addition in adult mouse neurogenesis. *J Neurosci* **27**: 10906-10911
- O'Connor JJ, Kruk ZL (1994) Effects of 21 days treatment with fluoxetine on stimulated endogenous 5-hydroxytryptamine overflow in the rat dorsal raphe and suprachiasmatic nucleus studied using fast cyclic voltammetry in vitro. *Brain Res* **640**: 328-335
- O'Donnell JM, Xu Y (2012) Evidence for global reduction in brain cyclic adenosine monophosphate signaling in depression. *Biol Psychiatry* **72**: 524-525
- O'Leary OF, Cryan JF (2013) Towards translational rodent models of depression. *Cell Tissue Res* **354**: 141-153
- O'Leary OF, Cryan JF (2009) The Tail-Suspension Test: A Model for Characterizing Antidepressant Activity in Mice. En: Gould T (Eds.) Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. *Neuromethods*, vol 42. Humana Press, Totowa, NJ
- Ohmori T, Arora RC, Meltzer HY (1992) Serotonergic measures in suicide brain: the concentration of 5-HIAA, HVA, and tryptophan in frontal cortex of suicide victims. *Biol Psychiatry* **32**: 57-71

- Ohtsuki T, Ishiguro H, Detere-Wadleigh SD, Toyota T, Shimizu H, Yamada K, Yoshitsugu K, Hattori E, Yoshikawa T, Arinami T (2002) Association between serotonin 4 receptor gene polymorphisms and bipolar disorder in Japanese case-control samples and the NIMH Genetics Initiative Bipolar Pedigrees. *Mol Psychiatry* **7**: 954-961
- Okuda T, Yu LM, Cingolani LA, Kemler R, Goda Y (2007) beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13479-13484
- Olney JW, Labruyere J, Price MT (1989) Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science* **244**: 1360-1362
- Olney JW, Labruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA (1991) NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* **254**: 1515-1518
- Ongur D, Drevets WC, Price JL (1998) Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13290-13295
- Ongur D, Prescott AP, Jensen JE, Rouse ED, Cohen BM, Renshaw PF, Olson DP (2010) T2 relaxation time abnormalities in bipolar disorder and schizophrenia. *Magn Reson Med* **63**: 1-8
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2012) La depresión es una enfermedad frecuente y las personas que la padecen necesitan apoyo y tratamiento. [http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2012/mental\\_health\\_day\\_20121009/es/](http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2012/mental_health_day_20121009/es/)
- Otero JJ, Fu W, Kan L, Cuadra AE, Kessler JA (2004) Beta-catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells. *Development* **131**: 3545-3557
- Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M, Mohr DC, Schatzberg AF (2016) Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Primers* **2**: 16065
- Owen JC, Whitton PS (2005) Effects of amantadine and budipine on antidepressant drug-evoked changes in extracellular 5-HT in the frontal cortex of freely moving rats. *Br J Pharmacol* **145**: 587-592
- Pace-Schott EF, Hobson JA (2002) The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat Rev Neurosci* **3**: 591-605
- Palchadhuri M, Flugge G (2005) 5-HT1A receptor expression in pyramidal neurons of cortical and limbic brain regions. *Cell Tissue Res* **321**: 159-172
- Palego L, Giromella A, Marazziti D, Borsini F, Naccarato AG, Giannaccini G, Lucacchini A, Cassano GB, Mazzoni MR (1999) Effects of postmortem delay on serotonin and (+)8-OH-DPAT-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in rat and human brain tissues. *Brain Res* **816**: 165-174
- Palma-Gudiel H, Cordova-Palomera A, Eixarch E, Deuschle M, Fananas L (2015) Maternal psychosocial stress during pregnancy alters the epigenetic signature of the glucocorticoid receptor gene promoter in their offspring: a meta-analysis. *Epigenetics* **10**: 893-902
- Papakostas GI, Ionescu DF (2015) Towards new mechanisms: an update on therapeutics for treatment-resistant major depressive disorder. *Mol Psychiatry* **20**: 1142-1150
- Pariante CM, Lightman SL (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* **31**: 464-468
- Park H, Poo MM (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* **14**: 7-23
- Park SW, Lee JG, Seo MK, Lee CH, Cho HY, Lee BJ, Seol W, Kim YH (2014) Differential effects of antidepressant drugs on mTOR signalling in rat hippocampal neurons. *Int J Neuropsychopharmacol* **17**: 1831-1846
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10734-10739
- Parsey RV (2010) Serotonin receptor imaging: clinically useful? *J Nucl Med* **51**: 1495-1498

- Parsey RV, Olvet DM, Oquendo MA, Huang YY, Ogden RT, Mann JJ (2006) Higher 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding potential during a major depressive episode predicts poor treatment response: preliminary data from a naturalistic study. *Neuropsychopharmacology* **31**: 1745-1749
- Pascual-Brazo J, Castro E, Diaz A, Valdizan EM, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Treceno B, Pazos A (2012) Modulation of neuroplasticity pathways and antidepressant-like behavioural responses following the short-term (3 and 7 days) administration of the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist RS67333. *Int J Neuropsychopharmacol* **15**: 631-643
- Patel V, Chisholm D, Parikh R, Charlson FJ, Degenhardt L, Dua T, Ferrari AJ, Hyman S, Laxminarayan R, Levin C, Lund C, Medina Mora ME, Petersen I, Scott J, Shidhaye R, Vijayakumar L, Thornicroft G, Whiteford H (2016) Addressing the burden of mental, neurological, and substance use disorders: key messages from Disease Control Priorities, 3rd edition. *Lancet* **387**: 1672-1685
- Pattij T, Hijzen TH, Groenink L, Oosting RS, van der Gugten J, Maes RA, Hen R, Olivier B (2001) Stress-induced hyperthermia in the 5-HT<sub>1A</sub> receptor knockout mouse is normal. *Biol Psychiatry* **49**: 569-574
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, California, USA
- Pazos A, Palacios JM (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* **346**: 205-230
- Pei Q, Burnet PW, Grahame-Smith DG, Zetterstrom TS (1997) Differential effects of acute and chronic electroconvulsive shock on the abundance of messenger RNAs for voltage-dependent potassium channel subunits in the rat brain. *Neuroscience* **78**: 343-350
- Peifer M, Orsulic S, Pai LM, Loureiro J (1993) A model system for cell adhesion and signal transduction in *Drosophila*. *Dev Suppl*: 163-176
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* **14**: 285-293
- Perera TD, Dwork AJ, Keegan KA, Thirumangalakudi L, Lipira CM, Joyce N, Lange C, Higley JD, Rosoklija G, Hen R, Sackeim HA, Coplan JD (2011) Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates. *PLoS One* **6**: e17600
- Perry EK, Marshall EF, Blessed G, Tomlinson BE, Perry RH (1983) Decreased imipramine binding in the brains of patients with depressive illness. *Br J Psychiatry* **142**: 188-192
- Petrik D, Lagace DC, Eisch AJ (2012) The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? *Neuropharmacology* **62**: 21-34
- Petronis A, Gottesman, II, Kan P, Kennedy JL, Basile VS, Paterson AD, Pependikyte V (2003) Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? *Schizophr Bull* **29**: 169-178
- Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS (2003) Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* **17**: 879-886
- Pham TH, Mendez-David I, Defaix C, Guiard BP, Tritschler L, David DJ, Gardier AM (2017) Ketamine treatment involves medial prefrontal cortex serotonin to induce a rapid antidepressant-like activity in BALB/cJ mice. *Neuropharmacology* **112**: 198-209
- Phillips ML, Drevets WC, Rauch SL, Lane R (2003) Neurobiology of emotion perception II: Implications for major psychiatric disorders. *Biol Psychiatry* **54**: 515-528
- Pilar-Cuellar F, Vidal R, Diaz A, Castro E, dos Anjos S, Vargas V, Romero B, Valdizan EM (2014) Signaling pathways involved in antidepressant-induced cell proliferation and synaptic plasticity. *Curr Pharm Des* **20**: 3776-3794
- Pilar-Cuellar F, Vidal R, Pazos A (2012) Subchronic treatment with fluoxetine and ketanserin increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor, beta-catenin and antidepressant-like effects. *Br J Pharmacol* **165**: 1046-1057

- Pilar-Cuéllar F, Díaz A, Garro-Martínez E, Martín A, Romero B, Valdizán EM (2016) Radioligand Binding Detection of Receptors in Brain Membranes. En: Luján R, Ciruela F (Eds.) Receptor and Ion Channel Detection in the Brain. *Neuromethods*, vol 110. Humana Press, New York, NY
- Pitkanen A, Laakso M, Kalviainen R, Partanen K, Vainio P, Lehtovirta M, Riekkinen P, Soininen H (1996) Severity of hippocampal atrophy correlates with the prolongation of MRI T2 relaxation time in temporal lobe epilepsy but not in Alzheimer's disease. *Neurology* **46**: 1724-1730
- Pittenger C, Duman RS (2008) Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**: 88-109
- Pizzo R, O'Leary OF, Cryan JF (2017) Elucidation of the neural circuits activated by a GABAB receptor positive modulator: Relevance to anxiety. *Neuropharmacology*
- Plattner F, Hayashi K, Hernandez A, Benavides DR, Tassin TC, Tan C, Day J, Fina MW, Yuen EY, Yan Z, Goldberg MS, Nairn AC, Greengard P, Nestler EJ, Taussig R, Nishi A, Houslay MD, Bibb JA (2015) The role of ventral striatal cAMP signaling in stress-induced behaviors. *Nat Neurosci* **18**: 1094-1100
- Polakis P (1999) The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 15-21
- Polter A, Beurel E, Yang S, Garner R, Song L, Miller CA, Sweatt JD, McMahon L, Bartolucci AA, Li X, Jope RS (2010) Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances. *Neuropsychopharmacology* **35**: 1761-1774
- Polyakova M, Stuke K, Schuemberg K, Mueller K, Schoenknecht P, Schroeter ML (2015) BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: a systematic & quantitative meta-analysis. *J Affect Disord* **174**: 432-440
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**: 730-732
- Posener JA, Wang L, Price JL, Gado MH, Province MA, Miller MI, Babb CM, Csernansky JG (2003) High-dimensional mapping of the hippocampus in depression. *Am J Psychiatry* **160**: 83-89
- Price JL, Drevets WC (2010) Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* **35**: 192-216
- Pullarkat SR, Mysels DJ, Tan M, Cowen DS (1998) Coupling of serotonin 5-HT1B receptors to activation of mitogen-activated protein kinase (ERK-2) and p70 S6 kinase signaling systems. *J Neurochem* **71**: 1059-1067
- Purro SA, Ciani L, Hoyos-Flight M, Stamatakou E, Siomou E, Salinas PC (2008) Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli. *J Neurosci* **28**: 8644-8654
- Raab-Graham KF, Haddick PC, Jan YN, Jan LY (2006) Activity- and mTOR-dependent suppression of Kv1.1 channel mRNA translation in dendrites. *Science* **314**: 144-148
- Radley JJ, Jacobs BL (2002) 5-HT1A receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res* **955**: 264-267
- Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2004) Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* **125**: 1-6
- Rainer Q, Nguyen HT, Quesseveur G, Gardier AM, David DJ, Guiard BP (2012) Functional status of somatodendritic serotonin 1A autoreceptor after long-term treatment with fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression based on repeated corticosterone administration. *Mol Pharmacol* **81**: 106-112
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA (1999) Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry* **45**: 1085-1098
- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14476-14481

- Randrup A, Munkvad I, Fog R, Gerlach J, Molander L, Kjellberg B, et al. (1975) Mania, depression, and brain dopamine. En: Current Developments in Psychopharmacology. Essman WB, Valzelli S (Eds.). New York: Spectrum Publications. pp. 206-248
- Rao MS, Shetty AK (2004) Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* **19**: 234-246
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* **176**: 1243-1251
- Rausch JL, Johnson ME, Kasik KE, Stahl SM (2006) Temperature regulation in depression: functional 5HT1A receptor adaptation differentiates antidepressant response. *Neuropsychopharmacology* **31**: 2274-2280
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* **92**: 179-212
- Reiersen GW, Mastronardi CA, Licinio J, Wong ML (2009) Chronic imipramine downregulates cyclic AMP signaling in rat hippocampus. *Neuroreport* **20**: 307-311
- Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P (2005) ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* **24**: 742-752
- Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza PV, Abrous DN (2009) Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry* **14**: 959-967
- Ricci LC, Wellman MM (1990) Monoamines: biochemical markers of suicide? *J Clin Psychol* **46**: 106-116
- Rice D, Barone S, Jr. (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* **108 Suppl 3**: 511-533
- Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Beck SG, Hen R, Leonardo ED (2010) 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* **65**: 40-52
- Richardson-Jones JW, Craige CP, Nguyen TH, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Guiard BP, Beck SG, Hen R, Leonardo ED (2011) Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J Neurosci* **31**: 6008-6018
- Riga D, Matos MR, Glas A, Smit AB, Spijker S, Van den Oever MC (2014) Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. *Front Syst Neurosci* **8**: 230
- Rosa A, Peralta V, Papiol S, Cuesta MJ, Serrano F, Martinez-Larrea A, Fananas L (2004) Interleukin-1beta (IL-1beta) gene and increased risk for the depressive symptom-dimension in schizophrenia spectrum disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **124B**: 10-14
- Rosa P (2015) Behavioural evaluation of mice over-expressing postsynaptic 5-HT1A receptors: effect of cannabidiol. Trabajo fin de Master. Master de Iniciación a la Investigación en Salud mental
- Rosel P, Arranz B, Urretavizcaya M, Oros M, San L, Navarro MA (2004) Altered 5-HT2A and 5-HT4 postsynaptic receptors and their intracellular signalling systems IP3 and cAMP in brains from depressed violent suicide victims. *Neuropsychobiology* **49**: 189-195
- Rosen RC, Lane RM, Menza M (1999) Effects of SSRIs on sexual function: a critical review. *J Clin Psychopharmacol* **19**: 67-85
- Rosenbrock H, Bloching A, Weiss C, Borsini F (2005) Partial serotonergic denervation decreases progenitor cell proliferation in the adult rat hippocampus, but has no effect on rat behavior in the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav* **80**: 549-556
- Rosene DL, Van Hoesen GW (1977) Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. *Science* **198**: 315-317

- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M (2006a) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* **24**: 1850-1856
- Rossi DV, Valdez M, Gould GG, Hensler JG (2006b) Chronic administration of venlafaxine fails to attenuate 5-HT1A receptor function at the level of receptor-G protein interaction. *Int J Neuropsychopharmacol* **9**: 393-406
- Rosso SB, Inestrosa NC (2013) WNT signaling in neuronal maturation and synaptogenesis. *Front Cell Neurosci* **7**: 103
- Roy A, De Jong J, Linnoila M (1989) Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients. A 5-year follow-up study. *Arch Gen Psychiatry* **46**: 609-612
- Roychowdhury S, Haas H, Anderson EG (1994) 5-HT1A and 5-HT4 receptor colocalization on hippocampal pyramidal cells. *Neuropharmacology* **33**: 551-557
- Ruf BM, Bhagwagar Z (2009) The 5-HT1B receptor: a novel target for the pathophysiology of depression. *Curr Drug Targets* **10**: 1118-1138
- Rusch BD, Abercrombie HC, Oakes TR, Schaefer SM, Davidson RJ (2001) Hippocampal morphometry in depressed patients and control subjects: Relations to anxiety symptoms. *Biol Psychiat* **50**: 960-964
- Russo-Neustadt AA, Chen MJ (2005) Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity. *Curr Pharm Des* **11**: 1495-1510
- Russo E, Andreozzi F, Iuliano R, Dattilo V, Procopio T, Fiume G, Mimmi S, Perrotti N, Citraro R, Sesti G, Constanti A, De Sarro G (2014) Early molecular and behavioral response to lipopolysaccharide in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy and depressive-like behavior, involves interplay between AMPK, AKT/mTOR pathways and neuroinflammatory cytokine release. *Brain Behav Immun* **42**: 157-168
- Russo E, Citraro R, Donato G, Camastra C, Iuliano R, Cuzzocrea S, Constanti A, De Sarro G (2013) mTOR inhibition modulates epileptogenesis, seizures and depressive behavior in a genetic rat model of absence epilepsy. *Neuropharmacology* **69**: 25-36
- Russo E, Leo A, Crupi R, Aiello R, Lippiello P, Spiga R, Chimirri S, Citraro R, Cuzzocrea S, Constanti A, De Sarro G (2016) Everolimus improves memory and learning while worsening depressive- and anxiety-like behavior in an animal model of depression. *J Psychiatr Res* **78**: 1-10
- Sadot E, Simcha I, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Geiger B (1998) Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15339-15344
- Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castren M, Castren E (2005) Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* **25**: 1089-1094
- Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, Wu YT, Appel M, Rothman DL, Krystal JH, Mason GF (2004) Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry* **61**: 705-713
- Sanacora G, Treccani G, Popoli M (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* **62**: 63-77
- Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK (2008) Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 426-437
- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* **427**: 740-744
- Sani G, Napoletano F, Forte AM, Kotzalidis GD, Panaccione I, Porfiri GM, Simonetti A, Caloro M, Girardi N, Telesforo CL, Serra G, Romano S, Manfredi G, Savoia V, Tamorri SM, Koukopoulos AE, Serata D, Rapinesi C, Del Casale A, Nicoletti F, Girardi P (2012) The wnt pathway in mood disorders. *Curr Neuropharmacol* **10**: 239-253

- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004) Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* **14**: 1100-1109
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**: 805-809
- Sapolsky RM (1990) Glucocorticoids, hippocampal damage and the glutamatergic synapse. *Prog Brain Res* **86**: 13-23
- Sapolsky RM (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* **57**: 925-935
- Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE (1990) Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci* **10**: 2897-2902
- Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**: 1296-1302
- Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, Gunn RN, Grasby PM, Cowen PJ (2000) Brain serotonin1A receptor binding measured by positron emission tomography with [<sup>11</sup>C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry* **57**: 174-180
- Sari Y (2004) Serotonin1B receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neurosci Biobehav Rev* **28**: 565-582
- Savitz J, Lucki I, Drevets WC (2009) 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* **88**: 17-31
- Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17501-17506
- Schaffer CE, Davidson RJ, Saron C (1983) Frontal and parietal electroencephalogram asymmetry in depressed and nondepressed subjects. *Biol Psychiatry* **18**: 753-762
- Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S (2005) Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol* **192**: 348-356
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* **122**: 509-522
- Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K, Manji HK, Herkenham M (2010) Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol Psychiatry* **15**: 1152-1163
- Schmidt HD, Duman RS (2010) Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology* **35**: 2378-2391
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* **182**: 311-322
- Seese RR, Chen LY, Cox CD, Schulz D, Babayan AH, Bunney WE, Henn FA, Gall CM, Lynch G (2013) Synaptic abnormalities in the infralimbic cortex of a model of congenital depression. *J Neurosci* **33**: 13441-13448
- Seminowicz DA, Mayberg HS, McIntosh AR, Goldapple K, Kennedy S, Segal Z, Rafi-Tari S (2004) Limbic-frontal circuitry in major depression: a path modeling metanalysis. *Neuroimage* **22**: 409-418
- Sewards TV, Sewards MA (2003) Representations of motivational drives in mesial cortex, medial thalamus, hypothalamus and midbrain. *Brain Res Bull* **61**: 25-49
- Sharp T, Boothman L, Raley J, Queree P (2007) Important messages in the 'post': recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *Trends Pharmacol Sci* **28**: 629-636

- Sheline YI (1996) Hippocampal atrophy in major depression: a result of depression-induced neurotoxicity? *Mol Psychiatry* **1**: 298-299
- Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC (2003) Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* **160**: 1516-1518
- Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH (1999) Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci* **19**: 5034-5043
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW (1996) Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3908-3913
- Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T (2008) Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci* **99**: 631-637
- Siew LK, Love S, Dawbarn D, Wilcock GK, Allen SJ (2004) Measurement of pre- and post-synaptic proteins in cerebral cortex: effects of post-mortem delay. *J Neurosci Methods* **139**: 153-159
- Sigurdsson T, Stark KL, Karayiorgou M, Gogos JA, Gordon JA (2010) Impaired hippocampal-prefrontal synchrony in a genetic mouse model of schizophrenia. *Nature* **464**: 763-767
- Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, Miller AH (2005) Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol* **18**: 41-78
- Siopi E, Denizet M, Gabellec MM, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Guilloux JP, Lledo PM, Lazarini F (2016) Anxiety- and Depression-Like States Lead to Pronounced Olfactory Deficits and Impaired Adult Neurogenesis in Mice. *Journal of Neuroscience* **36**: 518-531
- Skolnick P, Layer RT, Popik P, Nowak G, Paul IA, Trullas R (1996) Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: Implications for the pharmacotherapy of depression. *Pharmacopsychiatry* **29**: 23-26
- Slattery DA, Cryan JF (2014) The ups and downs of modelling mood disorders in rodents. *ILAR J* **55**: 297-309
- Slattery DA, Neumann ID, Cryan JF (2011) Transient inactivation of the infralimbic cortex induces antidepressant-like effects in the rat. *J Psychopharmacol* **25**: 1295-1303
- Sleight AJ, Smith RJ, Marsden CA, Palfreyman MG (1989) The effects of chronic treatment with amitriptyline and MDL 72394 on the control of 5-HT release in vivo. *Neuropharmacology* **28**: 477-480
- Slipeczuk L, Bekinschtein P, Katze C, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2009) BDNF Activates mTOR to Regulate GluR1 Expression Required for Memory Formation. *PLoS One* **4**
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA (2011) Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* **476**: 458-461
- Sonino N, Fava GA (2002) Erratum to "CNS drugs in Cushing's disease: pathophysiological and therapeutic implications for mood disorders" [Prog. Neuro-Psychol. Biol. Psychiatry, 26, 763 (2002)]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **26**: 1011-1018
- Soriano P (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**: 70-71
- Spedding M, Jay T, Costa e Silva J, Perret L (2005) A pathophysiological paradigm for the therapy of psychiatric disease. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 467-476
- Sprouse JS, Aghajanian GK (1986) (-)-Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing by 5-HT1A selective agonists. *Eur J Pharmacol* **128**: 295-298
- Stanford IM, Lacey MG (1996) Differential actions of serotonin, mediated by 5-HT1B and 5-HT2C receptors, on GABA-mediated synaptic input to rat substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *J Neurosci* **16**: 7566-7573
- Stanley M, Virgilio J, Gershon S (1982) Tritiated imipramine binding sites are decreased in the frontal cortex of suicides. *Science* **216**: 1337-1339

- Steffens DC, Byrum CE, McQuoid DR, Greenberg DL, Payne ME, Blitchington TF, MacFall JR, Krishnan KR (2000) Hippocampal volume in geriatric depression. *Biol Psychiatry* **48**: 301-309
- Sternat T, Katzman MA (2016) Neurobiology of hedonic tone: the relationship between treatment-resistant depression, attention-deficit hyperactivity disorder, and substance abuse. *Neuropsychiatr Dis Treat* **12**: 2149-2164
- Stockmeier CA, Dilley GE, Shapiro LA, Overholser JC, Thompson PA, Meltzer HY (1997) Serotonin receptors in suicide victims with major depression. *Neuropsychopharmacology* **16**: 162-173
- Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G (1998) Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci* **18**: 7394-7401
- Strekalova T, Steinbusch HW (2010) Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **34**: 348-361
- Strobel A, Gutknecht L, Rothe C, Reif A, Mossner R, Zeng Y, Brocke B, Lesch KP (2003) Allelic variation in 5-HT1A receptor expression is associated with anxiety- and depression-related personality traits. *J Neural Transm (Vienna)* **110**: 1445-1453
- Sulser F (1978) Functional aspects of the norepinephrine receptor coupled adenylate cyclase system in the limbic forebrain and its modification by drugs which precipitate or alleviate depression: molecular approaches to an understanding of affective disorders. *Pharmakopsychiatr Neuropsychopharmakol* **11**: 43-52
- Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS (2000) Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. *Am J Psychiat* **157**: 1552-1562
- Sullivan RM (2004) Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. *Stress* **7**: 131-143
- Sullivan RM, Gratton A (1999) Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J Neurosci* **19**: 2834-2840
- Sun H, Kennedy PJ, Nestler EJ (2013) Epigenetics of the depressed brain: role of histone acetylation and methylation. *Neuropsychopharmacology* **38**: 124-137
- Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C (2008) Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry* **64**: 293-301
- Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C (2011) Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry* **16**: 1177-1188
- Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang X, El Yacoubi M, Vaugeois JM, Nomikos GG, Greengard P (2006) Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science* **311**: 77-80
- Swanson LW (1981) A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res* **217**: 150-154
- Swiech L, Perycz M, Malik A, Jaworski J (2008) Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 116-132
- Szewczyk B, Pochwat B, Rafalo A, Palucha-Poniewiera A, Domin H, Nowak G (2015) Activation of mTOR dependent signaling pathway is a necessary mechanism of antidepressant-like activity of zinc. *Neuropharmacology* **99**: 517-526
- Takahara T, Hara K, Yonezawa K, Sorimachi H, Maeda T (2006) Nutrient-dependent multimerization of the mammalian target of rapamycin through the N-terminal HEAT repeat region. *J Biol Chem* **281**: 28605-28614

- Takei N, Inamura N, Kawamura M, Namba H, Hara K, Yonezawa K, Nawa H (2004) Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J Neurosci* **24**: 9760-9769
- Takeuchi K, Shibamoto S, Nagamine K, Shigemori I, Omura S, Kitamura N, Ito F (2001) Signaling pathways leading to transcription and translation cooperatively regulate the transient increase in expression of c-Fos protein. *J Biol Chem* **276**: 26077-26083
- Tamburella A, Micale V, Navarria A, Drago F (2009) Antidepressant properties of the 5-HT<sub>4</sub> receptor partial agonist, SL65.0155: behavioral and neurochemical studies in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**: 1205-1210
- Tan S, Lam WP, Wai MS, Yu WH, Yew DT (2012) Chronic ketamine administration modulates midbrain dopamine system in mice. *PLoS One* **7**: e43947
- Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 467-472
- Tapia M, Del Puerto A, Puime A, Sanchez-Ponce D, Fronzaroli-Molinieres L, Pallas-Bazarrá N, Carlier E, Giraud P, Debanne D, Wandosell F, Garrido JJ (2013) GSK3 and beta-catenin determines functional expression of sodium channels at the axon initial segment. *Cell Mol Life Sci* **70**: 105-120
- Taschenberger H, Leao RM, Rowland KC, Spiro GA, von Gersdorff H (2002) Optimizing synaptic architecture and efficiency for high-frequency transmission. *Neuron* **36**: 1127-1143
- Tau GZ, Peterson BS (2010) Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology* **35**: 147-168
- Thierry B, Steru L, Simon P, Porsolt RD (1986) The tail suspension test: ethical considerations. *Psychopharmacology (Berl)* **90**: 284-285
- Thoenen H (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* **270**: 593-598
- Thome J, Sakai N, Shin K, Steffen C, Zhang YJ, Impey S, Storm D, Duman RS (2000) cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. *J Neurosci* **20**: 4030-4036
- Tovote P, Fadok JP, Luthi A (2015) Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* **16**: 317-331
- Tsai SJ, Hong CJ, Liou YJ (2010) Effects of BDNF polymorphisms on antidepressant action. *Psychiatry Investig* **7**: 236-242
- Turrigiano G (2011) Too many cooks? Intrinsic and synaptic homeostatic mechanisms in cortical circuit refinement. *Annu Rev Neurosci* **34**: 89-103
- Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol* **135**: 767-779
- Vaidya VA, Duman RS (2001) Depression--emerging insights from neurobiology. *Br Med Bull* **57**: 61-79
- Vakili K, Pillay SS, Lafer B, Fava M, Renshaw PF, Bonello-Cintron CM, Yurgelun-Todd DA (2000) Hippocampal volume in primary unipolar major depression: a magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry* **47**: 1087-1090
- Valdizan EM, Castro E, Pazos A (2010a) Agonist-dependent modulation of G-protein coupling and transduction of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rat dorsal raphe nucleus. *Int J Neuropsychopharmacol* **13**: 835-843
- Valdizan EM, Diez-Alarcia R, Gonzalez-Maeso J, Pilar-Cuellar F, Garcia-Sevilla JA, Meana JJ, Pazos A (2010b) alpha(2)-Adrenoceptor functionality in postmortem frontal cortex of depressed suicide victims. *Biol Psychiatry* **68**: 869-872
- Valdizan EM, Gutierrez O, Pazos A (2003) Adenylate cyclase activity in postmortem brain of suicide subjects: reduced response to beta-adrenergic stimulation. *Biol Psychiatry* **54**: 1457-1464

- Valenta T, Hausmann G, Basler K (2012) The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J* **31**: 2714-2736
- Van Bogaert M, Oosting R, Toth M, Groenink L, van Oorschot R, Olivier B (2006) Effects of genetic background and null mutation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors on basal and stress-induced body temperature: modulation by serotonergic and GABA<sub>A</sub>-ergic drugs. *Eur J Pharmacol* **550**: 84-90
- Van den Wyngaert I, Gommeren W, Verhasselt P, Jurzak M, Leysen J, Luyten W, Bender E (1997) Cloning and expression of a human serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor cDNA. *J Neurochem* **69**: 1810-1819
- van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S (1998) Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Brain Res Dev Brain Res* **111**: 245-252
- Varga V, Kocsis B, Sharp T (2003) Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Neurosci* **17**: 280-286
- Varga V, Szekely AD, Csillag A, Sharp T, Hajos M (2001) Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience* **106**: 783-792
- Varnas K, Hall H, Bonaventure P, Sedvall G (2001) Autoradiographic mapping of 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors in the post mortem human brain using [(3)H]GR 125743. *Brain Res* **915**: 47-57
- Varnas K, Halldin C, Pike VW, Hall H (2003) Distribution of 5-HT<sub>4</sub> receptors in the postmortem human brain--an autoradiographic study using [125I]SB 207710. *Eur Neuropsychopharmacol* **13**: 228-234
- Veerakumar A, Challis C, Gupta P, Da J, Upadhyay A, Beck SG, Berton O (2014) Antidepressant-like effects of cortical deep brain stimulation coincide with pro-neuroplastic adaptations of serotonin systems. *Biol Psychiatry* **76**: 203-212
- Venzala E, Garcia-Garcia AL, Elizalde N, Tordera RM (2013) Social vs. environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. *Eur Neuropsychopharmacol* **23**: 697-708
- Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* **142**: 1-20
- Vestergaard P, Sorensen T, Hoppe E, Rafaelsen OJ, Yates CM, Nicolaou N (1978) Biogenic amine metabolites in cerebrospinal fluid of patients with affective disorders. *Acta Psychiatr Scand* **58**: 88-96
- Vetulani J, Stawarz RJ, Dingell JV, Sulser F (1976) A possible common mechanism of action of antidepressant treatments: reduction in the sensitivity of the noradrenergic cyclic AMP generating system in the rat limbic forebrain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **293**: 109-114
- Vidal R, Castro E, Pilar-Cuellar F, Pascual-Brazo J, Diaz A, Rojo ML, Linge R, Martin A, Valdizan EM, Pazos A (2014) Serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptors: A new strategy for developing fast acting antidepressants? *Curr Pharm Des* **20**: 3751-3762
- Vidal R, Diaz A, Pazos A, Castro E (2013) Region-specific regulation of 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the rat brain by chronic venlafaxine treatment. *Psychopharmacology (Berl)* **229**: 177-185
- Vidal R, Pilar-Cuellar F, dos Anjos S, Linge R, Treceno B, Vargas VI, Rodriguez-Gaztelumendi A, Mostany R, Castro E, Diaz A, Valdizan EM, Pazos A (2011) New strategies in the development of antidepressants: towards the modulation of neuroplasticity pathways. *Curr Pharm Des* **17**: 521-533
- Vidal R, Valdizan EM, Mostany R, Pazos A, Castro E (2009) Long-term treatment with fluoxetine induces desensitization of 5-HT<sub>4</sub> receptor-dependent signalling and functionality in rat brain. *J Neurochem* **110**: 1120-1127
- Vidal R, Valdizan EM, Vilaro MT, Pazos A, Castro E (2010) Reduced signal transduction by 5-HT<sub>4</sub> receptors after long-term venlafaxine treatment in rats. *Br J Pharmacol* **161**: 695-706
- Vidal R, Garro-Martínez E, Diaz A, Castro E, Florensa-Zanuy E, Taketo MM, Pazos A, Pilar-Cuellar F. Targeting the hippocampal  $\beta$ -catenin: impact on anxiety and depression-related behavior and neurogenesis (enviado para su publicación)

- Videbech P, Ravnkilde B (2004) Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry* **161**: 1957-1966
- Vilaro MT, Cortes R, Gerald C, Branchek TA, Palacios JM, Mengod G (1996) Localization of 5-HT<sub>4</sub> receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Mol Brain Res* **43**: 356-360
- Vilaro MT, Cortes R, Mengod G (2005) Serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptors and their mRNAs in rat and guinea pig brain: distribution and effects of neurotoxic lesions. *J Comp Neurol* **484**: 418-439
- Vinkers CH, van Bogaert MJ, Klanker M, Korte SM, Oosting R, Hanania T, Hopkins SC, Olivier B, Groenink L (2008) Translational aspects of pharmacological research into anxiety disorders: the stress-induced hyperthermia (SIH) paradigm. *Eur J Pharmacol* **585**: 407-425
- Vivar C, van Praag H (2013) Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Front Neural Circuits* **7**: 15
- Vollmayr B, Simonis C, Weber S, Gass P, Henn F (2003) Reduced cell proliferation in the dentate gyrus is not correlated with the development of learned helplessness. *Biol Psychiatry* **54**: 1035-1040
- Wada A (2009) Lithium and neuropsychiatric therapeutics: neuroplasticity via glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and neurotrophin cascades. *J Pharmacol Sci* **110**: 14-28
- Waeber C, Sebben M, Nieoullon A, Bockaert J, Dumuis A (1994) Regional distribution and ontogeny of 5-HT<sub>4</sub> binding sites in rodent brain. *Neuropharmacology* **33**: 527-541
- Wang HT, Zeng L, Chen Q, Zhang X, Liu JW, Lu TJ, Xiong ZQ, Zheng J, Hu ZL (2015) beta-Catenin is required for maintaining hippocampal morphology during the perinatal period. *Neuroscience* **284**: 273-282
- Wang JW, David DJ, Monckton JE, Battaglia F, Hen R (2008) Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci* **28**: 1374-1384
- Wang M, Perova Z, Arenkiel BR, Li B (2014) Synaptic modifications in the medial prefrontal cortex in susceptibility and resilience to stress. *J Neurosci* **34**: 7485-7492
- Warden MR, Selimbeyoglu A, Mirzabekov JJ, Lo M, Thompson KR, Kim SY, Adhikari A, Tye KM, Frank LM, Deisseroth K (2012) A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature* **492**: 428-432
- Warner-Schmidt JL, Chen EY, Zhang X, Marshall JJ, Morozov A, Svenningsson P, Greengard P (2010) A role for p11 in the antidepressant action of brain-derived neurotrophic factor. *Biol Psychiatry* **68**: 528-535
- Warner-Schmidt JL, Duman RS (2006) Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* **16**: 239-249
- Warner-Schmidt JL, Flajolet M, Maller A, Chen EY, Qi H, Svenningsson P, Greengard P (2009) Role of p11 in cellular and behavioral effects of 5-HT<sub>4</sub> receptor stimulation. *J Neurosci* **29**: 1937-1946
- Watanabe Y, Sakai RR, McEwen BS, Mendelson S (1993) Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors and transport sites for serotonin. *Brain Res* **615**: 87-94
- Watts VJ (2002) Molecular mechanisms for heterologous sensitization of adenylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* **302**: 1-7
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* **7**: 847-854
- Wexler EM, Geschwind DH, Palmer TD (2008) Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation. *Mol Psychiatry* **13**: 285-292
- Wexler EM, Paucer A, Kornblum HI, Palmer TD, Geschwind DH (2009) Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency. *Stem Cells* **27**: 1130-1141
- Whale R, Clifford EM, Bhagwagar Z, Cowen PJ (2001) Decreased sensitivity of 5-HT<sub>1D</sub> receptors in melancholic depression. *Br J Psychiatry* **178**: 454-457

- Williams NR, Schatzberg AF (2016) NMDA antagonist treatment of depression. *Curr Opin Neurobiol* **36**: 112-117
- Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* **52**: 90-110
- Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW (1999) The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev* **13**: 270-283
- Wong EY, Herbert J (2006) Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience* **137**: 83-92
- Woodhead GJ, Mutch CA, Olson EC, Chenn A (2006) Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation. *J Neurosci* **26**: 12620-12630
- Xing Y, Clements WK, Kimelman D, Xu W (2003) Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes Dev* **17**: 2753-2764
- Xing Y, Takemaru K, Liu J, Berndt JD, Zheng JJ, Moon RT, Xu W (2008) Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure* **16**: 478-487
- Yamada M, Kawahara Y, Kaneko F, Kishikawa Y, Sotogaku N, Poppinga WJ, Folgering JH, Dremencov E, Kawahara H, Nishi A (2013) Upregulation of the dorsal raphe nucleus-prefrontal cortex serotonin system by chronic treatment with escitalopram in hyposerotonergic Wistar-Kyoto rats. *Neuropharmacology* **72**: 169-178
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**: 889-901
- Yatham LN, Liddle PF, Dennie J, Shiah IS, Adam MJ, Lane CJ, Lam RW, Ruth TJ (1999) Decrease in brain serotonin 2 receptor binding in patients with major depression following desipramine treatment: a positron emission tomography study with fluorine-18-labeled setoperone. *Arch Gen Psychiatry* **56**: 705-711
- Yoon SC, Seo MS, Kim SH, Jeon WJ, Ahn YM, Kang UG, Kim YS (2008) The effect of MK-801 on mTOR/p70S6K and translation-related proteins in rat frontal cortex. *Neurosci Lett* **434**: 23-28
- Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT (1996) The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* **10**: 1443-1454
- Yu X, Malenka RC (2003) Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci* **6**: 1169-1177
- Zaghetto AA, Paina S, Mantero S, Platonova N, Peretto P, Bovetti S, Puche A, Piccolo S, Merlo GR (2007) Activation of the Wnt-beta catenin pathway in a cell population on the surface of the forebrain is essential for the establishment of olfactory axon connections. *J Neurosci* **27**: 9757-9768
- Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Georgiou P, Fischell J, Elmer GI, Alkondon M, Yuan P, Pribut HJ, Singh NS, Dossou KS, Fang Y, Huang XP, Mayo CL, Wainer IW, Albuquerque EX, Thompson SM, Thomas CJ, Zarate CA, Jr., Gould TD (2016) NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature* **533**: 481-486
- Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. (2006) A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*, Vol. 63, pp. 856-864.
- Zazpe A, Artaiz I, Innerarity A, Del Olmo E, Castro E, Labeaga L, Pazos A, Orjales A (2006) In vitro and in vivo characterization of F-97013-GD, a partial 5-HT1A agonist with antipsychotic- and antiparkinsonian-like properties. *Neuropharmacology* **51**: 129-140
- Zechner D, Fujita Y, Hulsken J, Muller T, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB, 3rd, Birchmeier W, Birchmeier C (2003) beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol* **258**: 406-418

- Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, Wynshaw-Boris A, Hsieh JC, He X (2008) Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* **135**: 367-375
- Zetterstrom TS, Pei Q, Grahame-Smith DG (1998) Repeated electroconvulsive shock extends the duration of enhanced gene expression for BDNF in rat brain compared with a single administration. *Brain Res Mol Brain Res* **57**: 106-110
- Zhang LI, Poo MM (2001) Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* **4 Suppl**: 1207-1214
- Zhang Y, Gu F, Chen J, Dong W (2010) Chronic antidepressant administration alleviates frontal and hippocampal BDNF deficits in CUMS rat. *Brain Res* **1366**: 141-148
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* **132**: 645-660
- Zhou CJ, Zhao C, Pleasure SJ (2004) Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *J Neurosci* **24**: 121-126
- Zhou W, Wang N, Yang C, Li XM, Zhou ZQ, Yang JJ (2014) Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. *Eur Psychiatry* **29**: 419-423
- Zhou WJ, Xu N, Kong L, Sun SC, Xu XF, Jia MZ, Wang Y, Chen ZY (2016) The antidepressant roles of Wnt2 and Wnt3 in stress-induced depression-like behaviors. *Transl Psychiatry* **6**: e892
- Zhu XH, Yan HC, Zhang J, Qu HD, Qiu XS, Chen L, Li SJ, Cao X, Bean JC, Chen LH, Qin XH, Liu JH, Bai XC, Mei L, Gao TM (2010) Intermittent hypoxia promotes hippocampal neurogenesis and produces antidepressant-like effects in adult rats. *J Neurosci* **30**: 12653-12663