



**UNIVERSIDAD DE CATABRIA**  
INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA DE CANTABRIA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGIA

**MECANISMOS MOLECULARES RELACIONADOS CON LA  
VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA Y LA ENFERMEDAD  
PSIQUIÁTRICA**

**Veronica Inés Vargas**  
**2015**

**DIRECTORES: ANGEL PAZOS Y ELSA M VALDIZAN RUIZ**





## AUTORIZACIÓN PARA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

<b>Datos personales del alumno</b>			
Primer apellido VARGAS	Segundo apellido	Nombre VERONICA INES	
DNI/Pasaporte X9212478N	Calle/Avenida/Plaza y número PERINES 41, 1ºC		
Población SANTANDER	Provincia CANTABRIA	Código postal 39007	País
Nacionalidad ARGENTINA	Dirección de correo electrónico veronica-ines.vargas@alumnos.unican.es	Teléfono 942201985	Teléfono móvil

<b>Autorización del Departamento</b>
El DPTO. FISILOGIA Y FARMACOLOGIA en su reunión de fecha 27-01-2016, teniendo en cuenta la autorización concedida por el Director/es de la tesis <b>Mecanismos Moleculares Relacionados con la Vía Wnt/B-Catenina en la Enfermedad Psiquiátrica</b> , acordó dar su conformidad para la presentación de la tesis doctoral a la Comisión de Doctorado.

<b>Traducción al inglés del título de la tesis</b>
Molecular Mechanisms Related to the Wnt/B-Catenina Pathway in the Psychiatric Diseases

Santander, 27 de enero de 2016  
El director/a del Departamento



Fdo.: MARIA AMOR HURLE GONZALEZ



**A Alvaro**



ÁNGEL PAZOS CARRO, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria y ELSA M VALDIZAN RUIZ, Profesora Titular de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada 'Mecanismos Moleculares Relacionados con la Vía Wnt/ $\beta$ -Catenina en la Enfermedad Psiquiátrica, ha sido realizada por Veronica Ines Vargas, bajo su dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria.

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda económica procedente de las siguientes entidades: CICYT (SAF 04-00941; SAF07-61862); CIBERSAM; Fundación Mutua Madrileña y Plan Nacional sobre Drogas.

Revisado el presente trabajo, estimamos que puede ser presentado para su defensa ante el correspondiente Tribunal para la obtencion del grado de Doctor.

Santander, Enero de 2015



Ángel Pazos Carro



Elsa M Valdizán



## AGRADECIMIENTOS

*Recordar en este momento a todas las personas a las que una le tiene que agradecer su apoyo o su ayuda en el transcurso de estos años de tesis es muy complicado, y creo que cometeré el error de omitir a alguna de ellas, de todas maneras intentaré que no suceda dentro de este pequeño espacio físico.*

*En primer lugar debo agradecer al Dr Angel Pazos por brindarme la oportunidad de realizar la tesis en su grupo y vivir en Santander.*

*Quiero agradecerle a Elsa por ejercer de directora de esta tesis desde el primer momento, por iniciarme en la vida científica, y porque por encima de todas las cosas se ha convertido en mi amiga.*

*A los doctores Rafael Rodriguez Puertas, Analia Bortolozzi y Javier Gonzalez Maeso, por permitirme realizar estancias en sus grupos y conocer no sólo nuevos lugares sino también grandes personas.*

*A Alvaro, Elena, Pepi, y Lulu por toda la ayuda prestada en mis comienzos, a mis "pequeñas" Beita, Rebe, Helen y Alicia por rescatarme más de una vez dentro del laboratorio. A Victor por pasarse a alegrar los ratitos de experimentos. A mis grandes colegas de grupo Fuen, Seve, Antonio, Ma Luisa, Rachel y Reme.*

*A los nuevos becarios del grupo que son dos soles Emilio y Josep (no se siesta bien escrito je)*

*A Bea Martinez por ser una genio de las PCRs y una mejor compañera de piso.*

*A Delfi y Fer mi pequeño consulado en Santander, gracias por ser mi país fuera de mi país, las adoro!*

*A todos los compañeros de pasillo tanto en la Facultad como en el Instituto: Miriam, Susana, Cecilia, Lara, Raquel, Ana, Nieves, David Aquilino. Maigüi, Marcos, Jorge, Nacho, Vanessa, Montse, Sonia, Juanan, Lore, las Paulas, Adán, Ana, Héctor y Javi.*

*A mis chicas Platinum María, Bea y María por ser mis compañeras de viajes, ferias y mi alojamiento en los viajes a Santander (yo sé que tenían miedo que me les instalara para siempre)*

*A mi familia política. Gracias por vuestro apoyo y por darme siempre ánimos.*

*A mis tíos, tías y abuelas que os habéis preocupado por mí.*

*A mis hermanos José y Matías, quien siempre me han aconsejado y acompañado que hiciera lo que me gustara, y a mis padres, por darme una educación y transmitirme unos valores que he intentado seguir.*

*A mamá que casi pierde los nervios conmigo más de una vez, pero que aun así soporta y soportará todas mis locuras y planes extraños, te quiero muchísimo.*

*Por último, a vos Alvaro, porque solamente vos sabes por todo lo que he pasado hasta hoy. Sin ti, no habría habido manera de conseguirlo. Gracias por tu cariño y tu comprensión en casa, por tu compañía y por ser el mejor niño de los peques gatunos.*



## **ABREVIATURAS**

5-HT: Serotonina

ACTH: corticotrofina

AD: Antidepresivos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BrdU: bromodesoxiuridina

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

COR: Cultivo Organotípico

CPF: Corteza prefrontal

CPH: Células Progenitoras inmortalizadas de Hipocampo

CREB: elemento de respuesta a AMPC

Cx: Corteza

DA: Dopamina

DSM-IV-TR: Manual of mental disorders. 4th edition. Text revision

GSK3- $\beta$ : glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$

Hp: Hipocampo

ISRN: Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Noradrenalina

ISRS: inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina

JNK: quinasa *c-Jun* N-terminal

NA: Noradrenalina

NSC: células madre neuronales

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SGZ: Zona Subgranular

SNP: *polimorfismo* en un sólo nucleótido

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

SVZ: Zona Subventricular

T: test de Student

TB: Trastorno bipolar

Trk $\beta$ : receptor quinasa tirosina

VPA: Valproato

X<sup>2</sup>: Chi-cuadrado



## INDICE

INTRODUCCION .....	1
1. Neurogénesis en el cerebro adulto.....	2
1.1. Origen de la neurogénesis en el cerebro adulto.....	2
1.2. Zonas neurogénicas en el cerebro adulto.....	2
1.3. Regulación de la neurogénesis en el cerebro adulto.....	3
2. Las teorías neuroproliferativa/neuroplástica como base biológica de la depresión.....	5
2.1. Implicación de la proliferación neuronal y la plasticidad en los trastornos afectivos.....	6
3. Fármacos ADs y neurogénesis.....	7
4. Vías de señalización implicadas en la proliferación y la plasticidad neuronal moduladas por ADs.....	9
4.1. Receptores de serotonina.....	9
4.1.1. Receptores 5-HT <sub>1A</sub> .....	9
4.1.2. Receptores 5-HT <sub>2A/C</sub> .....	10
4.1.3. Receptores 5-HT <sub>4</sub> .....	11
4.1.4. Receptores 5-HT <sub>6</sub> .....	11
4.1.5. Receptores 5-HT <sub>7</sub> .....	12
4.2. Factores de crecimiento y neurotrofinas.....	12
4.2.1. BDNF.....	12
4.2.1.1. Transducción de la señal de BDNF. Receptores para BDNF.....	12
4.2.1.2. Papel de BDNF en la neurogénesis y plasticidad sináptica.....	12
4.2.1.3. Papel de BDNF en la etiopatogenia de la depresión.....	13
4.2.1.4. Papel de BDNF en el mecanismo de acción de los fármacos ADs.....	13
4.2.2. VEGF.....	14
4.2.2.1. Regulación de la expresión de VEGF.....	15
4.2.2.2. Receptores VEGF.....	15
4.2.2.3. Transducción de la señal intracelular de VEGF.....	15
4.2.2.4. Papel de VEGF en la neurogénesis y plasticidad sináptica.....	15
4.2.2.5. Papel de VEGF en la etiopatogenia de la depresión.....	16
4.2.2.6. Papel de VEGF en el mecanismo de acción de los fármacos ADs.....	17
4.3. Vías intracelulares.....	18
4.3.1. Cascada del adenosín monofosfato cíclico (cAMP).....	18
4.3.2. Vía de Wnt/ $\beta$ -Catenina.....	19
4.3.2.1. Ligandos WNT, receptores y co-receptores.....	21
4.3.2.2. $\beta$ -catenina.....	22
4.3.2.2.1. Regulación de los niveles de $\beta$ -catenina en citosol.....	23
4.3.2.2.2. Translocación al núcleo de $\beta$ -catenina.....	23
4.3.2.3. Axina.....	24
4.3.2.4. Casein kinase 1a (CK1a).....	26
4.3.2.5. Glycogen synthase kinase (GSK3).....	26
4.3.2.6. APC.....	26
4.3.2.7. Papel de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la neurogénesis y la plasticidad.....	27
4.3.2.8. Papel de la vía Wnt / $\beta$ -catenina en la etiopatogenia de la depresión.....	28
4.3.2.9. Papel de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en el mecanismo de acción de los fármacos ADs.....	29
4.3.2.10. Implicación de polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) en la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y la depresión.....	31
4.3.2.10.1. AKT1.....	31
4.3.2.10.2. Axin.....	32
4.3.2.10.3. CTNNB1 ( $\beta$ -catenina).....	33
4.3.2.10.4. DAAM2.....	33
4.3.2.10.5. DKK4.....	33
4.3.2.10.6. GSK3 $\beta$ .....	34
4.3.2.10.7. WNT.....	34
4.3.2.10.8. ZBED.....	35
4.3.2.10.9. FZD3.....	35
4.4. Vía Notch.....	35



4.4.1 Vía de señalización Notch .....	36
4.4.1.1. Localización y función de Notch .....	37
4.4.2. Papel de Notch en la plasticidad sináptica y en la neurogénesis .....	37
4.4.3. Notch: Interacción con otras vías de señalización .....	38
4.4.4. Papel de Notch en la etiopatogenia de la depresión, en el mecanismo de acción de los fármacos ADs .....	38
4.5. c-MYC .....	39
4.6. c-Jun .....	40
4.6.1. c-jun: interacción con otras vías de señalización .....	41
4.6.2. Papel de c-jun en la plasticidad .....	41
4.6.3. Papel de c-jun en la etiopatogenia de la depresión .....	41
4.6.4. Papel de c-jun en el mecanismo de acción de los fármacos ADs .....	41
4.7. Ciclina D1 .....	41
4.8. PPAR $\gamma$ .....	42
4.8.1. Señalización por los receptores PPAR $\gamma$ .....	42
4.8.2. Papel de PPAR $\gamma$ en la plasticidad sináptica y la neurogénesis .....	44
4.8.3 PPAR: Interacción con otras vías de señalización .....	44
4.8.4. Papel de PPAR $\gamma$ en la etiopatogenia de la depresión y en el mecanismo de acción de los fármacos ADs .....	44
HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	49
MATERIAL Y MÉTODOS .....	53
1.- Estudios en animales .....	53
1.1.- Animales de experimentación .....	53
1.1.1.- Cultivos organotípicos .....	53
1.1.2.- Cultivos primarios de células madre neuronales de hipocampo .....	54
1.2.- Selección de genes candidatos .....	55
1.3.- Tratamientos Farmacológicos .....	56
1.3.1. Tratamiento de cultivos organotípicos .....	56
1.3.2. Tratamiento de los cultivos primarios de células madre neuronales de hipocampo .....	57
1.4.- Extracción de ARNt y retrotranscripción (RT) .....	57
1.4.1. Extracción de ARNt de los cultivos primarios de células madre neuronales de hipocampo .....	57
1.4.2. Extracción de ARNt del hipocampo y la corteza de los cultivos organotípicos .....	58
1.4.3. Retrotranscripción (RT) .....	58
1.5.- Determinación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real .....	59
1.6.- Ensayos de inmunofluorescencia .....	60
1.6.1.- Ensayos de inmunofluorescencia en cultivos primarios de progenitoras neuronales de hipocampo .....	60
1.6.1.1. Preparación de cubreobjetos de 12 mm .....	60
1.6.1.2. Fijación e inmunofluorescencia .....	60
1.6.2.- Ensayos de inmunofluorescencia en cultivos organotípicos .....	60
1.7.- Estudios de proliferación in vitro de células progenitoras tratadas con antidepresivos .....	61
1.7.1- Preparación para los estudios de proliferación .....	61
1.8.- Determinación de actividad transcripcional de PPAR $\gamma$ .....	61
1.8.1.- Obtención de extracto nuclear y citosólico .....	61
1.8.2.- Ensayo de actividad transcripcional de PPAR $\gamma$ .....	62
2.- Estudios en humano: Estudio de Genotipado .....	62
2.1.- Diseño del Estudio .....	62
2.1.1- Tamaño de la muestra y cálculos estadísticos de potencia. ....	62
2.1.2.- Criterios de inclusión .....	62
2.1.3.- Variables demográficas .....	63
2.2.- Búsqueda de polimorfismos .....	63
2.3.- Extracción de ADN .....	63
2.4.- Tecnología MassARRAY (SEQUENOM) Realizada por el CEGEN .....	63
3.- Cálculos .....	65
3.1. Nivel de expresión génica .....	65
3.2.- Frecuencias alélicas y genotípicas .....	66
3.3.- Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	66
3.4.- Odds ratios .....	66

3.5.- Estudio de genotipado: análisis estadístico .....	66
3.6.- Estudio de asociación: análisis estadístico .....	67
RESULTADOS: .....	71
Parte A. Estudios de Expresión Génica .....	71
1. Efecto de los fármacos antidepresivos sobre la proliferación celular .....	71
2. Efecto de los fármacos antidepresivos sobre la expresión de genes implicados en procesos de proliferación/plasticidad .....	72
2.1. Axin-1 .....	73
2.1.1.- Expresión basal de Axin-1 en células progenitoras de hipocampo y en cerebro .....	73
2.1.2.- Modulación de la expresión de Axin-1 por fármacos antidepresivos	73
2.1.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH) .....	73
2.1.2.2.- Cerebro.....	74
2.2.- Axin-2.....	76
2.2.1.- Expresión basal de Axin-2 en células progenitoras de hipocampo y en cerebro .....	76
2.2.2.- Modulación de la expresión de Axin-2 por fármacos antidepresivos	77
2.2.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH) .....	77
2.2.2.2.- Cerebro.....	78
2.3. Ctnnb1 .....	80
2.3.1.- Expresión basal de Ctnnb1 en células progenitoras de hipocampo y en cerebro .....	80
2.3.2.- Modulación de la expresión de Ctnnb1 por fármacos antidepresivos	81
2.3.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH) .....	81
2.3.2.2.- Cerebro.....	82
2.4. c-Myc .....	85
2.4. 1.- Expresión basal de c-Myc en células progenitoras de hipocampo y en cerebro .....	85
2.4.2.- Modulación de la expresión de c-Myc por fármacos antidepresivos	85
2.4.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH) .....	85
2.4.2.2.- Cerebro.....	86
2.5. c-Jun.....	89
2.5.1.- Expresión basal de c-Jun en células progenitoras de hipocampo y en cerebro .....	89
2.5.2.- Modulación de la expresión de c-Jun por fármacos antidepresivos.	89
2.5.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH) .....	89
2.5.2.2.- Cerebro.....	90
2.6. Ccnd1 .....	93
2.6.1.- Expresión basal de Ccnd1 en células progenitoras de hipocampo y en cerebro .....	93
2.6.2.- Modulación de la expresión de Ccnd1 por fármacos antidepresivos	94
2.6.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH) .....	94
2.6.2.2.- Cerebro.....	94
2.7. Pparγ .....	98
2.7.1.- Expresión basal de Pparγ en células progenitoras de hipocampo y en cerebro.....	98
2.7.2.- Modulación de la expresión de Pparγ por fármacos antidepresivos	98
2.7.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH) .....	98
2.7.2.2.- Cerebro.....	98
2.8. Notch-1.....	102
2.8.1.- Expresión basal de Notch-1 en células progenitoras de hipocampo y en cerebro .....	102
2.8.2.- Modulación de la expresión de Notch-1 por fármacos antidepresivos	102
2.8.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH) .....	102
2.8.2.2.- Cerebro.....	103
2.9. Vegf.....	106
2.9.1.- Expresión basal de Vegf en células progenitoras de hipocampo y en cerebro.....	106
2.9.2.- Modulación de la expresión de Vegf por fármacos antidepresivos	106
2.9.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH) .....	106
2.9.2.2.- Cerebro.....	107

3. Efecto de los fármacos antidepresivos sobre la expresión de la proteína $\beta$ -catenina en cultivos primarios de células progenitoras de hipocampo .....	113
4. Modulación de la actividad PPAR $\gamma$ en extracto nuclear del hipocampo de rodajas de cerebro en cultivo. ....	113
Parte B.....	117
5. Estudio de Genotipado.....	117
5.1. Características de la población de estudio.....	117
5.2. Genes candidatos y SNP seleccionados .....	117
5.3. Estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas y asociación con la enfermedad para cada SNP .....	118
5.3.1 AKT1 .....	119
5.3.2 APC .....	121
5.3.3 AXIN1.....	124
5.3.4 AXIN2.....	125
5.3.5 CTNNB1 .....	127
5.3.6 DAAM2.....	133
5.3.7 DKK4 .....	135
5.3.8 FZD3.....	136
5.3.9 GSK3 $\beta$ .....	137
5.3.10 WNT2B .....	140
5.3.11 WNT3.....	141
5.3.12 ZBED3.....	142
DISCUSIÓN:.....	150
1.- MODULACION DE GENES POR LA FLUOXETINA .....	150
1.1 Axin .....	150
1.2 Ctnnb1( $\beta$ -catenina).....	151
1.3 Genes de respuesta rápida: c-Myc.....	152
1.5. Ccnd1 .....	152
1.6. Ppar- $\gamma$ .....	153
1.7. Notch1 .....	153
1.8. Vegf.....	154
2.- MODULACION DE GENES POR LA PAROXETINA.....	154
2.1 Axin y Ctnnb1( $\beta$ -catenina) .....	154
2.2 Genes de respuesta rápida c-myc y c-jun .....	155
2.3. Ccnd1 .....	155
2.4. Ppar- $\gamma$ .....	155
2.5. Notch1 y Vegf.....	156
3.- MODULACION DE GENES POR LA VENLAFAXINA .....	156
3.1. Axin y $\beta$ -catenina.....	156
3.2 Genes de respuesta rápida c-Myc y c-Jun .....	157
3.3. Ccnd1 y Ppar- $\gamma$ .....	157
3.4. Notch1 y Vegf.....	158
4.- MODULACION DE GENES POR EL RS 67333 .....	159
4.1. Axin y $\beta$ -catenina.....	159
4.2 Los IEGs (genes tempranos inmediatos) c-myc y c-jun.....	160
4.3. Ccnd1 y PPAR- $\gamma$ .....	161
4.4. Notch1 y Vegf.....	161
5.- IMPLICACIÓN DE SNP DE LA VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA EN LA ETIOPATOGENIA DEL ADEPRESIÓN .....	162
5.1. AKT1 .....	162
5.2. APC .....	163
5.3. AXIN .....	163
5.3.1.- AXIN1-rs214250- .....	163
5.3.2. AXIN2-rs7210356, rs3923086-.....	163
5.4. CTNNB1 .....	163
5.5. DAAM2 FZD3 .....	164
5.6. DKK4 .....	164
5.7. FZD3.....	164
5.8. GSK3 $\beta$ .....	165
5.9. WNT .....	165
5.98.1. WNT2b .....	165
5.9.2. WNT3 .....	165

5.10. ZBED .....	165
CONCLUSIONES .....	170
BIBLIOGRAFIA .....	174

## **INTRODUCCION**



## INTRODUCCION

La depresión es una de las enfermedades neuropsiquiátricas más prevalentes en los países desarrollados. Afecta a alrededor del 20% de la población, siendo casi dos veces más común en mujeres que en hombres. La depresión representa una de las diez causas de mayor morbimortalidad a nivel mundial {Hirschfeld, 2012 #2545}. Las manifestaciones clínicas de la depresión mayor pueden incluir distintas alteraciones en la esfera psíquica del individuo, como el estado de ánimo, la ansiedad, el miedo, la disfunción de los mecanismos de recompensa, la atención, la motivación, la respuesta al estrés, la interacción social o la función neurovegetativa (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders {Association, 2013 #2507} estos pacientes presentan una reactividad débil tanto a estímulos positivos como negativos {Bylsma, 2008 #2486}. Múltiples áreas cerebrales están implicadas en las alteraciones neuropsíquicas que aparecen en estos enfermos como el sistema límbico, incluyendo la formación del hipocampo, la circunvolución del cíngulo, el tálamo, la amígdala, diversas estructuras corticales y el hipotálamo {Koenigs, 2009 #2487;Price, 2010 #2488}.

Las bases neurobiológicas de la depresión no están totalmente aclaradas. En la década de los 50, se demostró que, fármacos como la imipramina que ejercían un efecto antidepressivo, aumentaban los niveles cerebrales de monoaminas {Schildkraut, 1965 #2490}. Estas observaciones llevaron a la elaboración de la clásica "hipótesis monoaminérgica de depresión", que relaciona la depresión con una disminución de los niveles cerebrales de monoaminas (revisado en: {Mulinari, 2012 #2491;Mulinari, 2012 #2491;Mulinari, 2012 #2491}. Los ADs clásicos que aumentan los niveles de monoaminas (sobre todo serotonina y noradrenalina) en la sinapsis, se utilizan como tratamiento de primera línea para la depresión. Desde un punto de vista clínico, los fármacos ADs disponibles presentan varias limitaciones: sólo son eficaces en el 60-80% de los pacientes, la mejoría clínica se lleva a cabo después de 3-4 semanas de tratamiento, presentan una variedad de efectos secundarios que pueden conducir al incumplimiento terapéutico, además de la existencia de hasta un 40% de los pacientes resistentes a los fármacos actuales revisado en: {Adell, 2005 #2546;Adell, 2005 #2546;Adell, 2005 #2546;Al-Harbi, 2012 #2493}.

Tradicionalmente la investigación en la neurobiología de la depresión se ha centrado en los sistemas cerebrales de monoaminas, sin embargo, distintas evidencias {Ruhe, 2007 #2495} sugieren que las anomalías asociadas a la depresión van más allá de la neurotransmisión monoaminérgica. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos y mejores fármacos ADs dependerá del descubrimiento de nuevas dianas celulares. En este sentido, a finales de los 90 surge con fuerza una nueva hipótesis que trata de explicar la depresión en base a mecanismos moleculares de plasticidad neuronal {Duman, 1997 #2494;Czeh, 2001 #2496;Malberg, 2000 #2497;Malberg, 2003 #2498;Sahay, 2007 #2499}. La heterogeneidad de la depresión puede indicar que el origen de esta enfermedad puede deberse a la disfunción de múltiples regiones cerebrales. Algunos datos parecen indicar que la neurogénesis hipocampal puede no ser el principal factor para el desarrollo de la depresión, pero puede ser importante para los efectos sobre el comportamiento de los fármacos ADs {Sahay, 2007 #2499;Sahay, 2007 #2499}.

Aunque las causas de la depresión no están totalmente aclaradas y, pese a que la depresión no se considera una enfermedad genética, no deben olvidarse la implicación de factores genéticos en la misma. Entre el 40-50% del riesgo de depresión puede ser hereditario, el 50-60% del riesgo no genético no está totalmente identificado, pero factores como el stress, traumas en la infancia, infecciones víricas u otras, pueden jugar un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad {Berton, 2006 #2501;Nestler, 2002 #2500;Nestler, 2002 #2500;Berton, 2006 #2501}. El estrés merece una atención especial, ya que muchas veces se describe a la depresión como un desorden relacionado al estrés, y no son pocos los casos en los que los episodios depresivos ocurren en un contexto de algún modo estresante {Wise, 1990 #2742}. En relación a los factores genéticos, varios polimorfismos en genes del sistema serotoninérgico, como el transportador de serotonina, la MAO-A o la triptófano hidroxilasa o de factores neurotróficos como el BDNF, pueden incrementar la vulnerabilidad al stress {Caspi, 2003 #2743}. Sin embargo no todos los estudios han encontrado una interacción entre los genes y el ambiente, aunque sí parece claro que la combinación de ambos factores predice mejor el riesgo de sufrir una depresión que ambos factores por separado.

La mayoría de los fármacos ADs utilizados actualmente en la clínica están basados en la inhibición, selectiva o no, de la recaptación de monoaminas, que elevan los niveles de monoaminas

en la sinapsis, pero pese a que el incremento de los niveles de monoaminas producido por estos fármacos es inmediato, su eficacia clínica se retrasa varias semanas. Este retraso en la eficacia antidepressiva junto a sus efectos secundarios y la existencia de un 30-40% de pacientes resistentes a los ADs actuales justifican la necesidad de desarrollar nuevos ADs más rápidos, seguros y eficaces.

## 1. Neurogénesis en el cerebro adulto

### 1.1. Origen de la neurogénesis en el cerebro adulto

A principios del siglo XX, Santiago Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1904), postulaba que el sistema nervioso central era incapaz de regenerarse en la vida postnatal. En aquella época, estas afirmaciones estaban basadas en los métodos de análisis histológico de tejidos (técnicas de tinciones argénticas o de anilinas como el Nissl). La mayor parte de los investigadores de principio de siglo pasado, describían las neuronas como células con arborizaciones dendríticas, que en el análisis de su morfología evidenciaban alteraciones en su tamaño o en su morfología, por lo que se las consideraban como células indiferenciadas o, directamente como artefactos de la preparación histológica.

Los primeros datos sobre neurogénesis en mamíferos adultos proceden de investigaciones en roedores, y posteriormente en el hombre, que demostraron la existencia de dos zonas diferenciadas donde las células se dividían y producían neuronas {Altman, 1962 #2744}. Esta idea no fue aceptada hasta los 90s, reconociéndose la existencia, en el cerebro postnatal de mamíferos, de células con capacidad de originar diferentes estirpes de células nerviosas {Reynolds, 1992 #2745; Doetsch, 2002 #2746}.

Podemos definir la neurogénesis adulta como un proceso de generación de neuronas funcionales a partir de las células progenitoras, el proceso incluye la proliferación celular, la diferenciación específica de los progenitores neuronales, la maduración e integración funcional de las neuronas en sus circuitos o la reposición de neuronas disfuncionales {Ming, 2005 #2747}.

Durante la evolución, la tasa de neurogénesis en el cerebro adulto ha disminuido, mientras que se ha incrementado la complejidad cerebral. Así, los vertebrados inferiores pueden regenerar tejidos y/o regiones enteras del cerebro, mientras que en los vertebrados superiores, esta regeneración está confinada a pocas zonas cerebrales {Kempermann, 2002 #2548}. La neurogénesis adulta ha sido descrita en diferentes vertebrados, como peces {Zupanc, 1995 #2749}, reptiles {Lopez-Garcia, 1988 #2750; Perez-Canellas, 1996 #2751}, aves {Barnea, 1994 #2752; Alvarez-Buylla, 1998 #2753}, roedores {Altman, 1965 #2754}, primates {Gould, 1997 #3046; Pencea, 2001 #3068; Mirescu, 2004 #3070; Kempermann, 2004 #2748} y en humanos {Eriksson, 1998 #3094}.

### 1.2. Zonas neurogénicas en el cerebro adulto

Las regiones a las que llamamos nichos neurogénicos o nichos neurales dentro del cerebro presentan dos características diferenciales, en primer lugar, la presencia de células precursoras inmaduras que pueden desarrollar nuevas neuronas; y en segundo lugar, un microambiente que sea permisivo para que el proceso de neurogénesis tenga lugar. Hasta el momento, en el cerebro de los mamíferos adultos se han descrito principalmente dos zonas responsables de la neurogénesis que son: los bulbos olfatorios y el hipocampo (Figura 1). No siempre existe correlación topográfica entre la existencia de células madre y la aparición de nuevas neuronas. Así, mientras en el hipocampo las células madre y las nuevas neuronas coexisten, en el bulbo olfatorio, las nuevas neuronas proceden de la zona que rodea los ventrículos laterales, denominada zona subventricular (SVZ) {Lois, 1994 #3144}, concretamente en la pared lateral del ventrículo. Desde esta región, las nuevas células tienen que migrar hasta alcanzar el bulbo olfatorio, constituyendo el camino migratorio rostral y una vez situadas en el bulbo olfatorio se diferencian a neuronas. Actualmente, también sabemos que existe una migración celular hacia el cuerpo calloso, donde preferentemente se diferencian a oligodendrocitos {Menn, 2006 #3145}.

En el hipocampo, las neuronas nuevas derivan de las células madre que se localizan en la zona subgranular (ZSG). El proceso de proliferación que da lugar a nuevas neuronas suele durar un mes, aunque la maduración total de las neuronas puede durar varios meses {Vivar, 2013 #3146}. Los

cambios morfológicos fisiológicos y moleculares de las células que participan en el proceso han permitido identificar distintos tipos de células (Figura 2. Diagrama de la cascada de diferenciación neuronal de las células recién nacidas ubicadas en el giro dentado del hipocampo adulto). Las células pluripotenciales o células madre (tipo I, o quiescentes o rNSCs de radial neural stem cells) representan la fuente de precursores neuronales, presentan características de la glía radial con una única prolongación apical y expresan la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP, brain lipid-binding protein), así como marcadores de células neuroepiteliales no diferenciadas como la nestina y Sox2. Esta población celular se caracteriza por tener una baja tasa de división celular (quiescentes). El equilibrio entre el estado quiescente y la entrada en el ciclo celular es un proceso crítico que determina la tasa de neurogénesis y parece estar regulado por factores como Notch, las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs Bone morphogenetic proteins) y el GABA. Recientemente se ha identificado una nueva población de células tipo 1 caracterizadas por una única prolongación horizontal diferenciándose las células tipo 1 radiales y horizontales. Las células tipo 1 horizontales presentan una tasa de división más alta. Una vez que las rNSCs o células tipo 1 se dividen de forma asimétrica, dan lugar a una población celular que se amplifica rápidamente, las células tipo 2, o ANPs de amplifying neural progenitors, formando acúmulos o clústeres a lo largo de la región subgranular. Este proceso está regulado por factores locales del nicho como el FGF2, SH (sonic hedgehog) VEGF (vascular endothelial growth factor) o wnt7a. Estas células no expresan ya GFAP pero mantiene una baja expresión de BLBP y nestina. Las células tipo 2 o ANPs son células pequeñas que presentan procesos neuríticos cortos paralelos a la zona granular del giro dentado. Estas células pueden dar lugar tanto a neuronas como a astrocitos. En base a su morfología y expresión de marcadores, se han identificado al menos dos tipos de células ANPs, las células progenitoras tipo 2a y 2b, las células tipo 2a expresan nestina y doblecortina. Las células ANPs son por tanto las responsables de la mayor parte de la proliferación observada en el hipocampo, por lo que es razonable pensar que cualquier factor que module la tasa de proliferación celular en el hipocampo actúe modulando la tasa de división de estos precursores neuronales.

Las ANPs se dividen 2-3 veces antes de salir del ciclo celular y diferenciarse a células progenitoras que van adquiriendo características de neurona denominadas neuroblastos (células tipo 3 o NBs). Las células de tipo 3 presentan procesos largos integrados en la capa granular, son GFAP y nestina negativas pero expresan el marcador de neuronas inmaduras doblecortina y polysialic acid neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM). En el paso de neuronas inmaduras a neuronas maduras, las células tipo 2 pierden la expresión de doblecortina y comienzan a expresar la proteína nuclear neuronal específica, NeuN. Estas neuronas inmaduras se caracterizan por procesos dendríticos largos que cruzan la capa granular del giro dentado. En el estadio final, las nuevas neuronas expresan marcadores específicos, como la proteína de unión a calcio llamada calbindina, así como propiedades electrofisiológicas similares a las neuronas viejas {Vivar, 2013 #3146; Encinas, 2006 #2544; Lucassen, 2010 #2543}.

### **1.3. Regulación de la neurogénesis en el cerebro adulto**

El estudio de los mecanismos moleculares que controlan la neurogénesis adulta ha sido el foco de estudios recientes (Tabla 1). Las células precursoras neuronales dan lugar a subtipos neuronales distintos y a células gliales mediante la activación secuencial de factores de transcripción. En contraste con el desarrollo embrionario, en el cerebro adulto la renovación y diferenciación a neuronas y glía más que un proceso constante es un proceso a demanda.

La neurogénesis en el cerebro adulto es un proceso dinámico y variable, que involucra diversas etapas como la proliferación de las células pluripotenciales, la migración, la diferenciación, la supervivencia de las neuronas nuevas y su integración en los circuitos neuronales existentes {Vivar, 2013 #3146}. Este proceso es altamente dependiente de los cambios del entorno neuroquímico y ambiental {Peterson, 2002 #3148}

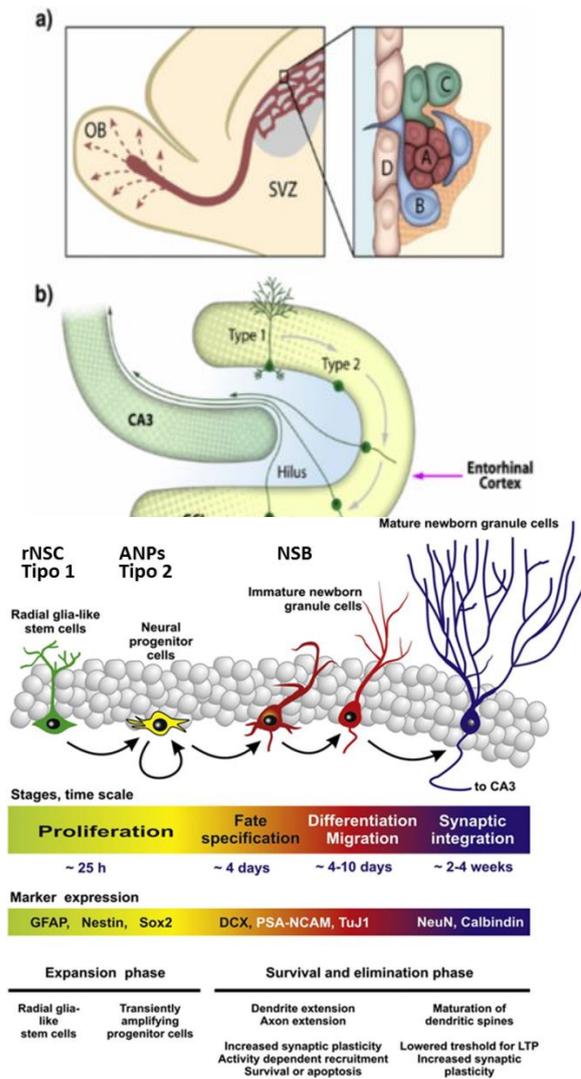


Figura 1.- Regiones del cerebro adulto de mamíferos donde se produce neurogénesis

(a) Células progenitoras (A–C) en la zona subventricular anterior (SVZ) junto a las células endimarias (D) capa que recubre los ventrículos laterales y que interactúa con la lámina basal que se extiende desde la vasculatura. Las células progenitoras de la SVZ se diferencian y migran a través de la corriente migratoria rostral antes de alcanzar el bulbo (OB) y se integran como neuronas granulares en la capa granular y como neuronas periglomerulares (no mostrado). (b) Células progenitoras en la zona subgranular (SGZ) de Tipo 1 y Tipo 2, proliferan y pasan por varias etapas de cambios morfológicos y fisiológicos, Figura 2. Diagrama de la cascada de diferenciación neuronal de las células recién nacidas en nacidas ubicadas en el giro dentado del hipocampo adulto.

**Abreviaturas utilizadas:**

- GFAP: proteína ácida glial fibrilar;
  - Sox2: region determinante del sexo Y (SRY) - BOX 2;
  - DCX: doblecortina;
  - PSA-NCAM: Forma polisializada la molécula de adhesión celular neural;
  - TuJ1:β-tubulina III;
  - NeuN: antígeno nuclear neuronal.
- Imagen extraída de {Lucassen, 2010 #2543}.

. El proceso está modulado por factores extrínsecos (entrenamiento motor, cognitivo, cambios ambientales, estímulos fisiológicos, patológicos o farmacológicos) e intrínsecos (factores neurotróficos, citocinas y neurotransmisores, hormonas, cascadas moleculares que involucran factores de transcripción y vías de señalización o microRNAs). Los factores ambientales, como el ambiente enriquecido, el aprendizaje instrumental y el ejercicio físico, los esteroides ováricos y los estrógenos endógenos estimulan la neurogénesis, {van Praag, 1999 #3149; Banasr, 2001 #3150; Mirescu, 2004 #3070; Tanapat, 2005 #3151}. Por el contrario el estrés, la separación maternal, la exposición a glucocorticoides o algunas enfermedades psiquiátricas la inhiben {Gould, 1997 #3046; Tanapat, 2001 #3152}. A pesar de no conocerse totalmente los mecanismos biomoleculares que controlan la neurogénesis en el cerebro adulto, se empiezan a conocer los distintos mediadores involucrados. El nicho es uno de los factores que intervienen en la regulación de la neurogénesis. Está constituido por las células pluripotenciales, los astrocitos y las células endoteliales. Los tres componentes del nicho trabajan en sincronía para mantener la población de células pluripotenciales; los astrocitos modulan la proliferación de las células pluripotenciales y de las células que amplifican rápidamente, así como la migración de estas células a través de la acción de diversos factores secretados por los astrocitos, para mantener la población de astrocitos y de células endoteliales {Jordan, 2007 #3384}.

Tabla 1: Regulación de las distintas etapas de la neurogénesis en el adulto

MEDIADOR	RECEPTOR	EFECTO SOBRE					AREA ANATOMICA			REFERENCIA
		PROL	DIFE	MIGR	MADR	INTEGRACION SINAPTICA	Nicho	ZSV	GDH	
<b>Neurotransmisores</b>										
GABA	GABAAR, $\alpha 2$ , $\alpha 4$ , $\gamma 2$	+	+	+	+	+	+	+		Liu et al 2005, Duveau et al 2011, Pallotto 2012
Glutamato	NMDA, AMPA, KAINATO, mGlu I, II y III	+		+				+		Di Giorgi-Geverini et al 2005, Castiglione M et al 2008, Platel JC et al 2010
Sustancia P	NK-1	+						+	+	Park SW et al 2007
Serotonina	5-HT1A	+						+	+	Jacobs B et al 1998, Brezun JM et al 1999, Brezun JM et al 2000
Dopamina	D2-like	+		+	+			+		Borta A and Hoglinger G 2007
Prolactina	PRLR	+						+	+	Torner L et al 2009
GH	HCR								+	Garcia Garcia F et al 2011
<b>Factores de transcripcion</b>										
Pax6		+	+						+	Osumi N et al 2008
Six3		+	+						+	Lavado A, Oliver G 2011
Cux-2,								+	+	Iulianella et al 2008
<b>Genes</b>										
meis-1		+							+	Bessa J et al 2008
c-myb		+							+	Mantamadiotis T, et al 2004
<b>Factores de crecimiento</b>										
EGF	EGFR								+	Kuhn HG et al 2006
FGF-2	FGFR2	+			+				+	Jin K et al 2005
BDNF	TrkB, LNGFR			+					+	Paul, J. et al 2001
Neurotrofina 3	TrkC, TrkB			+					+	Schimazu K et al 2006
<b>Sistemas de señalización celular</b>										
Shh	Patched-1	+							+	Hui-Chi Hung et al 2014
Wnt	Frizzled, LRP-5/6, ROR1/2	+							+	Li et al 2005, Maretto et al 2003
Acido retinoico	RAR			+				+	+	Yu S et al 2012
BMP	BMPRII				+				+	Bond AM et al 2014
Nogina								+	+	Tang J 2009
Neurogenesina-1								+	+	Ueki T et al 2003
Sinapsina III		+							+	Kao HT et al 2008
<b>mitogeno</b>										
MAPK				+					+	Dengke K Ma et al 2009
ERK				+					+	Shioda N et al 2009
JNK/SAPK				+					+	Hiroshi Nishina et al 2004
p38				+					+	Miloso M et al 2008+K3.R34
ERK5			+	+					+	Pan, Yung-Wei 2013

mGlu: receptores metabotrópicos de los grupos; GH: Hormona de crecimiento; EGF: Factor de crecimiento epidérmico; FGF-2: Factor 2 de crecimiento fibroblástico; Sonic hedgehog (Shh); Proteína morfogénica de hueso (BMP); PROL: Proliferación; DIFE: Diferenciación, MIGR: Migración; MADR: Maduración.

## 2.- Las teorías neuroproliferativa/neuroplástica como base biológica de la depresión

Las neuronas recién generadas migran a la capa de células granulares adyacentes donde maduran hasta convertirse en neuronas funcionales que participa en funciones importantes, tales como el aprendizaje y la memoria. {Deng, 2010 #3153}. La capacidad de los ADs para aumentar neurogénesis y bloquear los efectos del estrés proporciona una prueba convincente de que la neurogénesis podría ser un factor clave en la etiología y el tratamiento de la depresión y los trastornos de ansiedad. Sin embargo, distintas conclusiones sugieren que una reducción en la proliferación celular por sí misma no contribuye a la aparición de un comportamiento depresivo {Malberg, 2003 #2498; Vollmayr, 2003 #3154}. Se ha intentado establecer una relación más directa entre trastornos depresivos relacionados con ansiedad y neurogénesis {Santarelli, 2003 #2505; Jayatissa, 2009 #3155; Bergami, 2008 #3156; Revest, 2009 #3157}.

En los últimos años se han propuesto como base biológica de los trastornos del estado de ánimo como la depresión, la existencia de alteraciones morfológicas cerebrales -neuroplásticas-. El estrés disminuye la neurogénesis del hipocampo y la plasticidad sináptica en PFCx (PFCX) {Duman, 1999 #2508; Czeh, 2001 #2496; Malberg, 2003 #2498}. Los ADs más conocidos estimulan la proliferación de células progenitoras del hipocampo, que constituye la primera etapa de la neurogénesis en el hipocampo adulto {Sahay, 2007 #2499}. Sin embargo, la contribución de la neurogénesis del hipocampo a la patogénesis de la depresión está muy lejos de estar totalmente aclarada. El análisis morfológico del hipocampo en pacientes deprimidos revela una pérdida de volumen sobre todo de la materia gris. Pero mientras algunos estudios sugieren que la disminución de la neurogénesis adulta podría ser responsable de los cambios estructurales del hipocampo, otros

estudios postulan que la reducción del volumen hipocampal estaría más relacionada con cambios en el número de células gliales, y/o con la arborización dendrítica en esta zona, y no necesariamente a una disminución de la proliferación celular {Sahay, 2007 #2499}.

### ***2.1. Implicación de la proliferación neuronal y la plasticidad en los trastornos afectivos***

Se ha propuesto que el déficit de células progenitoras en el giro dentado del hipocampo puede estar implicado en la etiología de distintas enfermedades psiquiátricas como los trastornos de ánimo {Duman, 1997 #2494; Jacobs, 2000 #2547; Kempermann, 2002 #2548}, el trastorno bipolar {Schloesser, 2007 #2549}, o la esquizofrenia {Reif, 2006 #2550}. Aunque existen claras evidencias de que distintas intervenciones terapéuticas en estas enfermedades mejoran la neurogénesis, se sabe poco acerca de los factores implicados en el deterioro de la proliferación en estas enfermedades psiquiátricas.

En animales, la proliferación celular en el giro dentado disminuye por el estrés {Duman, 1997 #2494; Duman, 1999 #2508; Czeh, 2001 #2496; Malberg, 2003 #2498; Warner-Schmidt, 2006 #2510}, y en varios modelos animales de la depresión como el estrés imprevisible, la administración crónica de corticosterona, la bulbectomía olfatoria, o la deprivación materna {Warner-Schmidt, 2006 #2510; Lee, 2001 #2511; Heine, 2004 #2512; Jaako-Movits, 2006 #2513; Xu, 2012 #2514}. Una disminución de la proliferación celular en el hipocampo se ha observado también en ratones diabéticos, que presentan una alta incidencia de depresión que revierte con el tratamiento crónico con fármacos ADs {Beauquis, 2006 #2517}. Esta pérdida en la proliferación celular se correlaciona con una disminución de volumen del hipocampo {Sheline, 1996 #2515; Czeh, 2001 #2496}.

Aunque todos estos cambios han sido ampliamente estudiados, la depresión mayor no se considera generalmente como "trastorno del hipocampo", por tanto es poco probable que la alteración de la neurogénesis del hipocampo adulto por sí sola, puede explicar plenamente la neurobiología de la depresión mayor. Algunos estudios han abordado la implicación de la proliferación celular en otras estructuras anatómicas relevantes para los trastornos depresivos, como PFCx y la amígdala. En PFCx, se ha observado una reducción en la proliferación celular {Czeh, 2007 #2518}, con una regulación a la baja de los genes implicados en la proliferación celular {Tochigi, 2008 #2519; Tordera, 2011 #2520}, una disminución del crecimiento y la supervivencia celular y una inhibición de la apoptosis {Tordera, 2011 #2520}. La administración crónica de fármacos ADs, incrementa también la proliferación celular en PFCx {Czeh, 2007 #2518; Kodama, 2004 #2521}, aunque el destino de las nuevas células va más a la formación de la glía que de neuronas, en contraste con lo descrito en el hipocampo {Czeh, 2007 #2518}.

Hay que destacar que en la depresión mayor, el volumen de la corteza frontal y del hipocampo están reducidos y existe una hipofuncionalidad de estas estructuras, otras estructuras cerebrales como la amígdala presente hipertrofia, hiperactividad e incremento de la plasticidad sináptica {Pittenger, 2008 #2552; Popoli, 2012 #2532}. En la amígdala se ha observado un aumento en la longitud de las dendritas en modelos animales de estrés {Blugeot, 2011 #2522}. No se dispone de datos acerca de los efectos ADs sobre la proliferación celular de la amígdala; sin embargo, la lesión del complejo basolateral de la amígdala (BLA) incrementa la supervivencia celular en el hipocampo, similar a lo observado tras tratamiento crónico con ADs {Castro, 2010 #2523}.

Además de la proliferación neuronal, cambios en la plasticidad sináptica, que también son modulados por el tratamiento con fármacos ADs {Thome, 2000 #2524; Chen, 2001 #3159}, pueden estar involucrados en la depresión {Duman, 1997 #2494}. En PFCx, el estrés reduce el número y la longitud de las espinas {Penzes, 2011 #2526}, así como el número, y función de las células gliales, con cambios en la transmisión glutamatérgica {Ongur, 1998 #2527; Bowley, 2002 #3161; Rajkowska, 1999 #2530} que reduce la plasticidad sináptica en las conexiones Hp-PFCx {Cerqueira, 2007 #2533}. Se ha descrito que los cambios en la plasticidad sináptica incrementan la vulnerabilidad a sufrir un episodio de depresión {Blugeot, 2011 #2522}. El incremento en la apoptosis también se ha relacionado con un mayor riesgo de sufrir depresión mayor, en este sentido se ha observado un incremento de la muerte celular en áreas como giro dentado (DG), el CA1 y el CA4 del hipocampo, la corteza entorrinal, y subiculum en muestras el cerebro humano postmortem de sujetos con depresión. Los estudios en animales también indican que el estrés

agudo aumenta de la apoptosis del hipocampo {Heine, 2004 #2512} y la corteza {Bachis, 2008 #2534;Kosten, 2008 #2535}. Finalmente el tratamiento antidepresivo disminuye la muerte celular en modelos animales de estrés, bien por incrementar la expresión de factores tróficos (BDNF y su receptor TrkB) que resulta en aumento de la supervivencia celular {Nibuya, 1995 #2536} o por reducir directamente la apoptosis {Lucassen, 2004 #2537}.

El incremento de la proliferación celular en el hipocampo como consecuencia del tratamiento antidepresivo crónico se ha demostrado necesario para algunos, pero no todos los efectos de tipo antidepresivo en animales {Santarelli, 2003 #2505;Malberg, 2005 #2553;Dranovsky, 2006 #2554}. El efecto antidepresivo se ha relacionado también con el aumento de las arborizaciones dendríticas {Wang, 2008 #2555}, la maduración o la integración funcional de las nuevas neuronas {Wang, 2008 #2555}. Sin embargo, algunos fármacos con acción antidepresiva no median su efecto a través de la neurogénesis, ya que la eliminación completa de la proliferación del hipocampo por irradiación directa no bloquea la respuesta antidepresiva de los antagonistas de CRF o de arginina vasopresina 1b (V1b) {Surget, 2008 #2556}.

### 3. Fármacos ADs y neurogénesis

Uno de los primeros datos que vincularon la neurogénesis y la depresión fue el hallazgo de que la mayoría de las intervenciones (farmacológicas o no) con eficacia antidepresiva estimulan la neurogénesis en el hipocampo (Tabla 2). Entre los tratamientos farmacológicos, la administración crónica pero no aguda de ADs que incrementan los niveles cerebrales de 5HT como los tricíclicos, los IMAO, los inhibidores selectivos y no selectivos de la recaptación de 5HT, así como los agonistas de receptores 5HT<sub>4</sub>, incrementan la proliferación de células precursoras del hipocampo. {Czeh, 2001 #2496;Santarelli, 2003 #2505;Madsen, 2000 #2503}. Otras intervenciones no farmacológicas utilizadas en el tratamiento de la depresión como la terapia electroconvulsiva {Malberg, 2000 #2497;Scott, 2000 #3387;Hellsten, 2004 #3164}, el silenciamiento génico del transportador de serotonina en el núcleo dorsal del rafe {Ferres-Coy, 2013 #2540}, el enriquecimiento ambiental {Kempermann, 1997 #3390;Nilsson, 1999 #3391} o el ejercicio {van Praag, 1999 #3149;Yau, 2011 #3392}, también incrementa la proliferación celular en el hipocampo. El curso temporal de la maduración de las nuevas neuronas es consistente con el retraso en la aparición de la acción terapéutica de los ADs {Malberg, 2000 #2497;Datson, 2008 #3165;Meshi, 2006 #3166}. Finalmente, el incremento de la proliferación celular inducido por la administración de ADs, se observa fundamentalmente en la región subgranular del hipocampo y no tanto en la región subventricular, lo que sugiere una acción específica de los ADs sobre la neurogénesis hipocampal.

Los ADs influyen por lo menos en dos aspectos importantes de la neurogénesis en el adulto: la proliferación y la supervivencia de neuronas nuevas {Nakagawa, 2002 #3167}. Se ha demostrado también que los ADs incrementan el índice de maduración neuronal, determinado por el número y longitud de las dendritas de nuevas neuronas {Nakagawa, 2002 #3167;Fujioka, 2004 #3168}. Finalmente, diferentes estrategias antidepresivas actúan sobre distintas poblaciones de células progenitoras, así, la administración crónica de SSRI como la fluoxetina {Encinas, 2006 #2544} o los agonistas de receptores 5-HT<sub>4</sub> como el RS 67333 {Pascual-Brazo, 2012 #2462} modulan la neurogénesis incrementando la división de las amplifying neural progenitors (ANPs). Por el contrario, el ECS produciría un efecto antidepresivo más rápido por modular tanto las ANPs como las quiescent neural progenitors (QNP) {Segi-Nishida, 2008 #3234}. También se ha sugerido que el efecto antidepresivo precoz del ECS frente a los ADs clásicos dependería de la modulación de VEGF {Fournier, 2012 #3404}.

Finalmente se ha sugerido que las acciones de los ADs ocurren a través de diferentes mecanismos, que pueden involucrar o no alteraciones a nivel de la neurogénesis. Algunos estudios han demostrado que la ablación de la proliferación celular en el hipocampo mediante irradiación, no induce un fenotipo depresivo en animales {Tordera, 2011 #2520;Diamond, 2004 #3405}, algunos estudios además no encontraron una correlación entre la disminución de la proliferación celular y los efectos a nivel conductual causados por los ADs {Santarelli, 2003 #2505;Bessa, 2009 #3169;Kempermann, 2006 #3170}.

La neurogénesis hipocampal adulta ha sido blanco de atención como posible tratamiento de la depresión mayor. Aunque, quedan varias cuestiones por resolver. En primer lugar, no está claro por qué la neurogénesis es importante en la mediación de la respuesta antidepresiva, siendo que, una

disminución de la neurogénesis en sí misma no produce un fenotipo depresivo. En segundo lugar, tampoco se sabe si el incremento directo de la neurogénesis es suficiente para conferir efecto antidepressivo. Es importante destacar que la acción neurogénica de los ADs es sólo un aspecto dentro de innumerables efectos celulares y moleculares que acompañan a su utilización.

Tabla 2: Representación de estudios en roedores sobre el efecto de la depresión, los ADs y otros tratamientos, durante las diferentes fases de la neurogénesis hipocampal adulta,

Stages of Neurogenesis	In Vivo Assessment						In Vitro Assessment	
	Type-1 Stem-Like Cells	Type-2 Amplifying Progenitors	Type-3 Dividing Neuroblasts	Post-mitotic Neuroblasts	Immature Neurons	Mature Neurons	Proliferation	Differentiation
								
				Maturation		Survival		
- Major Depressive Disorder - Post-Traumatic Stress Disorder (rodent models include chronic unpredictable stress, social defeat, social isolation)		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↔
+ Treatment: (multiple classes of antidepressant drugs including fluoxetine, imipramine)		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
(behavioral manipulations like exercise)	↑↔	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

Modificado de (Lucassen, Meerlo et al. 2010)

El énfasis de la investigación actual sobre los efectos de la proliferación celular en la acción antidepressiva nos ha dejado indicios del posible papel de las neuronas inmaduras en los cambios conductuales y cognitivos asociados a la depresión. Debido a que las nuevas neuronas requieren aproximadamente 1 a 1,5 meses para madurar completamente, esto podría contribuir a la aparición tardía de eficacia terapéutica del tratamiento antidepressivo. Las nuevas neuronas maduran y se integran en el giro dentado del hipocampo, exhibiendo propiedades funcionales únicas (por ejemplo, excitabilidad aumentada y umbral más bajo para la inducción de LTP) que permitan hacer contribuciones clave con respecto a la funcionalidad en la red neuronal y plasticidad sináptica {Ge, 2008 #3171}. Se han registrado hallazgos de que la velocidad de la maduración y la integración puede ser modulada por una variedad de factores, tales como la experiencia {Tashiro, 2007 #3172}. Wang et al demostraron recientemente que el tratamiento crónico con fluoxetina acelera la maduración funcional y estructural en neuronas inmaduras, que coincide con la mayor inducción de LTP en el giro dentado {Wang, 2008 #2555}. De este modo sería posible acelerar la maduración de las neuronas nuevas mediante el tratamiento antidepressivo pudiendo de este modo reestablecer la funcionalidad de la red neuronal y ayudar a incrementar el proceso de información en el hipocampo de pacientes con depresión mayor. De hecho, los pacientes con depresión presentan dificultades en diversas áreas relacionadas al aprendizaje y la función de memoria que se invierten por medio del tratamiento antidepressivo {Bremner, 2004 #3185;Bremner, 2004 #3184;Campbell, 2004 #3192;Vythilingam, 2004 #3202}.

## 4. Vías de señalización implicadas en la proliferación y la plasticidad neuronal moduladas por ADs

Se ha avanzado en el descubrimiento de señales moleculares que regulan la división de células progenitoras neuronales en el hipocampo adulto que podrían servir como posibles candidatas para el tratamiento de la depresión. Los tratamientos ADs clásicos pueden revertir, al menos parcialmente, la mayoría de los cambios en proliferación y neuroplasticidad inducidos por estrés {Sheline, 2003 #3411}. Estos fármacos modulan varias vías intracelulares implicadas en la neuroplasticidad y la proliferación celular: incluyendo sistemas de neurotransmisores, cAMP / CREB, factores neurotróficos, como BDNF {Banasr, 2008 #3417}, VEGF {Palmer, 2000 #3226}, y otras proteínas como la  $\beta$ -catenina {Malberg, 2000 #2497; Madsen, 2003 #3430; Mostany, 2008 #2461} o el blanco para la rapamicina en mamíferos (mTOR) {Li, 2010 #3447}.

Clásicamente, la modulación de diferentes sistemas de neurotransmisores se ha implicado en la mediación de los efectos ADs, y, algunos de ellos, se han relacionado con cambios proliferativos o de tipo plástico (Cassano P. 2010). Los sistemas de neurotransmisores tradicionalmente implicados incluyen el serotoninérgico, adrenérgico, y los dopaminérgicos, mientras que otros, como el glutamatérgico, sistemas de cannabinoides y el factor de liberación de corticotropina (CRF) implicado en la secreción de ACTH están adquiriendo una importancia creciente en los últimos años. Aquí nos centraremos en los receptores serotoninérgicos más relevantes para la modulación de la proliferación neuronal y los procesos de plasticidad sináptica.

### 4.1. Receptores de serotonina.

Se ha sugerido que el aumento en los niveles de serotonina media el aumento en la proliferación celular, por el contrario, la depleción de este neurotransmisor no modifica la división de las células del hipocampo {Ueda, 2005 #3203}. En línea con esto, la administración crónica pero no aguda de ADs que incrementan los niveles cerebrales de serotonina incrementan la proliferación celular del hipocampo (revisado en {Pilar-Cuellar, 2013 #2539}. Otros mecanismos no farmacológicos de incrementar el contenido cerebral de serotonina en las neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal, como el silenciamiento del transportador de serotonina con RNAi también aumenta la proliferación del hipocampo {Ferres-Coy, 2013 #2540}.

Varios receptores de serotonina han sido implicados en el aumento de la proliferación celular en el hipocampo inducido por ADs, junto con el crecimiento de neuritas y la supervivencia en células que expresan estos receptores {Li, 2005 #3477}.

La lesión parcial de los núcleos dorsal y medial del rafe, resulta en una disminución de las neuronas serotoninérgicas que inervan el giro dentado del hipocampo y otras áreas de proyección como corteza y amígdala, disminuyendo la proliferación en la zona subgranular del giro dentado {Kaidanovich-Beilin, 2004 #3485}. Sin embargo, otros autores no encuentran cambios en la proliferación y/o en los niveles de factores neurotróficos de expresión tras el tratamiento crónico con fluoxetina, cuestionando la importancia del sistema serotoninérgico en la proliferación del hipocampo {Gould, 2004 #3486; Latapy, 2012 #3487; Klein, 1996 #3491}.

#### 4.1.1. Receptores 5-HT<sub>1A</sub>

La administración aguda {Peifer, 1993 #3656}, o crónica del agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT {Blugeot, 2011 #2522; Kim, 2009 #3469; Li, 2005 #3477} aumenta la proliferación en la zona subgranular (SGZ) del hipocampo que depende de los receptores postsinápticos 5-HT<sub>1A</sub>. En estudios que utilizaron células progenitoras neuronales del hipocampo, el incremento de serotonina que media en la proliferación está bloqueado por el antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, el WAY100,635 {Polakis, 2012 #3468}. Por el contrario, la administración aguda de antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> produce una disminución de la proliferación del hipocampo {Wada, 2005 #3504}, no observándose cambios después de 14 días de tratamiento {Kim, 2009 #3469}.

Tabla 3: y compuestos con efecto antidepresivo, vías de señalización efecto sobre la proliferación celular en hipocampo o neurogénesis y eficacia.

Tratamiento	Vía	Efecto en	Eficacia		Referencias
	señalización/ NT	proliferación o neurogénesis	animales	clínica	
Fluoxetina (SSRI)	5-HT	↑ supervivencia	Si	Si	Malberg JE et al. 2000
Reboxetina (SNRI)	NA	↑	Si	Si	Malberg JE et al. 2001
Venlafaxina (SRNI)	NA	↑	Si	Si	Wood GE et al. 2004
Tranilcipromina (MAOI)	5-HT	↑	Si	Si	Malberg JE et al. 2000
Imipramina (tricíclico)	5-HT, NA	↑	Si	Si	Lee, J. et al. 2002
Desipramina (tricíclico)	5-HT, NA	↑	Si	Si	Malberg JE et al. 2000
Rolipram (PDE4 inhibidor)	cAMP-CREB	↑ supervivencia	Si	?	Vermetten, E. et al. 2003
Tianeptina	5-HT	↑	Si	?	Czeh, B. et al. 2001
Antagonista NK1	NK1	↑	Si	?	Santarelli, L. et al. 2003
Vasopresina V3	Vasopresina	↑	Si	?	Silasi, G. et al. 2004
ECT	cAMP-CREB	↑	Si	Si	Malberg JE et al. 2000
IGF-1	Ras-MAPK	↑ diferenciación	Si	?	Khawaja, X. et al. 2004
BDNF	cAMP-CREB	↑	Si	?	Pencea, V. et al. 2001
Litio	ERK	↑	No	No	Silasi, G. et al. 2004
Valproato	ERK	↑	No	No	Silasi, G. et al. 2005
8-OH DPAT	Gi/o-PKA, ERK	↑	Si	?	Khawaja, X. et al. 2004
WAY100635	Gi/o-PKA, ERK	↓ / ≈	No	?	Rupniak, N.M. 2002
Sumatriptan	Gi/o-PKA, ERK	≈	No	?	Alonso R. et al. 2004
GR127935	Gi/o-PKA, ERK	≈	No	No	Alonso R. et al. 2004
DOI	Gq-PKC	↑	No	No	Alonso R. et al. 2004
Ketanserina	Gq-PKC	↓	No	No	Alonso R. et al. 2004
RO600175	Gq-PKC	≈	Si	?	Alonso R. et al. 2004

Modificado de (Malberg, Bleny et al. 2005). NT: Neurotransmisor; ↑: incremento; ↓: descenso; ≈: sin cambios; NK1 receptor de taquiquinina

. Animales *Knock Out* para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> no presentan cambios en la proliferación basal en comparación con animales de tipo salvaje {Czeh, 2007 #2516;Tordera, 2011 #2520}, pero presentan una disminución de la supervivencia de las células del hipocampo {Czeh, 2007 #2516}. El subtipo de receptor 5-HT<sub>1A</sub> se ha demostrado que es necesario para el efecto proliferativo en el hipocampo de algunos ADs como fluoxetina {Tordera, 2011 #2520}, mientras que otros ADs como la imipramina, actúan sobre otros sistemas de neurotransmisores, incrementando la proliferación hipocámpal de manera 5-HT<sub>1A</sub>-independiente {Tordera, 2011 #2520}.

#### 4.1.2. Receptores 5-HT<sub>2A/C</sub>

El papel de los receptores 5-HT<sub>2A/C</sub> en la regulación de la neurogénesis es menos claro. El tratamiento con antagonistas, incrementan la proliferación o la plasticidad sináptica en paralelo al efecto antidepresivo {Galceran, 2000 #3480;Hinck, 1994 #3508;Sadot, 1998 #3510}, mientras que la administración de agonistas 5-HT<sub>2A</sub> contrarresta el efecto de los ISRS {Hinck, 1994 #3508}. La administración crónica de antagonistas de receptores 5-HT<sub>2A</sub> como la ketanserina {Moon, 2002 #3478}, y 5-HT<sub>2C</sub> como SB243,213 y S32006 {Ciani, 2005 #3479}, producen un aumento de la proliferación celular en el hipocampo, mientras que el tratamiento agudo con agonistas 5-HT<sub>2A/C</sub> no producen cambios o disminuye la proliferación {Blugeot, 2011 #2522;Moon, 2002 #3478}. Curiosamente, el tratamiento subcrónico con ketanserina en combinación con fluoxetina aumenta una serie de marcadores de plasticidad sináptica como β-catenina y N-caderina presente en la fracción de membrana, junto con la expresión del gen de BDNF, sin embargo, la proliferación celular en el hipocampo no se modifica significativamente {Galceran, 2000 #3480}.

### 4.1.3. Receptores 5-HT<sub>4</sub>

En los últimos años, el subtipo de receptor 5-HT<sub>4</sub> ha demostrado tener un papel destacado en la patología depresiva. La densidad de este subtipo de receptor y la cascada de señalización a través del cAMP están alteradas en la corteza frontal y en el caudado-putamen en humanos con diagnóstico de depresión {Gottardi, 2004 #3512}. El tratamiento crónico con ADs clásicos producen una desensibilización de este subtipo de receptor en estructuras como el hipocampo {Frame, 2001 #3483;Aberle, 1997 #3484}. En los últimos años, se ha descrito una respuesta antidepresiva a corto plazo mediada por agonistas parciales del receptor 5-HT<sub>4</sub> sólo {Sheline, 2003 #3411;Dominguez-Escriba, 2006 #3475;Gasbarri, 1994 #3476}, o cuando se coadministra con los ADs clásicos {Yamaguchi, 2004 #3473}. El efecto antidepresivo del agonista de 5-HT<sub>4</sub> es paralelo al aumento en la proliferación en el hipocampo {Sheline, 2003 #3411;Dominguez-Escriba, 2006 #3475}, u otros marcadores de proliferación y plasticidad como la  $\beta$ -catenina, Akt {Sheline, 2003 #3411}, el BDNF {Sheline, 2003 #3411;Gasbarri, 1994 #3476} o el factor de transcripción CREB {Sheline, 2003 #3411;Yamaguchi, 2004 #3473;Gasbarri, 1994 #3476}. La proliferación celular en el hipocampo en cultivos primarios de hipocampo inducida por serotonina es bloqueada por el DAU 5-HT<sub>4</sub> 6285, un antagonista del receptor 5-HT<sub>4</sub> {Polakis, 2012 #3468}.

Tabla 4: Rol de la activación y bloqueo de los diferentes subtipos del receptor de serotonina en la proliferación neuronal y la plasticidad sináptica

Subtipo de Receptores	Agonista		Antagonista		ko	
	Proliferación	Referencia	Proliferación	Referencia	Proliferación	Referencia
5HT1A	↑ (subcrónico)	Arnold SA and Hagg T. 2012	↓ (agudo)	Pilar-Cuellar F et al.	=	Xia L et al. 2012. Santarelli L et al., 2003.
	↑ (crónico)	Banasr R et al. 2004 Huang GJ and Herbert J. 2005. Fricker AD et al. 2005.	= (crónico)	Huang GJ and Herbert J. 2005.		
			bloqueo de 5HT = proliferación	Pilar-Cuellar F et al.	↓ supervivencia	Xia L et al. 2012.
5HT2A/2C	=	Banasr R et al. 2004	↑ (crónico)	Jha S et al. 2008 Soumier A et al. 2009.		
			= (agudo)	Banasr R et al. 2004 Jha S et al. 2008		
			↑ marcadores de plasticidad y BDNF	Pilar-Cuellar F et al. 2012		
5HT4	↑ (subcrónico)	Pascual-Brazo J. et al. 2012			?	
	↑ marcadores de plasticidad y BDNF (subcrónico)	Pascual-Brazo J. et al. 2013 Lucas G. et al. 2007. Lucas G. et al. 2010.	El bloqueo de 5HT ↑	Pilar-Cuellar F et al.		
			=	Foley AG, et al. 2008.	?	
5HT6	?		↑ marcadores de plasticidad (PSA-	Foley AG, et al. 2008.	=	Sarkisyan G et al. 2009.
5HT7	?		↑ (subcrónico)	Mnie-Filali O et al. 2011.		

### 4.1.4. Receptores 5-HT<sub>6</sub>

El papel del receptor 5-HT<sub>6</sub> en la depresión no está claro, los ADs tricíclicos como la amitriptilina y los ADs atípicos como la mianserina tienen alta afinidad por este subtipo de receptor de serotonina, actuando como antagonistas {Brembeck, 2004 #3513}. Este subtipo de receptor postsináptico está presente en áreas del cerebro como la corteza y el hipocampo y está implicado en el aprendizaje y la memoria {Brembeck, 2004 #3513}. Los efectos mediados por este receptor son contradictorios, ya que ambos, agonistas r y antagonistas de este subtipo de receptor ejercen efectos ADs y ansiolíticos por si solos {Brembeck, 2004 #3513;Gottardi, 2004 #3534} o potencian el efecto de otros ADs {Shitashige, 2008 #3536}. Cuando se administran localmente en el hipocampo, los antagonistas de los receptores 5-HT<sub>6</sub> producen un efecto antidepresivo {Lie, 2005 #3549}. Sin embargo, este efecto no está mediado por un aumento de la neurogénesis pero si por un aumento de la molécula de adhesión celular neural (PSA-NCAM) que puede mediar cambios de plasticidad sináptica {Wexler, 2009 #3574}.

### 4.1.5. Receptores 5-HT<sub>7</sub>

El subtipo de receptor 5-HT<sub>7</sub> también ha sido implicado en el efecto de los ADs. Estudios recientes han demostrado que el bloqueo de este subtipo de receptor produce un comportamiento antidepresivo {Adachi, 2007 #3575;Kimelman, 2006 #3579}. Los ratones knock-out del receptor 5-

HT<sub>7</sub> muestran un comportamiento antidepresivo {Liu, 2002 #3581}. El uso del antagonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> el Lu AA21004 en modelos animales de depresión como la bulbectomía olfatoria {Zaghetto, 2007 #3481} o en humanos {Xing, 2003 #3583} muestra un efecto antidepresivo. Ede forma paralela, el tratamiento crónico con el SB-269970, un antagonista de receptores 5-HT<sub>7</sub> incrementa la proliferación celular en la zona subgranular del hipocampo {Zaghetto, 2007 #3481}, aunque no se observan cambios en la proliferación celular en animales knock-out del receptor 5-HT<sub>7</sub> {Bamji, 2003 #3482}.

## **4.2. Factores de crecimiento y neurotrofinas**

Desde mediados de la década de los 90, se acepta que, tanto la etiopatogenia de los trastornos del estado de ánimo, como el efecto de los fármacos ADs, no podían explicarse totalmente por las modificaciones en los neurotransmisores y receptores. Nuevos hallazgos llevaron a postular una hipótesis molecular y celular conocida como "hipótesis neurotrófica de la depresión", que posteriormente fue denominada "hipótesis neuroplástica de la depresión" {Duman, 1997 #2494}. Esta hipótesis vincula los cambios inducidos por el estrés y la acción terapéutica a los ADs a los mecanismos moleculares intracelulares que modulan los factores neurotróficos necesarios para la supervivencia y el funcionamiento de las neuronas. Los fármacos ADs por otro lado, modulan diferentes etapas del proceso neurogénico aumentando los niveles de expresión de neurotrofinas y de factores de crecimiento {Pittenger, 2008 #2552; Encinas, 2006 #2544; Wang, 2008 #2555; Warner-Schmidt, 2006 #2510}.

### **4.2.1. BDNF**

El BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro) es un mediador crítico de la plasticidad tanto durante el desarrollo embrionario como en el SNC adulto {Thoenen, 1995 #3657}. El BDNF se sintetiza como una proteína precursora conocido como preproBDNF que se escinde en proBDNF y luego en BDNF {Lessmann, 2003 #3658}.

#### **4.2.1.1. Transducción de la señal de BDNF. Receptores para BDNF.**

La mayoría de los efectos plásticos del BDNF están mediados por el receptor TrkB. Sin embargo, datos recientes sugiere un escenario más complejo. Se han descrito dos formas activas de BDNF: mBDNF y proBDNF que median su efecto a través de dos tipos diferentes de receptores: el receptor TrkB de alta afinidad y el receptor de neurotrofina de baja afinidad p75 (p75NTR) respectivamente. Esto sugiere que tanto las condiciones en que se segrega BDNF como su escisión extracelular son de vital importancia para su efecto funcional {Martinowich, 2007 #3661}. La señalización de mBDNF través de TrkB, y de proBDNF través de p75 puede provocar efectos contrarios a la plasticidad, como la inducción de atrofia neuronal, la apoptosis, el acortamiento dendrítico y la inducción de LTD {Woo, 2005 #3659}. Todos estos hallazgos enfatizan la bidireccionalidad de la plasticidad neuronal, donde la neurogénesis, la arborización de las neuritas y sinaptogénesis se equilibran con la muerte neuronal programada, la retracción de las neuritas, y el acortamiento sináptico.

La unión de BDNF al receptor TrkB induce la dimerización y trans-autofosforilación de dos residuos de tirosina (Y515 y Y816) en el dominio intracelular del receptor. La fosforilación del residuo Y515 permite la activación de las vías Ras/MAPK y PI3K por el reclutamiento de la proteína SHC/FRS-2. Por otra parte, la fosforilación del residuo Y816 activa la vía de señalización CAMK/CREB por el reclutamiento de PLC {Minichiello, 2002 #3662}.

#### **4.2.1.2. Papel de BDNF en la neurogénesis y plasticidad sináptica**

BDNF es uno de los miembros más activos de la neurotrofina familia. En condiciones fisiológicas, el BDNF regula varios mecanismos de plasticidad sináptica la supervivencia y la diferenciación neuronal potenciación a largo plazo (LTP), la depresión a largo plazo (LTD), el aprendizaje y la memoria. En condiciones patológicas, el BDNF protege las neuronas del hipocampo de la excitotoxicidad del glutamato y la isquemia (Revisado en Toshiyuki, et al. 2015).

BDNF juega un papel importante en la neurogénesis ambos en el hipocampo como en la ZSV. BDNF puede modular distintas vías de señalización que contribuyen a la respuesta neurogénica modulando tanto la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia celular.

#### **4.2.1.3. Papel de BDNF en la etiopatogenia de la depresión**

El papel final de BDNF en la depresión todavía no está claro, ya que, aunque numerosos estudios en modelos animales de depresión observan una disminución del nivel de BDNF en hipocampo que incrementa tras el tratamiento con ADs {Lie, 2004 #3665;Duman, 2000 #3666;Hur, 2010 #3667;Hart, 1999 #3668}, algunos autores no encuentran cambios en los niveles de BDNF asociados a modelos animales de estrés {Kodama, 2004 #2521;Bamji, 2006 #3671;Sun, 2009 #3672}

En humanos, los niveles de BDNF y TrkB están disminuidos en el hipocampo y en la PFCx post-mortem de víctimas de suicidio con antecedentes de depresión, así como en el suero de pacientes con depresión {Karege, 2005 #3675;Karege, 2005 #3676;Monteleone, 2008 #3677;Sen, 2008 #3678}. Esta disminución de BDNF en suero se ha relacionado con una disminución de la capacidad de las plaquetas para liberar BDNF {Karege, 2005 #3675}. En modelos animales asociados al estrés se ha observado además, un incremento de los niveles de BDNF en estructuras cerebrales como el núcleo accumbens y la amígdala {Autry, 2012 #3670} pero no en el suero {Adachi, 2008 #3669;Saarelainen, 2003 #3680;Monteggia, 2004 #3681}. Estos cambios se normalizan tras tratamiento a largo plazo con ADs {Autry, 2012 #3670}. Por lo tanto, el BDNF se ha propuesto como un biomarcador de la eficacia de la respuesta antidepresiva {Hashimoto, 2010 #3683}. Recientemente, se ha observado un aumento de los niveles proBDNF en muestras de cerebro post mortem de en sujetos suicidas {Dwivedi, 2009 #3663}. Además, la ratio de expresión del receptor p75 respecto al receptor TrkB se ve incrementada en muestras de cerebro post mortem de sujetos suicidas {Dwivedi, 2009 #3663}.

En humanos, el SNP (Val66Met) en el gen de BDNF se ha asociado a una disminución de la secreción de BDNF ({Egan, 2003 #3685}, a una mayor incidencia de trastornos neuropsiquiátricos {Sen, 2003 #3686;Verhagen, 2010 #3687}, y a la falta de respuesta al tratamiento antidepresivo {Kocabas, 2011 #3688}. Este SNP, predispone a una conducta depresiva-like en modelos animales de estrés, que revierte tras el tratamiento con ADs {Yu, 2012 #3689}.

#### **4.2.1.4. Papel de BDNF en el mecanismo de acción de los fármacos ADs**

Los datos en modelos animales con déficit de BDNF (ratones knock-out condicionales o siRNA), han demostrado que la supresión de BDNF, sobre todo en el giro dentado, pero no en CA1, del hipocampo, disminuye la respuesta al tratamiento ADs {Adachi, 2008 #3669}. La supresión específica de BDNF en las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (VTA) del sistema mesolímbico, induce por si mismo una respuesta antidepresiva {Autry, 2012 #3670}.

La infusión de BDNF en cerebro de la rata {Siuciak, 1997 #3700;Hoshaw, 2005 #3701}, y más específicamente en el GD {Siuciak, 1996 #3702;Shirayama, 2002 #3703;Ye, 2011 #3704} pero no en el CA1 {Shirayama, 2002 #3703} del hipocampo produce un efecto antidepresivo-like. En contraste con los resultados en el hipocampo, la inyección de BDNF en el área tegmental ventral aumenta el comportamiento depresivo-like cuando, y la inhibición de la señalización de BDNF en el núcleo accumbens produce una respuesta antidepresiva {Eisch, 2003 #3705;Berton, 2006 #3706}. Finalmente, la administración periférica de BDNF produce efectos antidepresivo {Schmidt, 2010 #3707}.

La señalización de BDNF a través de TrkB está involucrada críticamente en varias respuestas de los ADs; sin embargo, el papel de la señalización dependiente de p75NTR no está claro. El aumento de mBDNF, a través de la señalización de TrkB, se asocia a una respuesta antidepresiva, mientras que el aumento de BDNF, a través de la señalización de p75, ejerce un efecto pro-depresivo {Lu, 2005 #3664}.

Múltiples datos apoyan el papel del BDNF en la respuesta de los ADs (Figura 3). El tratamiento crónico con ADs (SSRIs, SNRIs o tricíclicos), la terapia electroconvulsiva o la administración de antipsicóticos atípicos, incrementan el nivel de ARNm de BDNF en hipocampo, de proteína en

algunos, pero no todos los estudios {Tamburella, 2009 #3208; Pascual-Brazo, 2012 #2462; Martinowich, 2007 #3661; Nibuya, 1995 #2536; Martinez-Turrillas, 2005 #3695; Russo-Neustadt, 2005 #3696; Duman, 2006 #3697; Molteni, 2006 #3698}. Este efecto parece estar mediado, al menos en parte, por el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, ya que el bloqueo farmacológico de este subtipo de receptor bloquea la disminución de ARNm de BDNF en el hipocampo inducida por el estrés {Vaidya, 1997 #3699}. En este sentido, el tratamiento durante 7 días SSRI y antagonistas del 5-HT<sub>2A</sub> aumenta la expresión del ARNm de BDNF en el giro dentado del hipocampo {Pilar-Cuellar, 2012 #3690}.

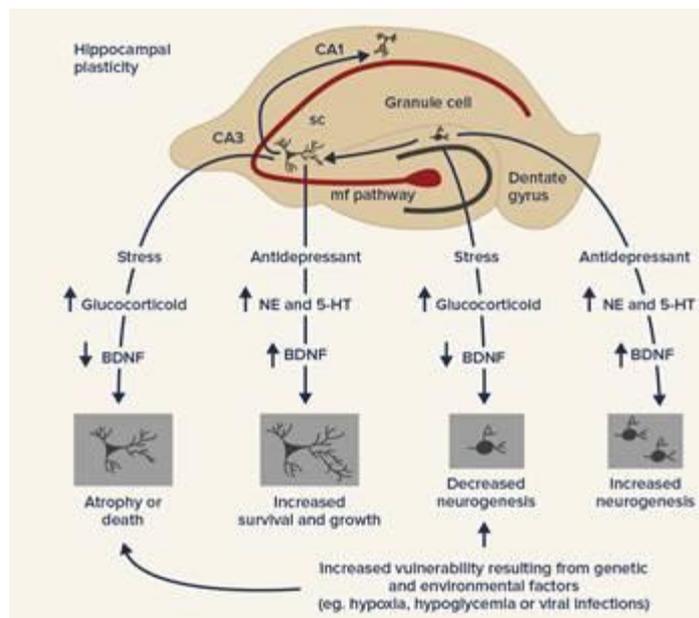


Figura 3.- Relación entre el eje HPA y BDNF en la regulación de la neuroplasticidad.

El tratamiento con ADs aumenta la expresión de BDNF tanto en el hipocampo como en las regiones mesolímbicas {Molteni, 2006 #3698}.

Finalmente, el BDNF incrementa los niveles de catecolaminas por la activación de la tirosina hidroxilasa (TH), la enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis de catecolaminas. El promotor del gen TH está regulado positivamente por BDNF a través de su receptor TrkB específico y la vía ERK / MAP cinasa. La activación del gen TH por BDNF se antagoniza selectivamente por señales evocadas de Ca<sup>2+</sup> a través de los receptores NMDA {Fukuchi, 2010 #3709}. La participación de la TH en los efectos ADs de BDNF necesita más investigación.

#### 4.2.2. VEGF

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) pertenece a un grupo de proteínas de señalización implicadas en la regulación de la angiogénesis fisiológica y patológica. Durante los últimos años, se ha sugerido un papel importante del VEGF en la depresión, dando lugar a la "hipótesis vascular de la neurogénesis adulta" {Palmer, 2000 #3226}.

VEGF fue aislado como un factor de permeabilidad vascular (VPF) (Senger DR et al. 1983). La familia VEGF consta de seis miembros con un alto grado de homología, VEGF A (VEGF), VEGF B, VEGF C, VEGF D, VEGF E y el factor de crecimiento placentario (PIGF). Se han identificado cuatro variantes de VEGF-A: VEGF<sub>188</sub>, VEGF<sub>164</sub>, VEGF<sub>120</sub>, y VEGF<sub>115</sub>. Las isoformas VEGF<sub>120</sub> y VEGF<sub>164</sub> son las predominantes en cerebro {Warner-Schmidt, 2008 #3712}.

VEGF es el factor angiogénico más importante en el desarrollo {Ferrara, 2003 #3337}, en la angiogénesis patológica {Plate, 1992 #3230; Lafuente, 1999 #3243; Lafuente, 2007 #3244; Marti, 2000 #3317} y también en la permeabilidad vascular {Dvorak, 2006 #3318}. El papel de VEGF en el

tejido nervioso es mucho más extenso, adquiriendo cada vez más relevancia a medida que se conocen mejor sus propiedades neuroprotectoras, neurotróficas y neurogénicas {Jin, 2002 #3235;Storkebaum, 2005 #3335}.

#### 4.2.2.1. Regulación de la expresión de VEGF

VEGF es sintetizado por muchos tipos de células incluidos los astrocitos y las células madre neuronales. La expresión de VEGF está regulada por una serie de mecanismos, entre los que la hipoxia parece ser el más importante {Brockington, 2004 #3240}; pero el estrés celular inducido, por ejemplo, por la hipoglucemia o la acidosis o el estrés oxidativo, puede ser otros activadores de la expresión de VEGF {Zhang, 2000 #3336}.

#### 4.2.2.2. Receptores VEGF

Los principales receptores para VEGF son los receptores tirosina cinasa VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR) {Ferrara, 2003 #3337;Xie, 2004 #3339}. El VEGFR-2 media casi todas las respuestas celulares conocidas de VEGF, incluyendo el aumento de la permeabilidad vascular, una acción mitogénica y angiogénica {Shalaby, 1995 #3341}. En el sistema nervioso VEGFR2 participa en la estimulación de la proliferación, la migración y la supervivencia de diferentes tipos de células nerviosas inducido por el VEGF {Ruiz de Almodovar, 2009 #3342}. Por otro lado, se cree que el VEGFR-1 regula negativamente la angiogénesis, evitando la unión del VEGF al receptor VEGFR-2, {Fong, 1999 #3343}.

Se ha descrito también, que el VEGF se une a receptores no tirosina cinasa como la neurofilina-1 (NP-1) y la neurofilina-2 (NP-2), que pueden estar involucrados en la orientación del axón {Neufeld, 2002 #3345}. La coexpresión de los receptores VEGFR-2 y NP-1 aumenta la unión de VEGF a los receptores VEGFR-2 y la quimiotaxis mediada por VEGF {Soker, 1998 #3346}. Se ha descrito también, un papel neuroprotector para VEGF, que está mediado predominantemente por el receptor VEGFR-2 {Storkebaum, 2004 #3348} el cual opera a través de las rutas de PI3/Akt y de MEK/ERK {Kaya, 2005 #3383;Wick, 2002 #3365}.

#### 4.2.2.3. Transducción de la señal intracelular de VEGF

El VEGF interactúa con un dominio extracelular del receptor e induce la fosforilación de residuos intracelulares del mismo. Se requieren ambos receptores (VEGFR-1, VEGFR-2) para la angiogénesis normal, aunque la señalización por el receptor VEGFR2 prevalece en el sistema nervioso {Brockington, 2004 #3240;Quinn, 1993 #3316}.

En las células endoteliales, la activación del receptor VEGFR-2 induce la fosforilación de un residuo de tirosina, el Tyr1175, que una vez fosforilado se une a la fosfolipasa Cc (PLCC) e incrementa la concentración intracelular de diacilglicerol (DAG) y calcio que activan la proteína cinasa C (PKC). La PKC activa la señal extracelular-cinasa1/2 (ERK1/2) regulada por las proteínas Ras y Raf-1 {Brockington, 2004 #3240;Olsson, 2006 #3249;Zachary, 2003 #3247}. En neuronas la estimulación de VEGFR-2 activa las vías PLCc/MAPK, mientras que VEGFR-1 activa la vía PI3K {Brockington, 2004 #3240;Olsson, 2006 #3249;Ruiz de Almodovar, 2009 #3342;Zachary, 2003 #3247}.

#### 4.2.2.4. Papel de VEGF en la neurogénesis y plasticidad sináptica

En el hipocampo adulto, la neurogénesis está estrechamente relacionada con la angiogénesis. VEGF cumple un papel crucial en el nicho neurovascular de células madre del hipocampo. La administración intracerebroventricular de VEGF estimula la neurogénesis en la SVZ y SGZ y mejora el aprendizaje {Jin, 2002 #3321;Warner-Schmidt, 2007 #3214}, mientras que el silenciamiento de VEGF en el hipocampo tiene efectos negativos en la neurogénesis y el aprendizaje {Cao, 2004 #3205},

Estudios reciente, indican que el VEGF participa en este *cross-talk* entre las células endoteliales y los precursores neuronales en la SGZ. VEGF puede ejercer un efecto mitogénico directo sobre células progenitoras neurales estimulando su proliferación {Jin, 2002 #3321}. VEGF puede promover efectos neurogénicos indirectamente por estimulación de la producción de células

endoteliales y la liberación de factores neurotróficos clave por ejemplo, BDNF, bFGF o G-CSF {Namiecinska, 2005 #3231;Ogunshola, 2002 #3232;Ruiz de Almodovar, 2009 #3242}, o actuando directamente sobre precursores neuronales a través de un mecanismo dependiente de Flk-1 {Jin, 2002 #3321;Maurer, 2003 #3237;Schanzer, 2004 #3238;Warner-Schmidt, 2007 #3214}. Por otra parte el efecto neurogénico podría ser bloqueado eficazmente por el pretratamiento con SU5416, un inhibidor del receptor de VEGF-Flk-1 {Segi-Nishida, 2008 #3234}.

Tanto la irradiación del giro dentado del hipocampo como en los modelos animales de depresión por estrés se reduce la expresión de VEGF {Warner-Schmidt, 2008 #3229}, {Heine, 2004 #2512}, ambas situaciones se asocian con una disminución de la proliferación de células del hipocampo. La disminución de las células progenitoras responsables de la expresión de VEGF parece subyacer en la reducción de este factor {Warner-Schmidt, 2008 #3229}.

VEGF puede influenciar cambios a largo plazo en la eficacia sináptica. El mecanismo de acción del VEGF en la plasticidad sináptica no se ha aclarado completamente pero estaría implicado en la modulación de la proteína cinasa II (CaMKII) Ca<sup>2+</sup> + / calmodulina dependiente, CREB y mTOR {Nowacka, 2012 #3714}.

#### 4.2.2.5. Papel de VEGF en la etiopatogenia de la depresión

Numerosos estudios se han centrado en el papel de la disfunción vascular en el desarrollo de la depresión. Las enfermedades cerebrovasculares, incluyendo apoplejía, se asocian con una alta incidencia de depresión {Alexopoulos, 1997 #3224}. En pacientes con depresión resistente al tratamiento es muy frecuente encontrar una disminución del flujo sanguíneo cerebral y del metabolismo en PFCx y en el hipocampo {Saxena, 2001 #3222;Videbech, 2001 #3223}. Debido a que la disfunción en la angiogénesis y la neurogénesis son características comunes de la depresión, el VEGF puede servir como un hilo conductor que conecta los cambios en la angiogénesis y la neurogénesis con la fisiopatología y el tratamiento del trastorno depresivo.

Estudios recientes sugieren que VEGF puede estar desregulado en el estrés (

Figura 4) y en la depresión. El estrés crónico disminuye la expresión de VEGF en el hipocampo {Bergstrom, 2008 #3221}. En animales, el bloqueo de la expresión de VEGF bloquea los efectos beneficiosos de los ADs frente al stress, lo que sugiere, que, la señalización de VEGF es importante en los efectos del estrés en el cerebro {Warner-Schmidt, 2008 #3712;Pitzer, 2003 #3220}. La infusión intracerebroventricular de VEGF imita la acción de los ADs sobre varios paradigmas de comportamiento (por ejemplo, la indefensión aprendida, la natación forzada, o el NSF) {Warner-Schmidt, 2007 #3214}.

Estudios clínicos en pacientes deprimidos muestran que la concentración de VEGF en suero aumenta en algunos, pero no todos los estudios {Clark-Raymond, 2013 #3716}. Se han sugerido que los niveles plasmáticos de VEGF pueden ser un valor predictor de la respuesta al tratamiento en pacientes con trastornos del estado de ánimo {Halmi, 2013 #3218}. A pesar de que VEGF esta ligado a trastornos psiquiátricos, no se ha podido demostrar si la concentración de VEGF en suero refleja su nivel en el sistema nervioso central {Elfving, 2010 #3217}. Finalmente, las variaciones polimórficas en el gen VEGF podrían contribuir a la susceptibilidad en el desarrollo de la depresión resistente al tratamiento en pacientes {Viikki, 2010 #3216}.

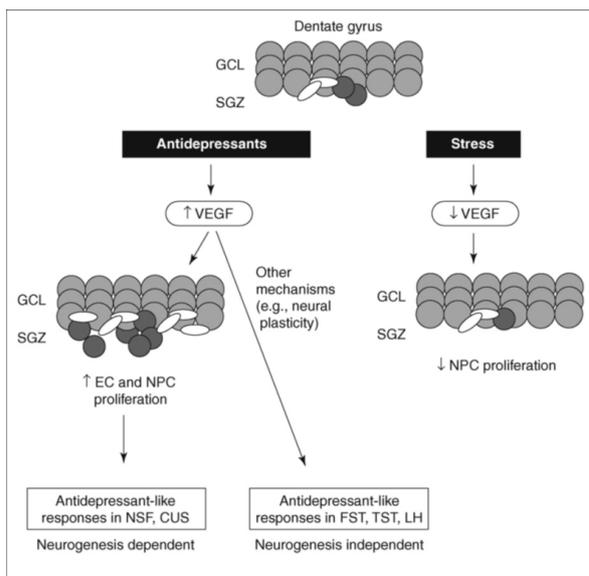


Figura 4: Regulación de la expresión VEGF por los ADs y el estrés. En el giro dentado del hipocampo, los ADs aumentan ARNm de VEGF y la expresión de proteínas en la capa de células granulares (GCL) neuronas (círculos grises) y las células endoteliales (CE) (óvalos blancos), estimula la proliferación de CE y células precursoras neuronales (CPN) (círculos grises oscuros) en la zona subgranular (SGZ). Se requiere la inducción de la expresión del VEGF para las respuestas de comportamiento antidepresivo en ambos paradigmas neurogénesis-dependiente y neurogénesis-independiente, lo que sugiere que VEGF también ejerce sus efectos a través de mecanismos celulares adicionales, tales como la plasticidad neural. Imagen tomada de {Warner-Schmidt, 2008 #3712}.

NSF, supresión de la alimentación; CUS, el estrés crónico impredecible; FST, prueba de natación forzada; TST, prueba de suspensión por la cola; LH, indefensión aprendida.

#### 4.2.2.6. Papel de VEGF en el mecanismo de acción de los fármacos ADs

Diferentes fármacos ADs (incluyendo los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina) aumentan la expresión de VEGF en el hipocampo (Tabla 5){Greene, 2009 #3215;Warner-Schmidt, 2007 #3214}. La actividad del sistema 5-HT afecta la expresión de VEGF que a su vez media parcialmente la respuesta conductual a los fármacos ADs {Tamburella, 2009 #3208;Warner-Schmidt, 2007 #3214}. Este efecto de VEGF está mediado por la activación de su receptor, el Flk-1{Boldrini, 2010 #3212;Warner-Schmidt, 2008 #3229}.

Tabla 5: Influencia de fármacos ADs en VEGF y el nivel de proteína VEGF en el hipocampo de rata en estudios in vivo.

Prueba /Modelo	antidepresivo o VEGFR antagonista	Duración del tratamiento	Efectos	Referencia
CUS, NSF,FST	Fluoxetina (5 mg/kg i.p)	21 días	↑niveles de proteína VEGF	Greene et al (2009)
	Sertralina (10mg/kg i.p)			
	Amipriptilina (5 mg/kg b.i.d. i. 21 días		↑niveles de proteína VEGF	Greene et al (2009)
	Venlafaxina (15 mg/kg b.i.d i.p)			
	SU5416 (4 nM i.c.v)	Antagonista VEGFR 14, 16,18 y 20 días	↑expresión de RNAm de VEGF en la ( bloquean el efecto de fluoxetina	Greene et al (2009)
LH, FST	Fluoxetina (5 mg/kg i.p)	14 días	SU5416 bloquea el efecto de fluoxetina y desipramina	Warner- Schmidt y Duman (2007)
	SU5416 (4 nM i.c.v)	SU5416 8, 10, 12 y 14 días		
	Desipramina (10 mg/kg i.p)	6 días	↑ RNAm de VEGF en GCL	Warner- Schmidt y Duman (2007)
	SU5416 (4 nM i.c.v)	SU5416 3 días		
NSF	Desipramina (7.5 mg/kg i.p)	21 días	SU5416 bloquea el efecto antidepresivo de desipramina	Warner- Schmidt y Duman (2007)
	SU5416 (4 nM i.c.v)	SU5416 12, 15, 18 y 21 días		
CUS	Desipramina (7.5 mg/kg i.p)	28 días	SU5416 bloquea preferencia por sucrosa de desipramina	Warner- Schmidt y Duman (2007)
	SU5416 (4 nM i.c.v)	SU5416 28 días		

CUS: estrés crónico leve impredecible, FST: test de natación forzada, GCL: capa de las células granulares, LH: Indefensión aprendida, NSF: test de supresión de la alimentación por novedad. GCL: capa de las células granulares; LH: Indefensión aprendida; NSF: test de supresión de la alimentación por novedad

Tratamientos no farmacológicos para la depresión, como el ejercicio {Fabel, 2003 #3204}, la exposición a ambientes enriquecidos {Cao, 2004 #3205} y la terapia electroconvulsiva {Newton, 2003 #3207} que aumentan la neurogénesis aumentan la expresión de VEGF en el hipocampo.

Por otro lado, el silenciamiento de VEGF en hipocampo {Lee, 2009 #3718}, o el uso de antagonistas de su receptor Flk-1 bloquea su efecto antidepresivo y disminuye los marcadores de células precursoras neuronales y neuronas inmaduras como doublecortin (DCX){Kiuchi, 2012 #3717}.

### 4.3. Vías intracelulares

#### 4.3.1. Cascada del adenosín monofosfato cíclico (cAMP)

Todos los componentes en la vía de señalización de cAMP se han implicado en la patofisiología de los trastornos de ánimo, así como en la acción de fármacos ADs. Las modificaciones en varios elementos de esta vía, como las proteínas de G (Gs o Gi), adenilato ciclasa (AC), los niveles del cAMP, la cinasa dependiente de AMPc (PKA) y el factor de transcripción (CREB), se han estudiado tanto en células periféricas como en el cerebro post mortem en pacientes con trastornos afectivos, tanto antes como después del tratamiento antidepresivo {Tardito, 2006 #3728;Mato, 2010 #3738} {Gould, 2002 #3739} {Blendy, 2006 #3740}. Varios elementos a lo largo de esta vía se han identificado como objetivos potenciales para fármacos ADs.

Tanto en células periféricas como en cerebro post mortem de pacientes con depresión mayor, hay una reducción de la actividad de adenil ciclasa (AC) en respuesta a forskolina {Menninger, 1997 #3741}, agonistas  $\beta 2$  adrenérgicos {Valdizan, 2003 #3742;Pandey, 1985 #3745;Extein, 1979 #3749;Halper, 1988 #3752;Mann, 1997 #3753;Mazzola-Pomietto, 1994 #3758} y agonistas  $\alpha 2$ -adrenérgicos {Valdizan, 2010 #3764}. El tratamiento crónico con ADs produce aumento del nivel de cAMP en hipocampo, corteza y estriado de rata, así como en muestras post mortem de corteza frontal humana proveniente de pacientes diagnosticados de depresión. La inyección directa de cAMP o la inhibición de la degradación de cAMP por Rolipram producen en animales un efecto similar al efecto antidepresivo observado por tratamientos farmacológicos en humanos {Zhang, 2009 #3770}. El tratamiento antidepresivo crónico en rata desensibiliza la respuesta de cAMP a los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>4</sub> {Pascual-Brazo, 2012 #2462;Vidal, 2009 #3775;Vidal, 2010 #3779} e hipersensibiliza la respuesta a receptores CB<sub>1</sub> mediada por la adenil ciclasa {Mato, 2010 #3738}.

El siguiente paso en la vía de señalización es la activación de la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) por el cAMP, la actividad PKA aumenta tras la administración crónica de ADs {Nestler, 1989 #3780}. La PKA fosforila proteínas como el CREB, un factor de transcripción que regula la expresión de varios genes implicados en neuroplasticidad, supervivencia celular y cognición {Shaywitz, 1999 #3781;Viola, 2000 #3782;Hardingham, 2001 #3783;Lonze, 2002 #3784;Carlezon, 2005 #3785}. CREB se ha implicado en el patofisiología de la depresión mostrando tanto respuestas conductuales como celulares a los ADs {Tardito, 2006 #3728;Blendy, 2006 #3740}. La expresión hipocampal de CREB se reduce en respuesta al estrés {Alfonso, 2006 #3786;Morley-Fletcher, 2011 #3787}. La terapia electroconvulsiva (ECS) o la terapia antidepresiva crónica, pero no la aguda, aumentan los niveles de mRNA, proteína y actividad de CREB, promoviendo la fosforilación de esta proteína, efectos dependientes del área y del fármaco utilizado {Tardito, 2006 #3728;Morley-Fletcher, 2011 #3787;Dowlatshahi, 1999 #3788;Odagaki, 2001 #3789;Yamada, 2003 #3790;Laifenfeld, 2005 #3791}.

Por lo tanto, el aumento de los niveles de CREB fosforilado en el hipocampo está vinculado al comportamiento antidepresivo {Chen, 2001 #3159}, como se puede observar tras la sobreexpresión de CREB en hipocampo mediada por virus, en modelos comportamentales de depresión {Chen, 2001 #3159}. Por el contrario la sobreexpresión CREB en el núcleo accumbens o amígdala, produce efectos pro depresivos {Wallace, 2004 #3792;Pliakas, 2001 #3793}. Por otro lado, la disminución de CREB en el núcleo accumbens de ratones exhibe una respuesta antidepresiva {Valverde, 2004 #3794}. Estudios en cerebro humano postmortem indican una disminución del nivel de proteína CREB en sujetos con antecedentes de depresión no tratados con ADs, mientras que se observa un incremento del nivel de CREB en pacientes que tomaban algún antidepresivo en el momento de la muerte {Dowlatshahi, 1998 #3795}. Estos resultados son paralelos a estudios en fibroblastos humanos de pacientes con depresión mayor {Manier, 2002 #3796}. Entre los varios genes diana regulados por CREB, dos de los más relevantes, son el BDNF y el VEGF {Duman, 1999 #2508;Malberg, 2000 #2497;Nibuya, 1996 #3797;Perera, 2008 #3798}, el papel de estos factores en la plasticidad, neurogénesis, depresión y efecto de los antidepresivos ha sido ya comentada en secciones anteriores.

### 4.3.2. Vía de Wnt/ $\beta$ -Catenina.

Wnt (del inglés wingless) es una familia de moléculas de glicoproteínas extracelulares secretadas a través de la vía de  $\beta$ -catenina, y al menos dos vías independientes de  $\beta$ -catenina, la vía Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  y la vía de polaridad celular planar (PCP) (Figura 5). Las proteínas Wnt tienen papeles clave en muchos procesos fundamentales como el desarrollo embrionario, la diferenciación, la movilidad celular, la proliferación celular y la homeostasis del tejido adulto {Li, 2006 #3799}; {Patapoutian, 2000 #3800}. El papel de la vía canónica  $\beta$ -catenina en el desarrollo neural, a través de la modulación de la proliferación y diferenciación de las células madre neurales (NSC) se ha demostrado claramente {Li, 2005 #3801}. Algunos de los procesos regulados por la actividad de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina, son la diferenciación neural {Ciani, 2005 #3802}, la formación del hipocampo {Galceran, 2000 #3803; Zhou, 2004 #3804}, la morfogénesis dendrítica {Yu, 2003 #3806; Gao, 2007 #3811}, la orientación axonal {Zaghetto, 2007 #3881; Purro, 2008 #1240}, y la formación de sinapsis {Bamji, 2003 #3482}. Por otra parte, también juega un papel importante en el aprendizaje espacial {Hernandez, 2002 #3895} y la memoria, incluyendo la potenciación a largo plazo (LTP).

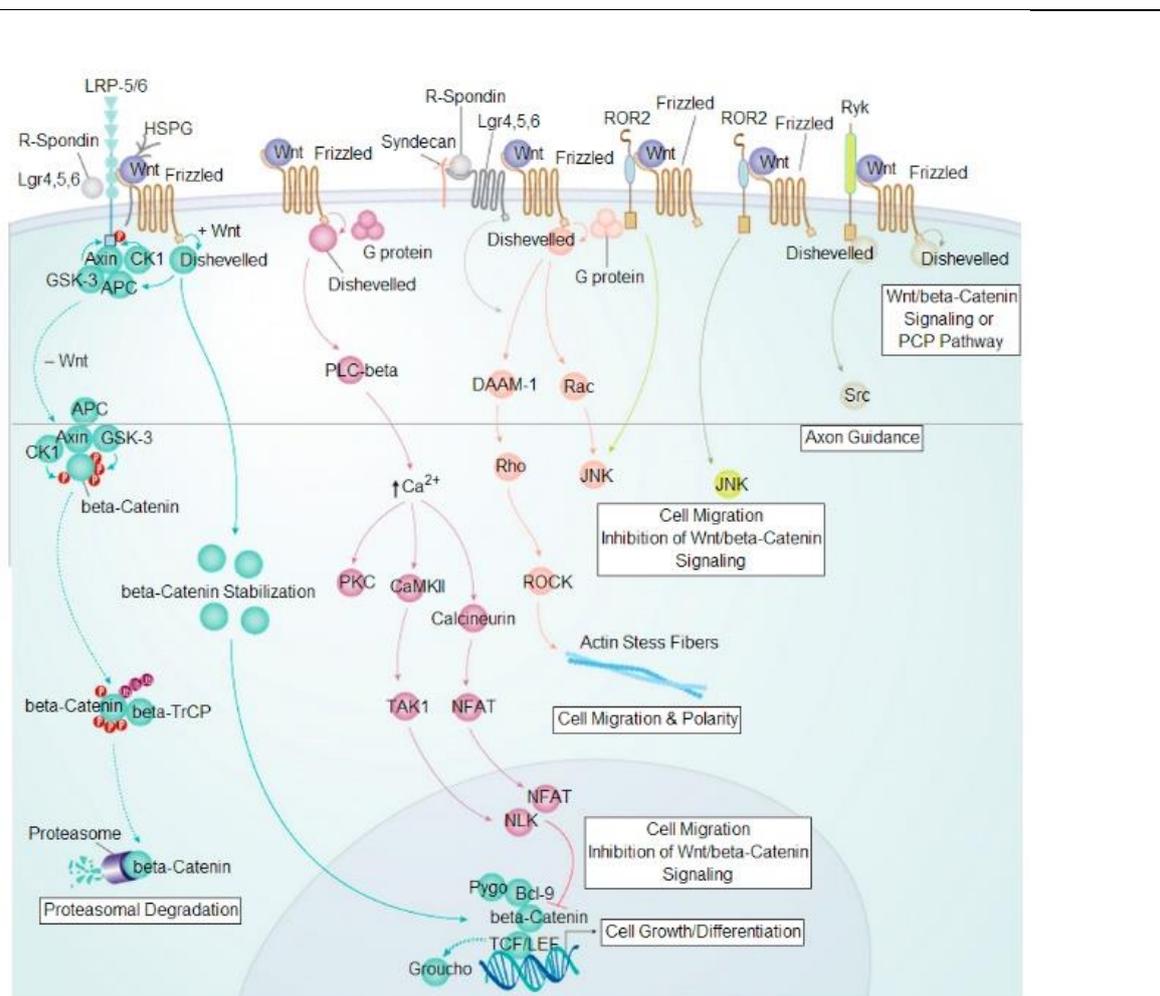


Figura 5.- Vías de señalización de wnt: Cuando la vía está activada, Wnt forma un complejo con el receptor frizzled (Fz) y LRP5/6;  $\beta$ -catenina se disocia de una serie de cofactores (APC, Axin y GSK3 $\beta$ ), impidiendo así su fosforilación. Los cofactores Axin, Frat1 y Dsh provocan una inhibición en la enzima glicógeno-sintasa-cinasa 3 (GSK3 $\beta$ ), lo que permite alcanzar un nivel estable de  $\beta$ -catenina en el citosol, que es trasladada al núcleo, donde activa genes regulados por wnt. En la forma opuesta a la anterior, la proteína Fz no está unida al ligando Wnt y no se produce señal de activación. Los factores inhibidores Dkk y SOST pueden acoplarse a LRP5/6 y bloquear la señal Wnt; en esta situación, no se produce la inhibición de GSK3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina es fosforilada (P) y transportada al proteosoma para su degradación. APC: factor supresor tumoral (adenomatous polyposis coli tumor). Vía canónica de wnt en verde, calcio en rosa, pcp en naranja, otras vías no canónicas en gris.

En ausencia de señalización de Wnt (Figura 6), la función de  $\beta$ -catenina es bloqueada por un complejo Axin, poliposis adenomatosa coli (APC), glicógeno sintasa cinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) y caseína

cinasa 1a (CK1a) {Yost, 1996 #3896}, que fosforila  $\beta$ -catenina para su destrucción en el proteasoma {Aberle, 1997 #3484}; {Li, 1999 #3897}. La unión de las proteínas Wnt a los receptores de Frizzled (Fz) y a las lipoproteínas de baja densidad relacionadas con el receptor (LRP5/6), recluta y fosforila la cola citoplasmática de LRP5/6, siendo esta modificación necesaria para la estabilización citoplasmática de  $\beta$ -catenina. Esta fosforilación de LRP es mediada por CKI y GSK3 $\beta$ , las mismas cinasas que actúan en el complejo de degradación de  $\beta$ -catenina, por la destrucción del complejo Axin/APC/GSK-3 $\beta$ . GSK-3 $\beta$  que fosforila  $\beta$ -catenina en el extremo amino terminal (Nt), etiquetándola así para su degradación. Así, la inhibición de GSK-3 $\beta$  bloquea la degradación de la  $\beta$ -catenina, lo que permite la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma y su posterior translocación al núcleo, que es esencial para la vía canónica de Wnt {Logan, 2004 #3898}.

Una vez en el núcleo,  $\beta$ -catenina forma un complejo con los factores de transcripción de células T/ y potenciador linfóide (TCF/LEF) y coactivadores, tales como Bcl-9 y Pygopus (Pygo), para inducir la expresión de genes diana de Wnt. Los factores de transcripción TCF/LEF están ligados a Groucho, proteína que produce efectos represivos {Logan, 2004 #3898}.  $\beta$ -catenina nuclear promueve el desplazamiento de Groucho y la unión a la proteína de histona acetilasa cAMP en respuesta a CREB, activando la maquinaria de transcripción {Logan, 2004 #3898; Jope, 2002 #3905}.

Además de la vía de señalización dependiente de  $\beta$ -catenina, existen al menos dos vías de señalización Wnt  $\beta$ -catenina-independientes (Figura 5). La vía Wnt-Ca<sup>2+</sup> activa la proteína cinasa calcio/calmodulina-dependiente tipo II (CaMKII) y proteína cinasa C (PKC). Esto ocurre a través del acoplamiento a una proteína G e incluye la activación de fosfolipasa C (PLC). Esta vía, induce la migración celular e inhibe la vía dependiente de  $\beta$ -catenina. La otra vía principal de Wnt es la vía de PCP, que regula la movilidad celular y la polaridad tisular; implica la activación de Rho y Rac GTPasas, Rho-cinasa (ROCK) y c-Jun N-terminal cinasa (JNK). Como en el caso de la vía Wnt/Ca<sup>2+</sup>, la vía de PCP también inhibe la vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina. Tanto la vía de PCP como la canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina son promovidas por la unión de R-Spondins a los leucine-rich repeat-conteniendo, G receptores (Lgr), Lgr4, Lgr5 y Lgr6. {Li, 2005 #3477}.

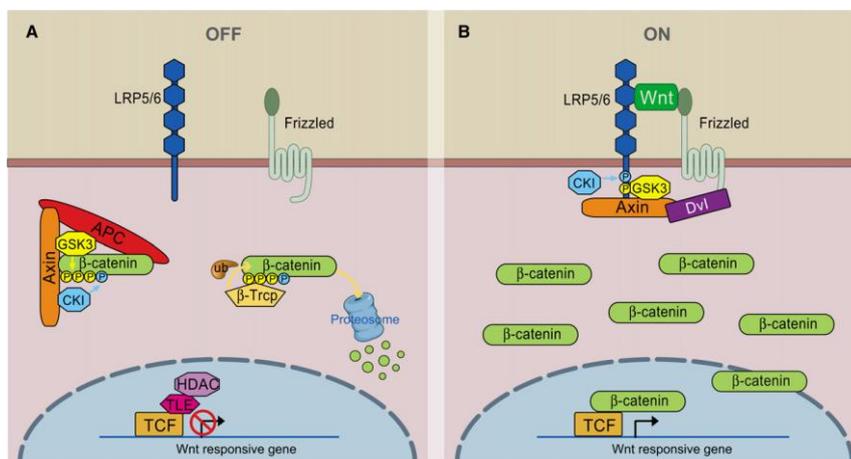


Figura 6. Señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina (A) en ausencia de Wnt,  $\beta$ -catenina citoplasmática forma un complejo con Axin, APC, GSK3 $\beta$  y CK1 y es fosforilado por CK1 (azul) y posteriormente por GSK3 $\beta$  (amarillo). Fosforilada  $\beta$ -catenina es reconocido por el E3 ubiquitina ligasa  $\beta$ -Trcp, que dirige a  $\beta$ -catenina para degradación proteosomal. Los genes blanco de Wnt están reprimidos por TVC-TLE/Groucho y las histonas deacetilasas (HDAC). (B) en presencia de ligandos Wnt, se forma un complejo entre el receptor Fz y LRP5/6. Reclutando de DVL por Fz que lleva a fosforilación LRP5/6 y al reclutamiento de Axin. Esto interrumpe la fosforilación mediada por Axin o degradación de  $\beta$ -catenina, permitiendo que  $\beta$ -catenina se acumule en el núcleo donde sirve como del activador de genes de respuesta a Wnt. Tomado de {MacDonald, 2009 #3903}.

#### 4.3.2.1. Ligandos WNT, receptores y co-receptores

El nombre wnt deriva del gen de *Drosophila* Wingless, y el oncogene de mamífero *Int-1*. En 1982 Nusse y Varmus descubrieron el oncogén *int-1* que inducía tumores mamarios por el virus tumoral MMTV (*Mouse Mammary Tumour Virus*). Posteriormente se identificaron otros oncogenes denominados *int-2* e *int-3*, todos ellos codifican polipéptidos secretados. Estos oncogenes son similares al gen *wingless* (*Wg*) de *Drosophila melanogaster* {Rijsewijk, 1987 #3906}. Ante la similitud de estos genes se denominó a este nuevo grupo de genes *Wnt*. de *wingless-type MMTV integratio type site (int-1)* {Nusse, 1991 #3909}.

En general, todos los genes Wnt codifican un grupo de glucoproteínas secretadas, de 350 a 400 aa, todas tienen entre 22 y 24 residuos de cisteína conservados y al menos un sitio de glicosilación. Las proteínas wnt están modificadas lipídicamente, siendo estos residuos lipídicos muy importantes para su secreción y señalización {Clevers, 2012 #3916}. Hasta la fecha se han descubierto 19 proteínas diferentes que se denominan con números y letras (Wnt-1/Int-1, Wnt-2/Irp ; Wnt-2b/13; Wnt-3a; Wnt-4; Wnt-5a; Wnt-5b; Wnt-6; Wnt-7a; Wnt-7b; Wnt-8a/8d; Wnt-8b; Wnt-9a/14; Wnt-9b/14b/15; Wnt-10a; Wnt-10b/12; Wnt-11). {Nusse, 1992 #3923; Miller, 2001 #3926; Katoh, 2002 #3927; Cadigan, 1997 #3931}. Las proteínas Wnts se clasificaron inicialmente en dos grupos, basados en la habilidad para señalar a través de  $\beta$ -catenina o de iniciar flujo de calcio {van Gijn, 2002 #3934}. Wnt1, Wnt3a, Wnt7a y Wnt8 se unen al receptor Frizzled y a los co-receptores LRP5/6, activando Wnt/ $\beta$ -catenina {MacDonald, 2009 #3935}, Wnt4, Wnt5a y Wnt11 se han identificado como miembros de la vía no-canonica que se unen a los co-receptores RTKs {Green, 2008 #3936}. Sin embargo, la diferenciación tradicional entre ligando canónico y no canónico parece no ser tan simple como se señaló inicialmente, y deben considerarse más aspectos.

Un receptor Wnt prototípico consta de siete dominios transmembrana acoplados a una proteína G - *Frizzled* -(Fz). En su estructura posee un dominio rico en cisteína (CRD) que forma el sitio de unión para ligandos Wnt y otros receptores de Wnt {Dann, 2001 #3937; Saldanha, 1998 #3941}. El C terminal tiene un motivo Lys-Thr-x-x-x-Trp asociado con la unión y activación de Dsh {Umbhauer, 2000 #3961; Wong, 2003 #3964}. La interacción de la Wnt-Fz se considera promiscua, ya Wnt puede enlazar múltiples proteínas *Frizzled*.

Además de Fz, se han descrito otras proteínas como co-receptores alternativos para la señalización por Wnt, como los receptores de la lipoproteína de baja densidad 5/6 (LRP5/6), y los receptores de un solo dominio transmembrana tirosina-cinasa (RTKs) Ror1, Ror2 y Ryk, aumentan la complejidad en la activación de la señalización Wnt {Gordon, 2006 #3967; Hendrickx, 2008 #3968} {Clevers, 2012 #3916}.

Dos clases de receptores que potencialmente afectan la vía de PCP son ROR y *strabismus* (o proteína Van Gogh). ROR2 tiene actividad tirosina cinasa {Nestler, 1989 #3780}. ROR2 tiene un CRD parecido al sitio de unión de Wnt a los receptores Frizzled {Dowlathshahi, 1999 #3788; Odagaki, 2001 #3789}. *Strabismus* compete con Frizzled por el reclutamiento de DSH e interfiere con la señalización de  $\beta$ -catenina para activar la vía de PCP. La vía canónica de Wnt, con Wnt- 1 y el bloque de Wnt -3 unido a DSH, fomenta su asociación con Frizzled. Wnt- 5a y Wnt- 11, sin embargo, promueven la interacción DSH con *strabismus* bloqueando su asociación con Frizzled {Laifenfeld, 2005 #3791}.

La señalización de Wnt también secreta inhibidores o antagonistas , proteínas relacionadas con Frizzled ( SFRPs ) y la proteína inhibidora de Wnt (WIF) que se unen a Wnt , y en el caso de SFRPs , también a Fz, actuando así como antagonistas de Wnt , tanto para  $\beta$ -catenina como para la señalización no canónica. Hay dos clases distintas de inhibidores de Wnt, la familia Dickkopf (DKK) y la familia de WISE/SOST. Las proteínas DKK son antagonistas de ligandos LRP5/6, considerados inhibidores específicos de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina. Las proteínas Shisa representan una familia distinta de antagonistas Wnt con función de proteínas trampa de Fz en el ER evitando que Fz alcance la superficie celular e inhibiendo de esta manera la señalización celular autónoma de Wnt. Norrina y R-espondina (RSPO) son dos familias de proteínas agonistas de la señalización Wnt / $\beta$ - catenina. (Revised in {MacDonald, 2009 #3969}.

#### 4.3.2.2. $\beta$ -catenina

$\beta$ -catenina, es el efector final de la vía Wnt, es un factor de transcripción compuesto de 781 aminoácidos, que presenta una parte central rígida formada por 12 repeticiones imperfectas de la proteína Armadillo, dos segmentos flexibles dominios Nt y Ct y una hélice con una secuencia conservada (Helix-C) en la parte N del dominio Ct, esto es necesario para la función de señalización de  $\beta$ -catenina, pero no para la unión de tipo estructural {Vaidya, 1999 #3990}. Las diferentes proteínas que interactúan con la  $\beta$ -catenina-caderinas, factores de transcripción TCF/Lef o APC, se unen a las repeticiones R3-R9 de Armadillo, en forma mutuamente exclusiva {Gulyas, 1999 #3994}. La unión diferencial de  $\beta$ -catenina a diversos objetivos está determinada por la conformación de la proteína {Rosel, 2004 #3995}: 1) la activación de la vía de Wnt genera una proteína  $\beta$ -catenina "cerrada" (con un pliegue Ct) que interactúa con factores de transcripción TCF en el núcleo; 2) la dimerización de  $\beta$ -catenina "abierto" favorece la interacción a caderinas en la membrana {Wesolowska, 2010 #3996}; 3) la  $\beta$ -catenina "abierto" como un monómero, puede interactuar tanto con caderinas como con factores de transcripción; 4) el extremo fosforilado Nt de  $\beta$ -catenina genera un "complejo de degradación" (APC/Axin/GSK-3 $\beta$ /CK1) degradándola en el proteasoma {Rosel, 2004 #3995}. También ha sido descrita una forma inactiva de  $\beta$ -catenina que puede aparecer debido a la unión de esta proteína en un pequeño polipéptido llamado ICAT, que bloquea la unión de  $\beta$ -catenina a caderinas o TCF {Wesolowska, 2007 #3997}.

#### 4.3.2.2.1. Regulación de los niveles de $\beta$ -catenina en citosol

En estado basal,  $\beta$ -catenina es constitutivamente degradada en el citoplasma, debido a la fosforilación que sufre y que la marca para su procesamiento en el proteasoma (Figura 7). Las proteínas cinasas que participan en este proceso de fosforilación son GSK3 $\beta$  y CK1 $\alpha$ . El proceso secuencial de fosforilación se inicia por CK1 $\alpha$  en la Ser45 de  $\beta$ -catenina, y continúa a través de sucesivas fosforilaciones por GSK3 $\beta$  en los residuos Thr41, Ser37 y Ser33 en sentido carboxi-amino terminal. La fosforilación en serina 33 y 37 crea un sitio de unión para el E3 ubiquitina ligasa b-Trcp, que conduce a la degradación y ubiquitinación {Liu, 2002 #3581; Amit, 2002 #4033}. Axina y Dsh son esenciales para la fosforilación inicial de  $\beta$ -catenina en Ser45. Otras proteínas pueden modificar los niveles citosólicos de  $\beta$ -catenina modificando el complejo de degradación, como es el caso de APC, protein fosfatasa o AKT.

En el complejo de degradación interviene también una fosfatasa que defosforila los componentes de dicho complejo. La proteína fosfatasa 2A (PP2A) defosforila a Dsh {Yokoyama, 2007 #4050} axina y APC, actuando en este caso como reguladora positiva al desestabilizarse el complejo de degradación {Ikeda, 2000 #4057}.

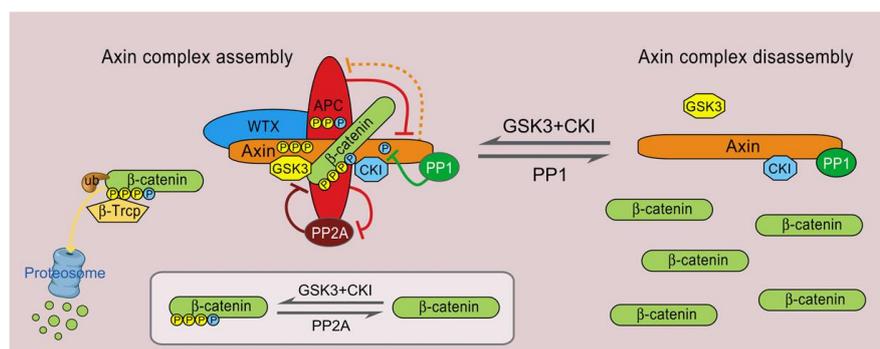


Figura 7: Regulación del complejo de ensamblaje Axin para la degradación de  $\beta$ -catenina. Los componentes básicos del complejo Axin--Axin, APC, GSK3 $\beta$  y CK1 — promueven de manera colectiva la fosforilación de  $\beta$ -catenina para la degradación mediante b-Trcp. Además de fosforilar  $\beta$ -catenina, GSK3 $\beta$  (en amarillo) y CK1 (en azul) también fosforilan Axin y APC mejorando la unión a  $\beta$ -catenina y la degradación del complejo, asegurando mayor fosforilación de  $\beta$ -catenina. El recuadro ilustra la fosforilación de la  $\beta$ -catenina (por CK1 y GSK3 $\beta$ ) y defosforilación (por PP2A). APC también puede actuar para prevenir la defosforilación PP2A de  $\beta$ -catenina. APC facilita paradójicamente la degradación de Axin y vice versa (indicado por la línea punteada, véase el texto). PP1 defosforila Axin para antagonizar la fosforilación CK1 y regula negativamente la unión Axin GSK3 $\beta$ , resultando en el desmontaje del complejo.

La  $\beta$ -catenina fosforilada se libera del "complejo de destrucción", es reconocida por  $\beta$ -TrCP presente en la maquinaria de ubiquitinación y se liga al complejo Skp1/Cul1/Fbox/b-TrCP (SCFb-TrCP) E3 ubiquitina ligasa, donde  $\beta$ -catenina es degradada por el proteosoma 26S {Taliaz, 2011 #4058}.

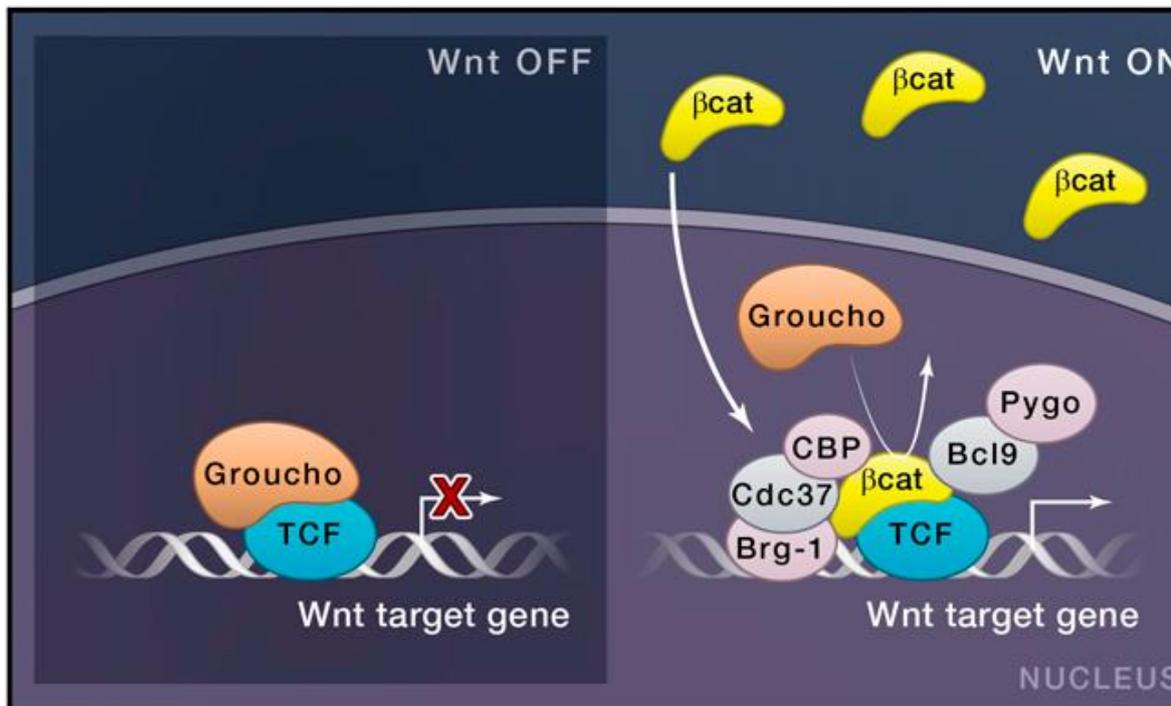


Figura 7: Señalización de Wnt en el núcleo. En ausencia de señal de Wnt, TCF ocupa y reprime sus genes diana, ayudado por el co represor transcripcional Groucho. Con la señalización de Wnt,  $\beta$ -catenina reemplaza a Groucho en su posición con respecto a TCF y recluta coactivadores transcripcionales y modificadores de las histonas como Brg1, CBP, Cdc47, Bcl9, y Pygopus orientando la expresión génica. Tomado de {Clevers, 2012 #4143}

#### 4.3.2.2.2. Translocación al núcleo de $\beta$ -catenina

Aunque  $\beta$ -catenina carece de cualquier señal de localización nuclear (NLS) o de exportación nuclear (NES) en su secuencia,  $\beta$ -catenina presenta diferentes mecanismos de translocación al núcleo. Uno de ellos es la interacción del C-terminal de  $\beta$ -catenina con complejos de los poros nucleares (NPCs) que median la importación y exportación de  $\beta$ -catenina nuclear {Wesolowska, 2008 #4116}

Una vez que  $\beta$ -catenina alcanza el núcleo puede activar la transcripción génica de sus genes diana. Entre los principales genes diana destacan ciclina D1, c-MYC y MMP-7 (Matrix Metalloproteinase 7) entre otros (Tabla 6). La lista al completo puede consultarse en <http://www-eland.stanford.edu/~rnusse/WNTwindow.html>.

En el núcleo,  $\beta$ -catenina no se une directamente a la hebra de ADN, sino que lo hace a través de los factores transcripcionales LEF/TCF (*Lymphocyte enhancer factor-1/ T-Cell Factor*). En el estado Wnt "apagado" TCFs interactúan con represores transcripcionales de Groucho previniendo de este modo la transcripción génica (Figura 9); {Cavallo, 1998 #4117}; {Roose, 1998 #4118}. En el estado "encendido" la asociación de Wnt con  $\beta$ -catenina convierte a TCF transitoriamente en un activador transcripcional de genes diana, con la modulación adicional de la fosforilación de TCF. {Hikasa, 2010 #4119; Lee, 2009 #4120}

#### 4.3.2.3 Axina

Axina es una proteína de anclaje del complejo de degradación de  $\beta$ -catenina. Su fosforilación es esencial para su estabilidad, siendo GSK3 $\beta$  responsable de dicha fosforilación. En humanos se conocen dos genes *Axina1* y *Axina 2* o *conductina* (Figura 8), que a su vez es un gen diana de la propia vía WNT. Axina1 es un componente constitutivo del complejo de degradación de  $\beta$ -catenina, ejerciendo un papel de regulador negativo de la vía al mantener los niveles de  $\beta$ -catenina bajos en el citoplasma. Axina2 es un elemento de expresión inducible con un papel inhibitorio por retroalimentación {Lustig, 2002 #4098}. Por otro lado, axina es capaz de moverse entre el núcleo y el citoplasma gracias a sus secuencias NES y NLS (*Nuclear Export Signal* y *Nuclear Localization Signal*) pudiendo regular la localización celular de  $\beta$ -catenina junto a APC, aunque dados los bajos niveles de axina, la acumulación de  $\beta$ -catenina, puede llegar a sobrepasar los límites de regulación de axina {Cong, 2004 #4106}.

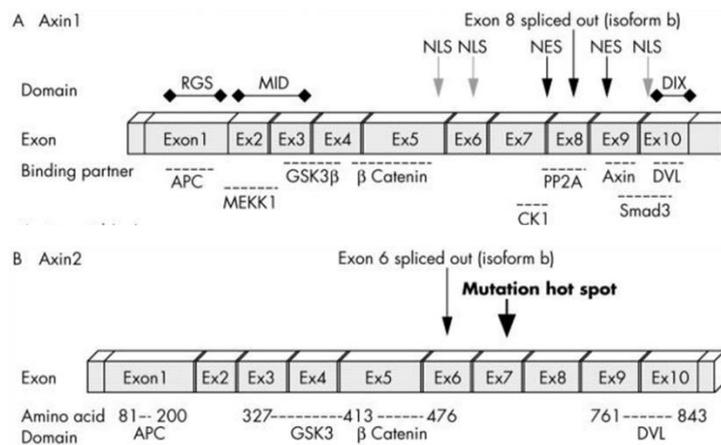


Figura 8: Estructura Genómica de Axin. (A) Axin1 está compuesto de 10 exones. (B) Axin2 se compone de 10 exones que codifican para 843 amino ácidos (aa). De la misma manera que con Axin1, las uniones de Axin2 son APC (aa 81–200), GSK3 $\beta$  (aa 372–413),  $\beta$  catenin (aa 414–476), y Dsh (aa 761–843). Hasta el momento todas las mutaciones encontradas en Axin2 están localizadas en el exón 7. APC, adenomatous polyposis coli; CKI, casein kinase I; DVL, Dishevelled; GSK3, glycogen synthase kinase 3; MEKK1, mitogen activated protein/extracellular regulated kinase kinase kinase 1; NES, nuclear export signal; NLS, nuclear localisation signal; PP2A, protein phosphatase.

Axin actúa como regulador negativo dentro de la vía de señalización de Wnt mediante la reducción de la cantidad de  $\beta$ -catenina disponible para la activación transcripcional {Sakanaka, 1998 #4107}. En ausencia de señal de Wnt se produce la fosforilación de Axin mediada por GSK3 $\beta$  y el enlace a APC y  $\beta$ -catenina. La activación de la señal de Wnt es transducida por la proteína citoplásmica Dishevelled (Dvl) {Li, 1999 #3897}. Dvl forma un complejo con Axin {Fagotto, 1999 #4108} e induce su desfosforilación. Esto reduce la capacidad de Axin para formar complejos con APC y  $\beta$ -catenina, dando como resultado la acumulación de  $\beta$ -catenina y su activación transcripcional. La modulación de este efecto vía arriba es debido a la presencia de un sitio de unión PP<sub>2A</sub> en Axin {Hsu, 1999 #4109}. El complejo Axin PP<sub>2A</sub> muestra APC desfosforilado en sitios previamente fosforilados por GSK3 $\beta$  y reducción del nivel de  $\beta$ -catenina {Ikeda, 2000 #4057}.

Tabla 6: Genes diana de  $\beta$ -catenina, se definen como genes blanco o diana, a aquellos genes con sitios de unión a Tcf que para los que esta unión es importante.

Gen	organismo	Directo	Via	Referencia
c-myc	humano cancer de colon	si	arriba	He 1998
Cyclin D	humano cancer de colon	si	arriba	Tetsu 1999
Tcf-1	humano cancer de colon	si	arriba	Roose 1999
LEF1	humano cancer de colon	si	arriba	Hovanes, 2001
PPARdelta	humano cancer de colon	si	arriba	He TC, et al 1999
c-jun	humano cancer de colon	si	arriba	Mann B, 1999
fra-1	humano cancer de colon	si	arriba	Mann B, 1999
MMP-7	humano cancer de colon	si	arriba	Crawford 1999
Axin-2	humano cancer de colon	si	arriba	Yan, 2001; Lustig, 2002; Jho, 2002
Nr-CAM	humano cancer de colon	si	arriba	Conacci-Sorell 2002
ITF-2	humano cancer de colon	si	arriba	Kolligs, 2002
BMP4	humano cancer de colon	?	arriba	Kim 2002
claudin-1	humano cancer de colon	si	arriba	Miwa 2002
VEGF	humano cancer de colon	si	arriba	Zhang, 2001
FGF18	humano cancer de colon	si	arriba	Shimokawa 2003
Met	humano cancer de colon		arriba	Boon 2002
endothelin-1	humano cancer de colon		arriba	Kim 2004
c-myc binding protein	humano cancer de colon	si	arriba	Jung 2005
L1 neural adhesion	humano cancer de colon		arriba	Gavert 2005
Id2	humano cancer de colon	si	arriba	Rockman 2001
Jagged	humano cancer de colon		arriba	Rodilla, 2009
Nitric Oxide Synthase 2	células Hepg2		arriba	Du, 2006
Dickkopf	células tumorales		arriba	Chamoro 2004
FGF9	adenocarcinoma ovarico		arriba	Hendrix, 2006
FGF20	células tumorales			Chamoro 2004
LGR5/GPR49	Intestino	si	arriba	Barker, 2007
Sox9	Intestino		arriba	Blache 2004
Sox9	mesenquima		abajo	Hill, 2005; Day 2005; Yano, 2005
Sox17	tumores		arriba	Du, 2009
Runx2	condrocitos		arriba	Dong 2006
Gremlin	fibroblastos		arriba	Klapholz-Brown 2007
RANK ligand	Osteoblastos		abajo	Spencer 2006
CCN1/Cyr61	Osteoblastos		arriba	Si, 2006
Sox2	Xenopus retina		arriba	Van Raay, 2005
Delta-like 1	somitas			Galceran, 2004; Hofmann 2004
MMP-26	humano			Marchenko 2002
snail	ES/EB		arriba	Ten Berge 2008
Fibronectin	ES/EB		arriba	Ten Berge 2008
Frizzled 7	EC células	si	arriba	Willert 2002
Follistatin	EC células, ovario	si	arriba	Willert 2002
Wnt3a	EC células			Zhang 2009
Fibronectin	raton		arriba	De Langhe 2005
Islet1	células cardiacas		arriba	Lin 2007
MMP2, MMP9	células T			Wu 2007
Siamois	Xenopus	si	arriba	Brannon 1997
fibronectin	Xenopus	si	arriba	Gradl 1999
BMP4	Xenopus	?	abajo	Baker 1999
engrailed-2	Xenopus	si	arriba	McGrew 1999
Xnr3	Xenopus	si	arriba	McKendry 1997
connexin43	Xenopus, raton	si	arriba	van der Heyden 1999
twin	Xenopus	si	arriba	Laurent 1997
connexin 30	Xenopus	?		McGrew 1999
retinoic acid receptor	Xenopus	?		McGrew 1999
dharma/bozozok	Zebrafish	si	arriba	Ryu 2001
MITF/nacre	Zebrafish	si	arriba	2002
Brachyury	raton (Wnt-3A)	si	arriba	Yamaguchi 1999; Arnold 2000
Proglucagon	raton	?	arriba	Ni 2003
Osteocalcin	raton	si	abajo	Kahler 2003
Cdx1	raton embrio			Pilon 2007
cyclooxygenase-2	raton (Wnt-1)	?	arriba	Howe 1999; Haertel-Wiesmann 2000
Irx3 and Six3	raton brain			Braun 2003
neurogenin 1	raton brain	si	arriba	Hirabayashi 2004
SP5	raton brain	si	arriba	Weidinger 2005
NeuroD1	raton Brain	si	arriba	Kuwabara 2009
Nkx2.2	Tube neural	si	abajo	Lei, 2006
Gbx2	Cresta neural	si	arriba	Li, 2009
Â periostin	raton Wnt-3		abajo	Haertel-Wiesmann 2000
Cdx1	raton Wnt-3A	si	arriba	Lickert 2000
Cdx4	raton Wnt-3A			Pilon, 2006
E-cadherin	ES/EB		abajo	Ten Berge 2008
Keratin	raton hair follicle	si	arriba	Dasgarrbata 1999
movo1	raton hair follicle	si	arriba	Li, 2002
Jagged1	raton hair follicle		arriba	Estrach, 2006
P16ink4A	Melanocytes	si	abajo	Delmas, 2007
CTLA-4	Melanoma	si	arriba	Shah 2008
Â mBTEB2	raton		arriba	Ziemer 2001
versican	células vasculares	si	arriba	Rahmani 2005
Tnfrsf19	mesodermo somitico	si	arriba	Buttitta 2003
Ubx	Drosophila	si	arriba o	Riese 1997
wingless	Drosophila	?	arriba o	Yu 1998
Â Dpp	Drosophila	si	abajo	Yang, 2000
Engrailed	Drosophila	?	arriba	Hooper 1994
Dfrizzled2	Drosophila	?	abajo	Cadigan 1998
shavenbaby	Drosophila	?	abajo	Payre 1999
stripe	Drosophila	si	abajo	Piepenburg 2000
Nemo	Drosophila		arriba	Zeng, 2004

#### 4.3.2.4. Casein kinase 1a (CK1a)

CK1 es una de las cinasa responsable de la fosforilación de  $\beta$ -catenina. CK1 constituye una familia de serina/treonina cinasas monoméricas presentes en células eucariotas. En mamíferos se han descrito hasta 7 componentes:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , cuyos dominios cinasa comparten una identidad de entre el 53 y el 98%. El sitio de fosforilación es pS/T-X-X-X-(S/T), siendo este último residuo el punto diana de fosforilación. Cada una de las isoformas tiene diferentes proteínas diana, y por tanto, diferentes efectos. En la vía WNT, CK1 $\epsilon$  es un regulador positivo mientras que CK1 $\alpha$  actúa como regulador negativo. Sin embargo, existen datos de que otras isoformas puedan participar en la fosforilación de  $\beta$ -catenina. Así se ha descrito que tanto CK1 $\alpha$ , como las isoformas  $\epsilon$  y  $\delta$  pueden fosforilar  $\beta$ -catenina en presencia de axina {Amit, 2002 #4033}. Por otra parte, CK1 $\epsilon$  puede fosforilar APC (regulando negativamente de la vía, {Rubinfeld, 2001 #2562}) y Dsh con un incremento de la señalización por  $\beta$ -catenina {Hino, 2003 #2563}; {Bryja, 2007 #2564}. Finalmente CK1  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  pueden fosforilar al correceptor LRP6, favoreciendo así la activación de la vía {Zeng, 2005 #2565}.

#### 4.3.2.5. Glycogen synthase kinase (GSK3)

GSK-3 (Glycogen synthase kinase) es una serina/treonina cinasa identificada en 1980 por Embi [95]. En mamíferos se encuentran dos isoformas GSK-3,  $\alpha$  (51 kDa) y  $\beta$  (47 kDa), las cuales están codificadas por genes diferentes conocidos como *gsk3 $\alpha$*  y *gsk3 $\beta$*  respectivamente. Ambas isoformas se expresan de manera ubicua y funcionalmente redundante en diversas vías de señalización incluyendo la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina {Watts, 2005 #4110}.

GSK-3 $\beta$  es uno de los moduladores negativos más importantes de la señalización mediada por Wnt, y junto con  $\beta$ -catenina, es fosforilado por numerosos factores de transcripción {Vidal, 2010 #3779}, factor de activación nuclear de células T (NFAT) {Zhang, 2009 #3770}, neurogenina 2 {Mato, 2010 #3738}, Smad1 {Nestler, 1989 #3780}, y c-Jun {Alfonso, 2006 #3786}, todos ellos juegan un papel importante en la expresión génica, plasticidad neuronal y supervivencia celular {Morley-Fletcher, 2011 #3787}. GSK-3 $\beta$  produce además la inhibición de cAMP en respuesta a la unión a CREB {Dowlatshahi, 1998 #3795}. Además de la expresión génica, GSK-3 $\beta$  está implicada en la morfogénesis celular a través de la regulación de la actividad de varias proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) {Dowlatshahi, 1999 #3788}.

Las cinasas GSK-3 son constitutivamente activas, su actividad es regulada por el estado de fosforilación de residuos de serina y tirosina {Vidal, 2009 #3775}. La actividad disminuye con la fosforilación de Ser9 y aumenta por la fosforilación de Tyr216. La regulación de GSK-3 $\beta$  por elementos de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina actúa principalmente a través de dos mecanismos diferentes. Uno es el modelo de inhibición directa en el cual LRP5/6 inhibe GSK-3 $\beta$  vía interacción proteína-proteína secuestrando su sustrato sin afectar la actividad cinasa per se {Yamada, 2003 #3790}. El otro mecanismo regulador importante es el mediado por la inhibición de GSK-3 $\beta$  que conduce a la desestabilización y degradación de Axin y resultando en estabilización de  $\beta$ -catenina {Odagaki, 2001 #3789}. Además, avances recientes indican que GSK-3 $\beta$  también desempeña un papel positivo en la transducción de señales Wnt por fosforilación del receptor LRP5/6 {Yamada, 2003 #3790}. La actividad de GSK-3 $\beta$  es regulada también mediante Akt, que es activado por diferentes moléculas conocidas como PI3K y proteínas G, produciendo la inactivación de GSK-3 $\beta$  por fosforilación del residuo de serina en el dominio Nt {Laifenfeld, 2005 #3791}.

#### 4.3.2.6. APC

La proteína Adenomatous polyposis coli (APC) es un regulador negativo que controla la concentración de  $\beta$ -catenina. APC es una proteína con múltiples dominios, codificada en el cromosoma 5q21-22, capaz de interactuar con moléculas tan diversas como los componentes de la vía WNT, microtúbulos, reguladores del citoesqueleto (EB1 y IQGAP1) o Asef1 (factor intercambiador de nucleótidos de guanina). APC es parte integral del mecanismo de señalización de Wnt, pero también juega un papel de interés en la adhesión celular, estabilidad microtubular del citoesqueleto, regulación del ciclo celular y posiblemente en la apoptosis. Además de con  $\beta$ -catenina, APC interactúa y es fosforilada por GSK3 $\beta$  en su región central, lo que a su vez permite una mejor unión de APC a  $\beta$ -catenina {Fearnhead, 2001 #4111}. Para la regulación de  $\beta$ -catenina,

APC construye un complejo con GSK-3 $\beta$  y Axin. Este complejo es capaz de unir  $\beta$  catenina en el citoplasma que se fosforila por CK1 y GSK-3 $\beta$  etiquetando  $\beta$ -catenina para su degradación. Axin parece actuar como proteína de andamiaje en la formación de un complejo de multiproteínas con APC  $\beta$ -catenina, para luego facilitar la fosforilación de APC {Hart, 1998 #4112} y  $\beta$ -catenina {Ikeda, 1998 #4113} por GSK3 $\beta$ . La fosforilación de APC resulta en la unión de  $\beta$ -catenina {Rubinfeld, 1996 #4114} y resultando en el aumento de APC mediado por la fosforilación de GSK3 $\beta$  y la subsecuente degradación de  $\beta$ -catenina {Kawahara, 2000 #4115}

#### 4.3.2.7. Papel de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la neurogénesis y la plasticidad

En el cerebro adulto la vía de señalización canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina modula el funcionamiento neuronal, la neurogenesis, tanto en el hipocampo {Lie, 2005 #2318;Wexler, 2009 #3574} como en la zona subventricular {Adachi, 2007 #3575} y la plasticidad sináptica. Su papel en la conservación de células madre, la maduración neuronal, la remodelación axonal, la morfogénesis dendrítica y la homeostasis del tejido adulto está bien descrito {Hussaini, 2014 #4156}.

En animales, los miembros de la vía canónica de Wnt, Wnt3,  $\beta$ -catenina, GSK3 $\beta$ , sFRP3 (secreted frizzled related protein 3) y Dickkopf 1, están involucrados en el desarrollo de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo {Jang, 2013 #4176;Lie, 2005 #2318;Llorens-Martin, 2013 #4182;Qu, 2010 #4184}.

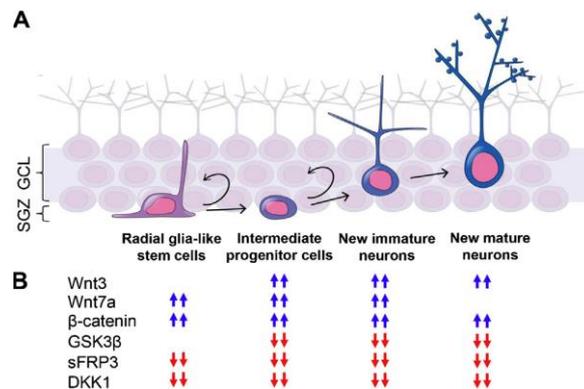


Figura 9: Resumen del papel de la señalización de Wnt en la neurogénesis hipocampal adulta. (A) un diagrama esquemático de la neurogénesis hipocampal adulta a través de la zona subgranular (SGZ) y la capa de células granulares (GCL) del giro dentado. Una célula precursora activada pasa por distintas fases como diferenciación e integración a un circuito de morfología compleja. (B) el efecto de los distintos componentes de la vía de señalización canónica de Wnt se muestran a través de las diferentes etapas de la neurogénesis. Tomado de {Hussaini, 2014 #4156}

En la última década se ha dilucidado el papel de la vía Wnt en la mediación de los distintos pasos de la neurogénesis hipocampal adulta: autorrenovación, proliferación, diferenciación, maduración e integración neuronal {Qu, 2010 #4184}. La transición entre la diferenciación del linaje y la auto renovación podría estar coordinada por la señalización Wnt a través de la activación de NeuroD1 {Kuwabara, 2009 #4185;Liu, 2000 #4186}. Se ha demostrado que GSK3 $\beta$  estaría involucrado en la mediación de la supervivencia y la apoptosis de precursores inmaduros {Fuster-Matanzo, 2013 #4187} {Sirerol-Piquer, 2011 #4189}. Tanto  $\beta$ -catenina como GSK3 $\beta$  participarían en el desarrollo dendrítico en neuronas adultas en vivo {Gao, 2007 #4188;Sirerol-Piquer, 2011 #4189}. GSK-3 $\beta$  podría regular la neurogénesis controlando los niveles de reguladores transcripcionales involucrados en este proceso como  $\beta$ -catenina en la vía de Wnt {Dwivedi, 2006 #4190}, Gli en la vía Shh {Dwivedi, 2006 #4190;Chen, 1999 #4191}, c-Myc en FGF {Gould, 2004 #4192} y la vía de señalización de Notch {Li, 2004 #4194}. Además, la inhibición de GSK-3 $\beta$  refuerza la supervivencia de NPCs de condiciones apoptóticas {Beaulieu, 2008 #4195}, neutralizando la eliminación mediada por apoptosis de NPCs permitiéndoles de este modo madurar y diferenciarse {Kaidanovich-Beilin, 2004 #4196}

Los integrantes de la vía de señalización de Wnt se expresan en el giro dentado del hipocampo adulto liberándose a partir de células madre neuronales y astrocitos, actuando de manera autócrina

para regular la proliferación. {Lie, 2005 #2318;Wexler, 2009 #3574}. La regulación de la expresión de Wnt se acompaña de un cambio aparente en la neurogénesis, sugiriendo que la señalización vía Wnt es uno de los principales reguladores de la neurogénesis hipocampal adulta {Lie, 2005 #2318}. En la Figura 10 se muestra un resumen de la participación de los componentes de la vía Wnt a través de cada etapa de la neurogénesis en el hipocampo adulto

#### **4.3.2.8. Papel de la vía Wnt / $\beta$ -catenina en la etiopatogenia de la depresión**

En estudios recientes tanto post-mortem como farmacológicos, se ha descrito que, la disfunción de componentes de la vía Wnt estaría involucrado en trastornos psiquiátricos como la depresión, la esquizofrenia, el trastorno bipolar, el autismo y la Enfermedad de Alzheimer {Hussaini, 2014 #4156}. Se han identificado varios componentes de la vía Wnt incluyendo GSK3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina como biomarcadores de salud neuropsiquiátrica.

Muestras de cerebro humano postmortem de suicidas diagnosticados de depresión presentan disregulación en la vía Wnt con disminución en la expresión  $\beta$ -catenina y un incremento en la actividad de GSK3 $\beta$  en PFCx {Karege, 2012 #4197}, aumentando del RNAm de  $\beta$ -catenina en el hipocampo {Oh, 2010 #4198}; {Karege, 2012 #4197}. La condición de suicida no modifica la expresión de  $\beta$ -catenina en depresión mayor {Choi, 2009 #4199}.

En modelos animales de depresión, se ha observado una disminución en la expresión de  $\beta$ -catenina {Son, 2012 #4232;Alme, 2007 #4233;Egan, 2003 #4234} (Tabla 7), en hipocampo {Benedetti, 2004 #4358} y en PFCx medial (mPFCx) {Sen, 2003 #4368} en modelos animales sometidos a estrés crónico.

Estudios recientes indican que la disminución de la fosforilación GSK3 $\beta$  se asocia con modelos animales de depresión {Benedetti, 2004 #4358}. Ratones knockout para  $\beta$ -catenina poseen un 50-70% disminuida la expresión de la proteína en regiones del cerebro anterior. En cambio, otros modelos animales de depresión, tales como de lesión cerebral traumática leve (mTBI), muestran una inhibición de GSK3 $\beta$ , y por consiguiente un aumento en los niveles de  $\beta$ -catenina en hipocampo {Yu, 2012 #4370}. Esta inhibición de GSK3 $\beta$  está mediada por la activación de la PKB y se asocia con una acción anti-apoptótica y neuroprotectora {Yu, 2012 #4370}, debido a la activación de vías de señalización relacionadas con la supervivencia celular y la expresión de factores neurotróficos, angiogénicos, y de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, etc. {Kocabas, 2011 #4371}.

La inhibición de la actividad de GSK3 $\beta$ , tanto farmacológica {Beaulieu, 2008 #4195;O'Brien, 2004 #4372}, como génica, resulta en un aumento en los niveles de  $\beta$ -catenina en cerebro, así como un efecto antidepressivo y/o una disminución de la ansiedad {Latapy, 2012 #4373}, según lo observado por la sobreexpresión directa de  $\beta$ -catenina en cerebro de ratón {Gould, 2007 #4202}. La inhibición de GSK3 $\beta$  por litio, un estabilizador del ánimo y regulador de la supervivencia celular {Jope, 2002 #3905}, muestra eficacia de antidepressiva {Gould, 2004 #4192;Kaidanovich-Beilin, 2004 #3485;Jope, 2002 #3905;Klein, 1996 #3491;Wada, 2005 #3504}. La inhibición de GSK-3 $\beta$  por L803-mts revierte el comportamiento depresivo-like en animales, aumentando la expresión de  $\beta$ -catenina {Yu, 2012 #4370}. En contraste, ratones knock-in para GSK3 $\beta$  muestran altos niveles de  $\beta$ -catenina, una mayor susceptibilidad al estrés y una disminución de la proliferación celular en la zona subgranular del giro dentado {Polter, 2010 #4374}. Este efecto se acompaña de una reducción de los niveles de VEGF, pero no así de BDNF y de un descenso en la respuesta al tratamiento con ADs {Eom, 2009 #4375}. Además, variaciones de SNP en la región promotora de GSK-3 $\beta$  desempeñan un papel protector en la aparición de la depresión, enfermedad bipolar {Benedetti, 2004 #4358} y en una mayor respuesta antidepressiva {Benedetti, 2012 #4200} (ver apartado 4.3.2.8.6)

La activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina se relaciona con señales de pro-supervivencia que pueden ser la base de esta respuesta {Bremner, 2000 #4376;Palmer, 2000 #3226}. Cultivos de células precursoras neuronales provenientes del giro dentado de ratas adultas tratadas con dexametasona (DEX), agonista del receptor de glucocorticoide (GR), muestran una reducción de la proliferación celular que se correlaciona con una reducción en la expresión de  $\beta$ -catenina y mRNA nuclear de ciclina D1 {Alme, 2007 #4233}. Este resultado sugiere que GRs median reducción en la proliferación celular asociada a modelos de estrés, actuando a través de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, disminuyendo la fosforilación de GSK-3 $\beta$ , y así, promoviendo su estado activo, que resulta en un

desplazamiento reducido de  $\beta$ -catenina al núcleo {Ueda, 2005 #3203}. De lo contrario, la inhibición de la vía de señalización de Wnt en animales sometidos a estrés crónico, o después de la administración de corticosterona en cultivos organotípicos, puede estar mediada por el aumento de los inhibidores de Wnt/ $\beta$ -catenina Dickkopf:1 (Dkk-1) {Heine, 2005 #4377}. DKK-1 es un péptido que se une a LRP5/6 y a las proteínas transmembrana Kremen-1 y -2, formando un complejo ternario que es internalizado, bloqueando la cascada de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina {Kiuchi, 2012 #3717}.

Tabla 7. Implicación de la señalización de las vías Wnt/ $\beta$ -catenina en conductas depresivas-like y MDD

	ANIMAL						
	MODELO DE ESTRÉS	DURACION	ESTRUCT.	PROLIF.	Wnt/ $\beta$ -catenina	FACTOR	Referencia
FENOTIPO DEPRESIVO-LIKE	CUS	Cronica	Hp	↓BrdU	↓p-GSK-3 $\beta$ /↓ $\beta$ -catenina		Liu,Dang et al. 2012
	CUS	Cronica	Hp	↓BrdU	↓p-GSK-3 $\beta$ Ser9/↓ $\beta$ -catenina/↑p-GSK-3 $\beta$ Ser216		Garza, Guo et al. 2012
	Dexametasona 10 $\mu$ M	20min	Hp(cp)				
	CMS	Cronica	Hp	↓BrdU	↓Longitud dendrítica	↓BDNF	Blugeot, Rivat et al. 2011
	Estrés cronico	Cronica	Hp	↓BrdU	KK1, ↓DCX, ↓Longitud dendrítica		Matriciano, Busceti et al. 2011
	Corticosterona	24hs	Hp (co)		↑DKK1		
HUMANO	MODELO GENETICO	FENOTIPO	ESTRUCT.	PROLIF.	Wnt/ $\beta$ -catenina	AUTORES	
	$\beta$ -catenina KO	Depresivo-like	Procenséfalo células		↓ $\beta$ -catenina	Gao, Arlotta et al. 2007	
	$\beta$ -catenina KO	Depresivo-like	inmaduras de hp		↓Longitud de dendritas/↓ $\beta$ -catenina	Gould, O'Donnell et al. 2008	
	PATOLOGIA	ESTRUCT.	PROLIF.	Wnt/ $\beta$ -catenina	AUTORES		
	MDD y MDD+suicidio	PFCx		↓p-GSK-3 $\beta$ /↓ $\beta$ -catenina	Karege, Perroud et al. 2007		
	MDD	PFCx		↓mTOR/↓p7086k/↓eIF4B/↓p-eIF4B	Jernigan, Goswami et al. 2011		
MDD			Sin cambios en p-GsK3 $\beta$ / $\beta$ -catenina/Dv1	Lamont, Stanwell et al.2005			
Esquizofrénicos					Howell, Kutiyawalla et al. 2008		
Esquizofrénicos	PFCx			↓Flk1	2008		

CUS: estrés crónico impredecible; CMS: estrés crónico leve; Hp: hipocampo; PFCx: cortex prefrontal; BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina; ESTRUCT: estructura cerebral; PROLIF: proliferación; PLD1: fosfolipasa D1; Hp(cp): celulas progenitoras del hipocampo; Hp (co): Cultivo organotípico proveniente de hipocampo.

#### 4.3.2.9. Papel de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en el mecanismo de acción de los fármacos ADs

Evidencias clínicas y preclínicas sugieren, que componentes de la vía de señalización de Wnt podrían ser objetivos potenciales para el tratamiento eficaz de la depresión. Los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a la eficacia del tratamiento antidepresivo todavía permanecen en gran parte confusos, la identificación de nuevas dianas para el tratamiento de la depresión es un importante reto en la actualidad.

GSK-3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina son reguladas directa o indirectamente por litio, valproato, ADs y antipsicóticos {Pascual-Brazo, 2012 #2462;Mostany, 2008 #2461;Liu, 2012 #4378;Beaulieu, 2008 #4195} (Tabla 8). En el hipocampo, la terapia electroconvulsiva o el tratamiento del litio están fuertemente ligados a inhibición de GSK3 $\beta$  y sobrerregulación de  $\beta$ -catenina, la supresión de los efectos proliferativos del litio conlleva inhibición de  $\beta$ -catenina, sugiriendo una correlación entre la vía de Wnt y el efecto terapéutico del litio {Wexler, 2008 #4380}.

La vía Wnt/ $\beta$ -catenina es activada por ADs clásicos como citalopram {Liu, 2012 #4378}, fluoxetina {Mostany, 2008 #2461}, venlafaxina {Mostany, 2008 #2461}, y el agonista parcial 5-HT<sub>4</sub> {Pascual-Brazo, 2012 #2462}. Los ADs aumentan  $\beta$ -catenina tanto la proteína como el ARNm en la zona subgranular (SGZ), el giro dentado (GD) y en el hipocampo, y tanto en la fracción de membrana como en la nuclear {Mostany, 2008 #2461;Madsen, 2003 #3430}. El aumento de la proliferación observada en la SGZ después del tratamiento antidepresivo crónico se localiza en grupos de células que también muestran marcaje positivo para  $\beta$ -catenina {Pascual-Brazo, 2012

#2462;Mostany, 2008 #2461}. El aumento de  $\beta$ -catenina en el hipocampo, se correlaciona con la activación de la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina, y se asocia a un aumento en la proliferación celular hipocampal {Mostany, 2008 #2461;Pascual-Brazo, 2012 #2462;Garza, 2012 #4386}. Las células con marcaje positivo para  $\beta$ -catenina se localizan agrupadas en la SGZ del giro dentado del hipocampo {Madsen, 2003 #3430;Mostany, 2008 #2461;Pascual-Brazo, 2012 #2462}. Tanto en ANPs como en neuroblastos tipo 1 (NB1) {Pascual-Brazo, 2012 #2462}, poblaciones de células que se multiplican también bajo tratamiento con ADs {Pascual-Brazo, 2012 #2462;Encinas, 2006 #2544}.

Tabla 8 Cambios en la vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina asociados a tratamientos antidepresivos

Fármaco	Duración del tratamiento	Estructura	Proliferación	Mensajeros Secundarios	Factores troficos	Referencia
Agonista 5-HT <sub>4</sub>	3 o 7 días	Hp	↑BrdU	↑ Akt/↑ $\beta$ -catenina	↑ BDNF/ ↑VEGF	Lucas, Rymar et al. 2007 Tamburella, Micale et al. 2009 Pascual-Brazo, Castro et al. 2012
Venlafaxina	14/21 días	Hp	↑BrdU	↑ Wnt2/↑p-GSK-3 $\beta$ / ↑ $\beta$ -catenina/ ↑Akt/↑ ERK/ ↑ NeuroD1		Mostany, Valdizan et al. 2008 Okamoto, Voleti et al. 2010
Fluoxetina	21 días	Hp		↑ Wnt2/↑p-GSK-3 $\beta$ /↑Akt/↑ NeuroD1		Okamoto, Voleti et al. 2010
	14 días	Hp	↑BrdU			
Leptina	20 min	Cultivo primario Hp		↑ $\beta$ -catenina/↑p-GSK-3 $\beta$ Ser9/↓ p-GSK-3 $\beta$ Ser216		Garza, Guo et al. 2012
Citalopram	14/21 días	Hp		↑ Wnt2/↑p-GSK-3 $\beta$ /↑ $\beta$ -catenina/↑ NeuroD1		Benedetti, Senetti et al. 2004 Okamoto, Voleti et al. 2010
Litio	48 hs	Cultivo primario Hp	↑BrdU			Wexler, Geschwind et al. 2008
Litio + Desipramina	21 días	Hp	↑BrdU	Sin cambios en p-GSK-3 $\alpha$ y p-GSK-3 $\beta$	↓BDNF	O'Leary, Zandy et al. 2013
Fluoxetina + Ketanserina	7 días	Hp		↑ $\beta$ -catenina/↑N-caderina	↑ BDNF	Pilar-Cuellar, Vidal et al. 2012
Clozapina/Haloperidol	14 días			↑p-GSK-3 $\beta$ /↑ $\beta$ -catenina/↑Akt		
Litio/Ac.Valproico	30 días	PFCx		↑p-GSK-3 $\beta$ /↑Akt		Sutton and Rushlow. 2010
Fluoxetina/Imipramina	14 días			↑p-GSK-3 $\beta$ /↑Akt		
Modelo Genético	Fenotipo	Estructura	Proliferación	Mensajeros Secundarios	Factores troficos	Referencia
Sobreexpresión de $\beta$ -catenina	Antidepresivo-like	Cerebro		↑ $\beta$ -catenina		Gould, Eimat et al. 2007
Actividad constitutiva de $\beta$ -catenina		Cultivo primario Hp	↑BrdU			Wexler, Geschwind et al. 2008

Hp: Hipocampo; PFCx: Cortex prefrontal; BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

En otras áreas del cerebro (PFCx, estriado), el tratamiento crónico con fármacos ADs como la imipramina, ADs tricíclicos o los ISRS como fluoxetina, no conducen a cambios en la expresión de  $\beta$ -catenina, en contraste con lo observado con fármacos antipsicóticos {Yu, 2013 #4381} que la incrementa o la cocaína que la disminuye {Peltier, 2007 #4382}. La expresión de  $\beta$ -catenina en estas áreas muestra un incremento región-específico mediado por catecolaminas e involucrando un efecto antidepresivo. Ratones transgénicos que sobre-expresaban  $\beta$ -catenina en diversas áreas del cerebro como el cerebelo, cuerpo estriado, hipocampo y PFCx demostraron estabilización en el humor efecto similar al observado tras la administración de litio {Gould, 2002 #3739}.

Actualmente, la regulación de la vía de señalización de Wnt, a nivel de GSK3 $\beta$  y del receptor frizzled han sido implicados en las acciones de los ADs {Okamoto, 2010 #4387}. El tratamiento antidepresivo incluyendo ISRS, IRSN crónico pero no el agudo, la terapia electroconvulsiva aumentan la expresión de Wnt2 y Wnt3a en el hipocampo, lo que resulta en una mayor fosforilación de GSK3 $\beta$  {Benedetti, 2012 #4200;Yu, 2013 #4381}. El aumento en la expresión de Wnt3a promueve la neurogénesis hipocampal en adulto {Lie, 2005 #2318}. Por otra parte, la expresión viral de Wnt2 en el hipocampo produce una respuesta antidepresiva {Mathew, 2005 #4383}. Otras proteínas Wnt-Fz, incluyendo Wnt7b, Fz9, FzB, y Dvl, así como el factor de transcripción- 15 (Tcf15), TcfL1, y el factor de unión de proteína linfocitaria 1 (Lef1), están regulados diferencialmente por los ADs {Mathew, 2005 #4383}. (Tabla 8).

Actualmente el efecto antidepresivo de los antagonistas de la vía Wnt como sFRP3 y DKK1 es motivo de estudio. El tratamiento crónico con fluoxetina redujo significativamente la expresión de la proteína sFRP3 en el giro dentado y mejora el comportamiento y el estado de ánimo en ratones {Jang, 2013 #4176}. El antagonista de la vía de Wnt, DKK1, también ha emergido como un actor importante en la mediación del comportamiento depresivo especialmente durante el envejecimiento

#### **4.3.2.10. Implicación de polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) en la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y la depresión**

El trastorno depresivo mayor el trastorno bipolar y las distimias, forma parte del grupo de enfermedades denominadas genéticamente complejas, en las que tanto los factores genéticos como los ambientales juegan un papel fundamental en su etiopatogenia.

El componente genético de estas enfermedades ha sido identificado a partir de estudios de familia, de gemelos o de adopción. Las enfermedades complejas, aunque tienen una base genética, no siguen el patrón clásico de herencia mendeliana.

Se considera que el modelo del *umbral de susceptibilidad* sería uno de los que mejor explicarían la transmisión de estas enfermedades genéticamente complejas. Este modelo asume que la variable “susceptibilidad para desarrollar la enfermedad” se distribuye de forma continua en la población, de tal manera que sólo aquellos individuos que sobrepasen un determinado umbral manifestarán el trastorno. Se hipotetiza que en la base de esta herencia compleja estarían involucrados una serie de genes de efecto menor cuya expresión podría estar modulada por un gran número de factores ambientales.

El análisis de asociación genética representa una alternativa a los estudios de ligamiento (herencia mendeliana) y una de las mejores estrategias para la identificación de genes responsables de enfermedades genéticamente complejas, en las que no existe ningún modelo de herencia conocido, y donde probablemente están involucrados numerosos genes de efecto menor.

El diseño clásico de este tipo de análisis corresponde al de un estudio caso-control en el que se compara la frecuencia de un posible alelo de riesgo de un gen candidato en personas afectadas por una misma enfermedad y no emparentadas (grupo caso), con la frecuencia observada en individuos sanos del mismo grupo étnico (grupo control). Si el factor de riesgo analizado se encuentra con más frecuencia en el grupo de casos que en el de controles, existe una asociación entre el factor y la enfermedad. Es decir, la exposición o presencia a este factor incrementa el riesgo o la susceptibilidad para padecer la enfermedad.

##### **4.3.2.10.1 AKT1**

Aunque AKT1 no forma parte estrictamente de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, es un regulador importante de los niveles celulares de  $\beta$ -catenina, por lo tanto SNP de este gen pueden modular los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina y participar en la etiopatogenia de enfermedades psiquiátricas,

El gen AKT1 fue el primero en asociarse con esquizofrenia Emamian et al (2004), quienes encontraron una asociación entre el SNP rs3730358 y la esquizofrenia. Además, describieron un haplotipo de tres SNP (alelos T-C-G del rs1130214, rs3730358 y rs1130233 respectivamente) que se sobretransmitían en la esquizofrenia. El haplotipo se conforma principalmente por dos alelos: el alelo T en rs1130214 y el alelo A en rs1130233. Estos dos alelos se han asociado con la esquizofrenia en tres estudios diferentes, todos realizados en sujetos con ascendencia europea {Emamian, 2004 #97; Thiselton, 2008 #103}; {Schwab, 2005 #106}.

Otras asociaciones que involucran SNPs y haplotipos de AKT1 han sido descritos en diferentes étnias {Thiselton, 2008 #103; Norton, 2007 #102; Ikeda, 2004 #101; Bajestan, 2006 #99}, aunque no siempre se pudieron replicar los resultados {Ohtsuki, 2004 #4393; Ide, 2006 #4394}

Recientemente, {Thiselton, 2008 #103} se sugirió que el efecto potencial del SNP rs1130214 es debido a su posición en una región promotora susceptible de modificar la expresión del gen. El alelo T se encuentra dentro de un grupo de sitios potencialmente funcionales de unión de STAT3 y

podría abolir una secuencia consenso para un sitio de unión de factor de transcripción, y potencialmente modificar la expresión de AKT1 {Park, 2005 #107}.

No obstante, es intrigante que el alelo T está implicado en dos haplotipos de diferentes direcciones (TCG y TTA). El segundo alelo interesante en el haplotipo TTA es el alelo A (rs1130233), un alelo localizado en el exón 11, que causa una mutación no sinónima en la expresión AKT1. En un estudio reciente, {Tan, 2008 #95} han demostrado que el alelo A se asoció con factores de deterioro cognitivo, reducción de volumen de materia gris, reducción de la expresión de AKT1 en los linfocitos y finalmente con riesgo de esquizofrenia. En sujetos iraníes, el alelo A también estaba presente en el único haplotipo de riesgo significativo {Bajestan, 2006 #99}.

En relación a la depresión, sólo se ha publicado que el alelo A del SNP, rs3730358 se asocia a un debut tardío de la depresión mayor en brasileños {Pereira, 2014 #5384}.

#### 4.3.2.10.2. Axin

Axin1 y su homólogo Axin2 regulan negativamente la vía canónica de Wnt mediante la degradación de  $\beta$ -catenina {Kikuchi, 2000 #1272; Miller, 1999 #1273; Peifer, 2000 #1282}.

Un estudio de genotipado masivo de polimorfismos de nucleótido único tanto de Axin1 como de Axin2 en depresión mayor se ha realizado por el Consorcio Psiquiátrico GWAS (PGC) reunificando 9 estudios GWAS. La muestra total incluyó 9.240 casos de depresión y 9.519 controles todos de ascendencia europea con datos sobre  $\sim 1.2$ M SNPs, sin observarse una asociación estadísticamente significativa {Ripke, 2013 #1570}.

#### **Axin1-rs214250-**

Debido a la importancia que la activación de la vía de señalización de Wnt posee en varios tipos de carcinoma, se hipotetizó que el gen Axin1 podría encontrarse mutado y ser responsable de su activación. Axin1, codifica la proteína Axina-1 parte integrante del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina, con una elevada frecuencia de mutaciones (81,8%) identificada en ATC {Kurihara, 2004 #1310}. Además se han identificado mutaciones en Axin1 en carcinoma hepatocelular {Ishizaki, 2004 #4410}, hepatoblastomas {Taniguchi, 2002 #1474}, meduloblastoma cerebelar {Dahmen, 2001 #1475} y adenocarcinoma endometrial {Wu, 2001 #4413}.

#### **Axin2-rs7210356, rs3923086-**

Recientemente, se observó una pérdida específica del 64% de heterocigosidad en Axin2 en el cáncer epitelial de ovario {Notaridou, 2011 #4414}. Varios polimorfismos localizados en Axin2 han mostrado estar implicados en procesos de proliferación celular y ser factores de riesgo de diferentes tipos de cáncer, aunque no se han obtenido datos positivos en enfermedades psiquiátricas. Entre los distintos SNP implicados, el rs7210356 y rs3923086 han sido implicados en alteración de células madre y se asociaron con un mayor riesgo de cáncer de mama {Wang, 2008 #1537}.

#### 4.3.2.10.3. CTNNB1 ( $\beta$ -catenina)

Las mutaciones patogénicas que aparecen en el gen CTNNB1, localizado en el locus 3p21 y que codifica  $\beta$ -catenina, modifican los residuos de serina y treonina o los residuos adyacentes de su dominio regulador, codificados por el exón 3. De esta manera, se ve afectada su unión al complejo de degradación, aumentando la acumulación de la proteína en el citoplasma {Gumbiner, 1995 #1574;Orford, 1997 #4420}, lo que produce una mayor translocación hacia el núcleo. En esta localización es donde ejerce su función transcriptor, facilitándose la sobreexpresión génica que aumenta la proliferación celular y el crecimiento de la célula, desempeñando un importante papel en la formación de varios tipos de tumores {Gumbiner, 1995 #1574}.

La gran mayoría de mutaciones registradas en el gen CTNNB1 son heterocigotas, de tipo "missense" y se localizan en el exon 3. Estas alteraciones están involucradas en la patogénesis de multitud de tumores entre los que se encuentran el carcinoma de colon {Morin, 1997 #1861} y los cánceres de naturaleza ginecológica en donde se han registrado mutaciones entre un 20 y un 40%, dependiendo del tipo tumoral {Kobayashi, 1999 #1864;Palacios, 1998 #1865}. No obstante, muchos estudios inmunohistoquímicos de  $\beta$ -catenina, muestran patrones alterados de localización de la proteína en el compartimento citoplasmático que no se relacionan con las mutaciones encontradas en esta región {Kobayashi, 1999 #1864;Palacios, 1998 #1865;Machin, 2002 #1866}, lo que sugiere que el proceso tumorigénico relacionado con  $\beta$ -catenina no se conoce totalmente. Teniendo en cuenta que los genes regulados por  $\beta$ -catenina, son genes de proliferación en células con capacidad de división, se han estudiado ampliamente por su implicación directa principalmente en algunos tipos de cáncer. Con respecto a patologías psiquiátricas se seleccionaron SNPs de  $\beta$ -catenina, entre ellos las variantes genéticas incluidas en este trabajo, como integrantes de un locus con susceptibilidad para trastorno bipolar {, 2011 #4425;Liu, 2011 #5389}.

#### 4.3.2.10.4. DAAM2

El gen activador de la morfogénesis humana asociado a Disheveled 2 (DAAM2) se caracterizó en 2003 por primera vez. DAAM2 es una de las moléculas clave de la vía Wnt / PCP cuyo gen se localiza en el cromosoma 6p21.2 que comprende 27 exones {Kato, 2003 #4426}. Aunque DAAM2 es sospechoso de desempeñar un papel en las células madre embrionaria, la migración celular, y cierta malignidad, no se conoce en detalle independientemente de que se ha afirmado clínicamente importante {Brandenberger, 2004 #4427;Zeng, 2007 #4428}.

Un estudio realizado en 2008 en el cual se analizó la expresión de genes en sangre de pacientes con esquizofrenia durante el primer episodio psicótico y su posterior remisión, se encontró un incremento de la expresión de DAAM2 ( $P < 0.001$ ), modificándose esta expresión con el transcurso de la enfermedad. Teniendo en cuenta que DAAM2 se ha descrito como alterado en pacientes psicóticos estudiamos dos SNPs que cubrieron los criterios de selección para este gen: rs3004067 y rs6937133 {Kuzman, 2009 #2038}.

#### 4.3.2.10.5. DKK4

Este gen codifica una proteína que es miembro de la familia Dickkopf. La proteína secretada contiene dos regiones ricas en cisteína y está implicada en el desarrollo embrionario a través de sus interacciones con la vía de señalización de Wnt. La actividad de esta proteína es modulada por la unión al co-receptor de Wnt y el co-factor de Kremen 2.

En los últimos años, muchos estudios han identificado una serie de genes como posibles responsables de los principales trastornos neuropsiquiátricos y otras enfermedades humanas graves, como el cáncer, que se encuentran en el cromosoma 8p, entre ellos DKK4.

Aunque el cromosoma 8p no mostró pruebas de la asociación en estudios de exploración de todo el genoma en esquizofrenia y trastorno bipolar. Dos estudios de ligamiento de todo el genoma

en muestras de familias de pacientes con un índice de dos o más casos de aparición temprana de depresión mayor, presentaron una asociación positiva entre un historial de intentos de suicidio y varias regiones cromosómicas, entre ellas en 8p11.2-p11.1 –DKK4-(D8S1145, 37,0 cm, 18,2 Mbps, P <0.0001) {Zubenko, 2003 #2055;Zubenko, 2004 #2054}.

Un estudio de asociación de 28 genes de la vía de señalización de Wnt/  $\beta$ -catenina ha descrito que la variación polimórfica en el gen DKK4 (DKK4) presenta asociación con esquizofrenia {Proitsi, 2008 #2079}.

Curiosamente, el SNP, rs2073665 de DKK4 se encontró que estaba asociado significativamente con el volumen del cerebro en 961 individuos esquizofrénicos vs sanos {Zhang, 2011 #2080}, fortaleciéndose así la evidencia para una hipótesis del neurodesarrollo en la esquizofrenia.

#### 4.3.2.10.6. GSK3 $\beta$

La presencia de un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en la región del promotor de GSK3 $\beta$  (-50T/C; rs334558), alelo C se ha asociado a una reducción de su actividad {Benedetti, 2012 #4200} en respuesta a ADs {Karege, 2012 #4197;Gould, 2008 #4201} y menor recurrencia de la enfermedad depresiva {Gould, 2007 #4202}. Los SNPs Rs12630592 y rs6438552 de GSK3 $\beta$  también han sido asociados con cambios en los patrones estructurales como diferencias de volumen de materia gris en hipocampo derecho y circunvoluciones temporales superiores bilaterales y conductuales en pacientes deprimidos {Howell, 2011 #4203} El haplotipo que contiene tres SNPs (rs334555, rs119258668 y rs11927974) se ha asociado con un inicio de la enfermedad en edades tempranas {Karege, 2012 #4197;Gould, 2008 #4201;Sui, 2008 #4204}; {Chandran, 2013 #4205}. Los polimorfismos de GSK3 $\beta$  se encuentran asociados a variaciones estructurales en el hipocampo. {Inkster, 2009 #2137} y a la respuesta terapéutica antidepressiva en pacientes chinos con depresión {Tsai, 2008 #4228}.

#### 4.3.2.10.7. WNT

##### **WNT2b**

Este gen codifica un factor de transcripción muy conservado (MMTV), se encuentra localizado en el cromosoma 1p13.2.. En el caso de WNT2b, este gen se asocia tanto al desarrollo, así como a carcinogénesis humana.

En un estudio de genotipado masivo de genes candidatos para Trastorno Bipolar, de la vía de señalización de Wnt, seleccionados por su elevado nivel de expresión en cerebro y localización en regiones cromosómicas. Teniendo en cuenta que estuvieran por estudios de ligamiento previos implicados en el trastorno. Se detectó la presencia de asociación entre la patología y los pacientes con trastorno bipolar que tenían un alelo recesivo en rs3790606 de WNT2B {Zandi, 2008 #2317}.

##### **WNT3**

Estudios de expresión génica sugieren que este gen puede desempeñar un papel clave en algunos casos de cáncer de mama humano, rectal, pulmonar, y gástrico a través de la activación de la vía de señalización Wnt-beta-catenina-TCF. Este gen está agrupado con WNT15, otro miembro de la familia, en la región del cromosoma 17q21.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto se seleccionó un SNP de WNT3 que cumpliera con los criterios de selección como posible target de asociación, rs199494. Este SNP presenta además asociación en Parkinson {Liu, 2011 #4463}.

#### 4.3.2.10.8. ZBED

Axina, un modulador clave de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, actúa como un proteína de andamiaje en la fosforilación y la degradación de la  $\beta$ -catenina citoplásmica. Proteínas Wnt canónicas parecen estabilizar  $\beta$ -catenina mediante la inducción de la interacción de LRP5 / 6 con Axina. Esta interacción requiere la fosforilación de los residuos de Ser o Thr en los motivos PPPP (S / T) PX (T / S) en el dominio intracelular de LRP5 / 6. Se ha identificado una nueva proteína que interactúa con Axina, CAMA zinc-finger 3 (Zbed3). La interacción se confirmó mediante co-inmunoprecipitación en células de mamífero y en ensayos in vitro. Se encontró que Zbed3 también contiene un motivo PPPPSPT, que es crucial para su unión a Axina. Los residuos de Ser y Thr en el motivo parecen estar también fosforilados por la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) y las cinasas de la familia de CKI. Por lo que se indica a Zbed3 como una nueva proteína de unión a Axina implicada en la modulación de la señalización de Wnt /  $\beta$ -catenina {Chen, 2009 #2380}.

El gen ZBED3 se encuentra en el cromosoma 5q13.3 y actúa como regulador de la activación de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina estabilizando  $\beta$ -catenina en el citoplasma. Basándonos en estudios de genotipado masivo que incluyo éste gen como posible target de asociación en diabetes de tipo II. Seleccionamos por sus características al SNP rs2914143.

#### 4.3.2.10.9. FZD3

La familia de genes Frizzled, a través de la mediación de la señalización de Wnt, está involucrada en el desarrollo de diversas estructuras. Hay varios tipos de receptores de Wnt que regulan tanto la vía canónica como la no canónica, la familia frizzled es uno de los principales {Adler, 2001 #2385;Wu, 2004 #2387}. Modulando principalmente la vía canónica {Huang, 2004 #2390}.

El gen FZD3 consta de ocho exones y es aproximadamente 70 kb de largo; codifica para el receptor de FZD3, uno de los principales componentes de la vía de señalización de Wnt, que está involucrado en la regulación de procesos de neurodesarrollo temprano. FZD3 es una proteína transmembrana casi ubicua al receptor de ligandos Wnt implicados en la especificación de varias estructuras, como los derivados de la cresta neural, y la correcta orientación axonal durante el desarrollo {Deardorff, 2001 #2393;Sala, 2000 #2391;Wang, 2002 #2396}.

El gen frizzled 3 (FZD3) se encuentra en el cromosoma 8p21, sugerido en repetidas ocasiones como un locus de vinculación positiva para la esquizofrenia {McGuffin, 2003 #2411}. El gen FZD3 consta de 8 exones y 7 intrones, que abarcan aproximadamente 70 kb {Kirikoshi, 2000 #2420}. De acuerdo con esto, dos grupos de investigación han informado recientemente de una asociación significativa entre la esquizofrenia y el gen FZD3 en muestras de pacientes japoneses y chinos {Katsu, 2003 #2422}.

Por otra parte, también se examinó la posible asociación entre el gen FZD3 con trastornos de humor, esquizofrenia y trastornos del estado de ánimo, patologías que pueden compartir la vulnerabilidad genética {Berrettini, 2003 #4474}. Basándonos en estos indicios se selecciono el SNP rs352203 que en un estudio de genotipado masivo mostró ser un potente factor negativo de riesgo de psicosis {Kishimoto, 2008 #2442}.

## 4.4. Vía Notch

La vía de señalización Notch se expresa durante toda la vida de un animal desde el desarrollo {de la Pompa, 1997 #4476} hasta la edad adulta {Berezovska, 1998 #4477} e interactúa con otras cascadas de señalización en una manera dependiente de contexto, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Está involucrada en el control de diversos eventos durante el desarrollo de las células eucarióticas como son la proliferación, el crecimiento, la migración, la diferenciación y la muerte celular programada (apoptosis).

Se describió al sistema Notch, por primera vez como responsable de la neurogénesis y la especificación del ectodermo en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) {Morgan, 1917 #4479}. En 1914 se descubrió la primera mutación del gen Notch (Dexter et al.). En 1919 lo caracterizaron al detectar una deficiencia funcional de la proteína Notch, que provoca la aparición

de surcos (*notches*) en los bordes de las alas de *D. melanogaster* (Mohr et al, 1914). En 1940 Poulson demostró que la pérdida del gen es letal en embriones. Posteriormente, en 1970, Wright encontró que las mutaciones del gen Notch-1 inducen la formación de una estirpe neurogénica de células que estaban destinadas a ser epidérmicas {Wu, 1999 #4529;Warton, 1985 #4531}. A mediados de los años ochenta, los grupos de Artavanis-Tsakonas y Young clonaron y expresaron independientemente el gen que consiste en un receptor con un solo dominio transmembranal {Artavanis-Tsakonas, 1999 #4536} {Kidd, 1986 #4554}. A la fecha, se han identificado varios genes del receptor Notch en diversas especies, incluyendo la humana, en las que se conocen cuatro genes que codifican a sus correspondientes proteínas Notch-1 al -4.

#### 4.4.1 Vía de señalización Notch

Los genes Notch codifican receptores transmembrana de aproximadamente 300 kDa, cuya estructura está altamente conservada. Los productos de cada gen se expresan como un solo polipéptido precursor (pre-Notch) que es procesado proteolíticamente por una convertasa en el aparato de Golgi, dando lugar a un precursor heterodimérico. Este último se ancla posteriormente en la membrana y consiste en una subunidad extracelular (*extracellular subunit*, EC) y una subunidad transmembrana (*transmembrane subunit*, TM) que está unida a la región intracitoplásmica (IC). La región EC contiene varias repeticiones en su secuencia de aminoácidos, similares a la del factor de crecimiento epidérmico (EGF-like), constituyendo las repeticiones 11 y 12 el principal sitio de unión a su ligando proveniente de otra célula.

Cuando el receptor Notch se une con su ligando en otra célula la subunidad transmembranal TM es procesada proteolíticamente, generando un fragmento intracelular (*intracellular subunit*, IC) que se transloca al núcleo e interactúa con factores de transcripción de la familia CLS (CBF-1/ Lag-1/ Suppressor of Hairless) {Tamura, 1995 #4598} a través del dominio RAM23 de IC. Al unirse CBF-1 a IC se disocia un complejo represor que incluye una diacetilasa de histonas (HDAC-1) y recluta coactivadores nucleares como SKIP y MAML1 (mastermind), lo que hace a CBF-1 actuar, entonces, como un activador de la transcripción {Nickoloff, 2003 #4599}. Los cuatro receptores Notch en mamíferos (Notch1-4) tienen estructuras muy similares entre sí, con diferencias esenciales en las porciones extracelular y citoplásmica.

Los receptores Notch-1 y -2 contienen 36 repeticiones “EGF-like” en sus dominios EC, mientras que Notch-3 contiene 34 y Notch-4 solamente 29. A nivel del dominio IC tienen las siguientes diferencias: Notch-1 contiene un dominio de transactivación fuerte (TAD, por sus siglas en inglés), mientras que en Notch-2 su TAD es débil y en Notch-3 y 4 no está presente {Radtke, 2003 #4633}.

Los ligandos del receptor Notch en invertebrados son conocidos como Delta y Serrate para *D. melanogaster*., en mamíferos se conoce un grupo de homólogos de Delta denominados “Delta-like”; y llamados Jagged (JAG) para Serrate. En total se conocen cinco ligandos en mamíferos denominados JAG1, JAG2 y H-Delta-1, -3, y -4 (DLL1, DLL3, y DLL4) {Gray, 1999 #4635}. En 1999, se halló además, una forma soluble de Delta en *Drosophila*, lo que sugiere que Notch puede mediar la comunicación entre células no contiguas {Qi, 1999 #4636}. Las diferencias estructurales en esta familia de ligandos son el número y el espaciamiento de las repeticiones a nivel del dominio extracelular y la presencia de un dominio rico en cisteína localizado corriente abajo de las repeticiones EGF, específicamente en los ligandos Ser, JAG1 y JAG2 {Radtke, 2003 #4633}.

Las proteínas moduladoras de la unión receptor ligando a nivel extracelular son las proteínas “Fringe” en *Drosophila* y sus homólogos en mamíferos, “Lunatic Fringe, Radical Fringe, y Maniac Fringe” {Moran, 1999 #4638;Johnston, 1997 #4639}. Además, se han identificado proteínas que modulan la degradación/procesamiento de Notch a nivel intracelular; en *Drosophila*, la proteína Numb que actúa regulando negativamente la señalización al unirse con la región intracelular de Notch {Spana, 1996 #4640}.

Por último, los genes blanco de Notch incluyen factores de transcripción represores pertenecientes a las familias de proteínas HES (*hairly and enhancer of Split*) y HRT/HERP/Hey (familia “*basic helix-loop-helix-Orange*”), IL-4, p21, etcétera. Sin embargo, aún no es claro cuál(es) de esos genes es/son el/los responsables de los efectos fenotípicos de la señal Notch (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Algunos ejemplos de la participación de Notch es la inhibición del desarrollo neuronal, ya que parece ser que los genes blanco Hes1 y Hes5 median muchos o quizás todos los efectos producidos por Notch {Kageyama, 1999 #4641}. En el caso del desarrollo del páncreas el blanco de Notch es el gen HES-1; en el desarrollo cardiaco el gen Hey2; y en el desarrollo vascular los genes Hey1 y Hey2. Notch ejerce, además, un doble papel en un modelo de cultivo celular (3T3-L1): la activación de HES-1 induce adipogénesis, mientras que al bloquear la activación de HES-1 se inhibe la diferenciación de 3T3-L1. Por último, se ha informado que el gen IL-4 es un blanco directo de Notch y explica la capacidad que tiene de promover el fenotipo Th2 de las células T {Kadesch, 2004 #4642}

#### **4.4.1.1. Localización y función de Notch**

Los estudios realizados sobre la función y localización de los receptores Notch están enfocados, primordialmente, en el receptor Notch-1, mientras que aún no se ha dilucidado el papel que desempeñan el resto de los receptores. La señalización Notch está implicada en la neurogénesis, hematopoyesis y vasculogénesis. Estudios de Notch-1 en *Xenopus* muestran que sus patrones de expresión son muy similares a *Drosophila*, sobre todo en extirpes celulares terminalmente no diferenciadas y proliferativas. Durante el desarrollo, los tejidos con mayores niveles de expresión incluyen cerebro, los ojos, y el tubo neural {Coffman, 1990 #4646; Bierkamp, 1993 #4647}. Estudios en mamíferos muestran que los niveles de expresión de sus homólogos correspondientes comienzan tardíamente durante su desarrollo embrionario. Las proteínas se expresan como patrones dinámicos en tejidos que llevan a cabo la determinación del destino celular o la aceleración de la proliferación {Weinmaster, 1991 #4648} {Horvitz, 1991 #4657}.

La función de la señalización Notch involucra una gran variedad de procesos celulares incluyendo el mantenimiento de células troncales, especificación del destino celular, diferenciación, proliferación y apoptosis, por lo que posee efectos pleiotrópicos en diferentes órganos. Los tres efectos principales son: a) el mantenimiento de las células troncales o precursoras en un estado no diferenciado; b) la influencia en las decisiones del destino celular, ya sea a través de la vía lateral o bien por una vía inductora dependiente de la cantidad receptor ligando expresado en la membrana, y c) la habilidad de influenciar la diferenciación y la progresión del ciclo celular {Miele, 1999 #4671}.

Notch-1 se expresa en neuronas piramidales de la corteza {Redmond, 2000 #4745} {Sestan, 1999 #4747; Stump, 2002 #4785} y el hipocampo {Stump, 2002 #4785}. Específicamente en el hipocampo, la expresión de Notch puede comportarse como una nueva "molécula de plasticidad": se expresa post sinápticamente y regula la morfología de las espinas dendríticas, la plasticidad sináptica y procesamiento de la memoria {Alberi, 2011 #4836; Costa, 2003 #4838; Wang, 2004 #4840}.

#### **4.4.2. Papel de Notch en la plasticidad sináptica y en la neurogénesis**

Al analizar el patrón de expresión temporal de Notch en la corteza, es interesante observar que, en torno al nacimiento, la expresión Notch1 es atenuada en comparación con el desarrollo. Sin embargo después de la primera semana del parto, la expresión se vuelve más abundante {Tokunaga, 2004 #4848}. Este tiempo coincide con el período crítico cuando las conexiones sinápticas se refinan y la actividad de las conexiones sinápticas se sincronizan siguiendo un patrón {Marandi, 2002 #4849}. Por lo tanto, podríamos plantear la hipótesis de que durante el desarrollo postnatal, Notch es inducida y necesaria para la maduración de la red neuronal. Varios artículos han confirmado esta hipótesis y han demostrado que Notch tiene un efecto directo sobre el desarrollo de patrones dendríticos {Berezovska, 1999 #4851; Breunig, 2007 #4855; Redmond, 2000 #4745; Sestan, 1999 #4747} y crecimiento de axones {Crown, 2003 #4856}. La reducción de la señalización de Notch afecta el procesamiento sensorial y la memoria de la mayoría de las especies {Alberi, 2011 #4836; Chao, 2005 #4857; Costa, 2003 #4838}. Este efecto no parece ser el resultado de conectividad aberrante, sino que más bien depende de los cambios en la plasticidad sináptica {Alberi, 2011 #4860}.

Un estudio realizado en *Drosophila* ha indicado que la molécula de adhesión, klingleon, es un blanco no-canónico/no-transcripcional directo de Notch siendo decisivo para la formación de

memoria a largo plazo lo que sugiere que los mediadores no canónicos de Notch pueden estar implicados en la plasticidad sináptica y procesamiento de la memoria {Matsuno, 2009 #4862}.

En general, parece que un aumento transitorio de Notch es esencial en la modulación de la plasticidad sináptica. Sin embargo se ha demostrado que señalización Notch es atenuada durante el período de consolidación de la memoria {Conboy, 2007 #4864}. Esto plantea la interesante posibilidad de que la señalización Notch sea responsable temprano de los cambios moleculares potenciadores de sinapsis. En última instancia, estos estudios ponen de manifiesto que la señalización Notch es un requisito esencial para la función neuronal y la formación de la memoria.

Se ha demostrado que Notch desempeña un papel importante en la neurogénesis embrionaria y adulta {Chambers, 2001 #4952}. Tras la activación de Notch por sus ligandos (por ejemplo, Delta1), el dominio intracelular Notch (NICD) se libera de la membrana y se transloca al núcleo, donde NICD forma complejo con Rbpj. El complejo NICD-Rbpj induce la expresión de genes tales como los represores transcripcionales Hes1 y Hes5, que reprimen la expresión génica proneural y de ese modo inhiben la diferenciación neuronal. La activación de la señalización de Notch conduce al mantenimiento de la población de células madre neurales, mientras que la inactivación de la señalización de Notch induce la diferenciación neuronal y agota la población de células madre neurales {Bertrand, 2002 #4953}.

En el cerebro maduro, la señalización de Notch está implicada, además, en la neurogénesis adulta de la zona subventricular (SVZ) {Imayoshi, 2010 #4976; Nyfeler, 2005 #4978} y la zona subgranular del hipocampo (SGZ) {Lugert, 2010 #4983}. Bajo la regulación de Notch, los astrocitos en el parénquima cerebral de ratón adulto presentan neurogénesis latente {Magnusson, 2014 #4985}.

Notch podría regular la diferenciación de las células madre neurales de dos maneras: 1) inhibiendo el destino neuronal permitiendo diferenciación celular glial, y 2) mediante la promoción de la diferenciación de astrocitos mientras inhibe la diferenciación en neuronas y oligodendrocitos {Grandbarbe, 2003 #4987; Chiba, 2006 #4989}. Se ha descrito de que la vía de señalización Notch también afecta al crecimiento y extensión de neuritas {Sestan, 1999 #4747}.

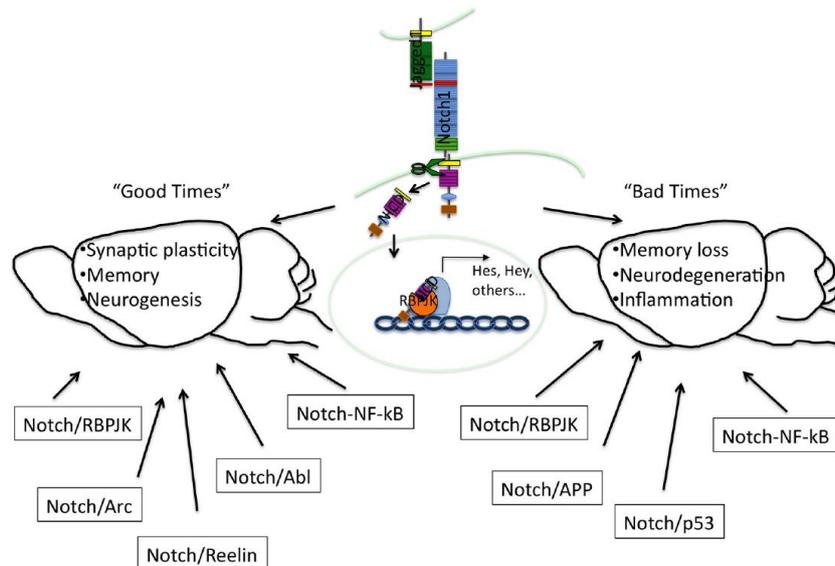
Además del papel en el mantenimiento madre neural, Notch regula también la integración de las neuronas recién nacidas en la capa granular del hipocampo {Liem, 2007 #5026}. Por lo tanto, la señalización de Notch parece decisiva para la capacidad regenerativa del cerebro maduro.

#### **4.4.3. Notch: Interacción con otras vías de señalización**

Durante mucho tiempo, se pensó que la actividad Notch en las neuronas se restringía a su potencial transcripcional. Sin embargo, en la actualidad hay numerosos datos que indican la interrelación de Notch con otras vías de señalización, que contribuyen a las funciones de Notch tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, por ejemplo, Notch regula la vía mTOR-Akt; Notch también regula negativamente la señalización de Wnt, y favorece la degradación de  $\beta$ -catenina en la vía NF- $\kappa$ B {Alberi, 2013 #5063}. Una representación de vías de señalización de interaccionan con Notch en funciones fisiológicas y patológicas puede verse en la **Figura 10**.

#### **4.4.4. Papel de Notch en la etiopatogenia de la depresión, en el mecanismo de acción de los fármacos ADs**

La implicación de Notch en la etiopatogenia de la depresión sólo se ha podido establecer en la depresión posterior a accidente cerebro vascular. En ratas sometidas a estrés crónico leve (CUMS), la expresión del dominio intracelular Notch1 (NICD), la expresión de Hes1 y Hes5 y la proliferación celular disminuyeron significativamente en el hipocampo. La administración crónica de fluoxetina dio lugar a una regulación positiva de la expresión de NICD y revirtió el descenso de Hes1 y la proliferación celular, pero redujo la expresión Hes5. Esto sugiere que la variación en la actividad Notch1 puede, al menos en parte, contribuir a la modulación de la neurogénesis en el hipocampo y la respuesta depresiva en CUMS {Guo, 2009 #5064}.



**Figura 10: Funciones fisiológicas (good times) y patológicas (bad times) reguladas por Notch en cerebro.** Se representa la cascada de señalización por Notch, Los recuadros y flechas representan la interacción con otras cascadas de señalización. Tomado de Alberi, Hoey et al. 2013

En corteza frontal dorsolateral (DLPFC) y amígdala (AMY) proveniente de humanos suicidas sin historia clínica psiquiátrica y sin tratamiento con ansiolíticos o antidepresivos se observa disminución del receptor Notch {Monsalve, 2014 #5065}.

#### 4.5. c-MYC

La proteína producto del proto oncogen c-MYC (MYC) es un factor de transcripción que regula un amplio rango de procesos celulares, pudiendo contribuir a la iniciación y progresión de los tumores {Meyer, 2008 #5066}. MYC ectópico es capaz de inducir la progresión del ciclo celular y la proliferación. MYC ha demostrado que puede inducir o reprimir la expresión de cientos de genes, útiles para mediar funciones biológicas {Jackstadt, 2013 #5067}.

MYC codifica para c-Myc, que es un factor de transcripción oncogénico de la familia hélice-bucle-hélice/cremallera de leucina. La activación de la transcripción por Myc depende de la formación de complejos con proteínas heterodiméricas Max. Heterodímeros Myc-Max se unen a secuencias de ADN llamadas E-box en las regiones reguladoras de los genes blanco y reclutan coactivadores transcripcionales. Myc tiene también la capacidad de reprimir genes aunque los mecanismos que utiliza son menos conocidos {Luscher, 2012 #5068}.

La familia de genes Myc en humano se compone de MYCC, MYCN, MYCL y MYCS. MYCS no tiene capacidad neoplásica. Aunque es probable que los tres genes Myc ejerzan efectos similares en el ciclo celular Myc, es el que más se expresa. Los niveles de Myc se correlacionan con la proliferación celular. El nivel de mRNA de Myc y la expresión de la proteína están estrechamente correlacionados con las tasas de proliferación celular.

El mecanismo de regulación de Myc en células quiescentes estimuladas con mitógenos o suero no es completamente conocido, pero los datos apoyan un papel relevante de la cascada de Ras/ Raf /MEK/ERK en la regulación positiva de Myc. Otras cinasas, como las cinasas Janus (Jak1 y Jak2), Src, v-Abl o Bcr-Abl o Akt también regulan positivamente Myc. Citoquinas antiproliferativas como la de transformación del factor de crecimiento  $\beta$  (TGF) o interferón- $\gamma$  resultan en una regulación negativa de Myc {Bretones, 2015 #5069}.

Partiendo de estudios pioneros en la década de 1980 hasta los actuales que involucran a todo el genoma, el cuadro general muestra que el control de la proliferación celular es una de las principales funciones de Myc en la biología celular. La mayor parte de los datos muestran que la sobreexpresión de Myc estimula mientras que su disminución inhibe la progresión del ciclo celular. Varios mecanismos por los cuales Myc influye en el ciclo celular se han dilucidado. La mayoría de ellos están relacionados con la inducción o represión de genes diana que codifica reguladores

positivos o negativos del ciclo celular. Los estudios de expresión de genes de todo el genoma muestran que Myc regula un asombroso número de genes, en torno a 1000 en la mayoría de los modelos {Zeller, 2003 #5070}. Muchos de estos genes están relacionados con el ciclo celular, muchos de los genes blanco de Myc están involucrados en la biosíntesis de novo de nucleótidos, síntesis de proteínas y metabolismo energético (Figura 11). Los factores de transcripción de la familia E2F son inducidos por la expresión ectópica de Myc, además Myc tiene un efecto importante como un represor de miRNAs que se dirigen a reguladores críticos del ciclo celular. Estos miRNAs incluyen miembros como let-7(CDC25A, Cdk6, ciclina A, ciclina D1 D2 y D3) miR-15a/16-1 (Cdk6, E2F3, ciclina D1 y D3), miR-26a (ciclina D2 y E2) o miR-34a (Cdk4, Cdk6, ciclina E2 y E2Fs {Jackstadt, 2015 #5071}.

La activación de genes específicos de  $\beta$ -catenina permite controlar la transcripción celular y la regulación del ciclo celular. Los dos genes c-Myc y ciclina D1 se han estudiado respecto a  $\beta$ -catenina en células co-transfectadas HCT116. Se demuestra de esta manera que el antígeno T y  $\beta$ -catenina incrementa de forma individual c-Myc y ciclina D1, mientras que la co-transfección con T-antígeno y  $\beta$ -catenina provoca incremento potenciado de c-Myc y ciclina D1 {Xia, 1996 #5073}.

No hemos encontrado datos de la participación de c-myc en la neuroplasticidad o la nerugénesis, más allá de su participación en el ciclo celular, No existen tampoco estudios del papel de c-myc en la depresión o en el mecanismo de acción de los antidepresivos.

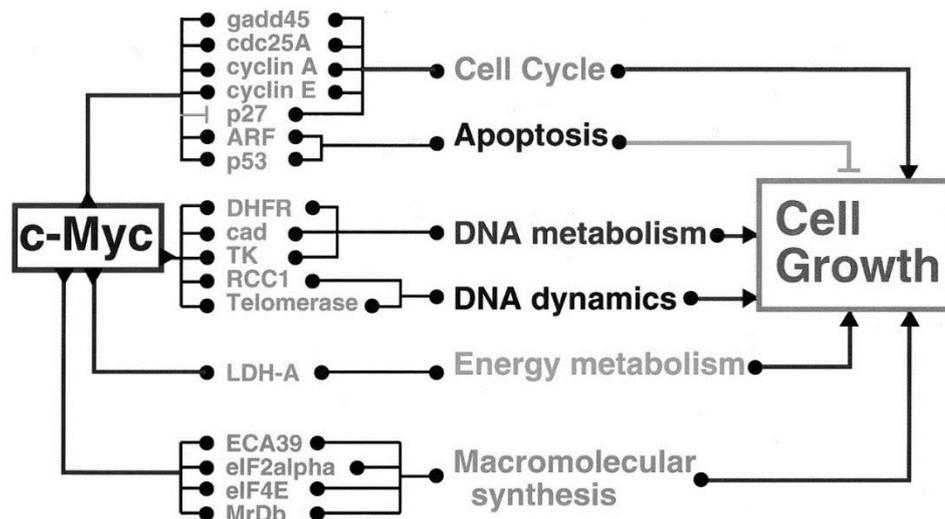


Figura 11. Relación entre c-Myc, genes diana y funciones celulares implicadas en el crecimiento celular.

#### 4.6. c-Jun

c-Jun es el componente más estudiado del factor de transcripción AP-1 que conforma junto con la proteína c-Fos. c-Jun está implicado en numerosas funciones celulares, como la proliferación celular, la apoptosis, la supervivencia celular y la morfogénesis entre otras. c-Jun junto con b-Jun y d-Jun forman la familia de proteínas de mamíferos jun {Mechta-Grigoriou, 2001 #5074}.

La actividad del factor de transcripción AP-1 es inducida por numerosas señales, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas, y estrés extracelular. La estimulación de AP-1 está mediada, en parte, por la fosforilación en Ser-63 y Ser-73 de c-Jun por la cinasa Jun N-terminal (JNKs) {Herdegen, 1998 #5075}, en especial por JNK-1 {Kallunki, 1994 #5076}, pero también se ha descrito una función alternativa independiente de fosforilación. La proteína c-Jun reconoce de un modo directo secuencias específicas del ADN para regular la transcripción de genes. c-Jun se expresa durante el desarrollo y en el cerebro adulto, donde la expresión se ve muy inducida en respuesta a lesión neuronal {Herdegen, 1998 #5075}. La regulación transcripcional de genes específicos por c-jun juega un papel clave en los mecanismos moleculares como la plasticidad neuronal, la transmisión sináptica, y la diferenciación morfológica. Estudios recientes han indicado que jun y

fos, pueden desempeñar un papel importante en la potenciación a largo plazo, el aprendizaje y la memoria.

#### **4.6.1. c-jun: interacción con otras vías de señalización**

La proteína c-Jun ha demostrado ser capaz de interactuar, amplificar e integrarse en múltiples vías de señalización, como EGFR-ERK, EGFR-RhoA-ROCK, B-MAP3K1-JNK, TGIF1, ERG3, ATF2, STAT1, STAT3, BCL6, BCL3, MyoD, RUNX2, WNT/ $\beta$ -catenina entre otros.

En el caso de la vía WNT/ $\beta$ -catenina, c-Jun funciona como un andamio en el complejo de transcripción de  $\beta$ -catenina -TCFs uniendo Dvl a TCF. Dvl coopera en el núcleo con c-Jun para regular la transcripción de genes estimulados por la vía de señalización canónica de Wnt. c-Jun juega un papel importante en la vía de señalización canónica de Wnt actuando principalmente dentro del complejo de transcripción TCF- $\beta$ -catenina como una proteína de andamiaje para unir Dvl a TCF {Gan, 2008 #5151}.

#### **4.6.2. Papel de c-jun en la plasticidad**

La activación de JNK juega un papel importante en la muerte celular asociada a enfermedades degenerativas. Dada la variedad de situaciones y estímulos estresantes que activan JNK, sorprende los pocos estudios que se han centrado en la implicación en el hipocampo de JNK y c-jun en la memoria y en la plasticidad sináptica.

Sherrin et al (2011) han demostrado que las isoformas de JNK, JNK2 y JNK3 juegan un papel importante en la regulación del miedo en condiciones de estrés, que da lugar a una activación sostenida de la vía JNK en el hipocampo y que conduce en última instancia a los déficits en la memoria y la potenciación a largo plazo. Por otro lado, la activación JNK1 transitoria condiciona una respuesta al miedo contextual que subyace efectos beneficiosos {Sherrin, 2011 #5390}.

#### **4.6.3. Papel de c-jun en la etiopatogenia de la depresión**

A pesar del creciente número de estudios que relacionan los genes inmediatos a funciones importantes del cerebro, su papel en diversos trastornos neuropsiquiátricos incluyendo la esquizofrenia o el trastorno depresivo mayor aún es poco conocido {Todorova, 2003 #5078}.

#### **4.6.4. Papel de c-jun en el mecanismo de acción de los fármacos ADs**

JNK desempeña un papel importante en la muerte celular neuronal inducida por estrés. Teniendo en cuenta que, la fisiopatología de la MDD implica la muerte de las células neuronales; fármacos capaces de bloquear la vía JNK1/2 podrían ser útiles como fármacos antidepresivos. El tratamiento con agmatina subcrónica redujo la fosforilación de JNK1 y JNK2. Curiosamente, se observó una correlación significativa entre ambos JNK1 y JNK2 y tiempo de inmovilidad en animales sometidos a la prueba de natación forzada {Hu, 2012 #5116}.

De hecho, antidepresivos como la fluoxetina o fórmulas de hierbas medicinales como CHSGS regular la expresión de JNK {Li, 2014 #5134}. Otros estabilizadores del estado de ánimo como VPA o Li incrementan los niveles de proteína c-Jun. VPA podría aumentar directamente los niveles de c-Jun mediante el aumento de la expresión de c-Jun {Asghari, 1998 #5150}.

### **4.7. Ciclina D1**

La progresión a través de las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M) está bajo el control de una familia de proteínas cinasas de serina/treonina. Estas cinasas son heterodímeros que consisten en una subunidad catalítica, la ciclina dependiente de la proteína cinasa (CDK) y una subunidad reguladora, la ciclina, necesaria para que Cdk pueda estar activa. Hasta la fecha se han descrito 21 genes que codifican Cdk y 29 genes que codifican las ciclinas en el genoma humano.

La zona subgranular (SGZ) del hipocampo contiene células madre neurales que se dividen, diferencian y migran para producir neuronas funcionales que se incorporan en los circuitos del hipocampo {Kempermann, 2008 #5152}. La evidencia sugiere que cada paso de este proceso está

altamente regulado y que sería sencillo alterar la neurogénesis en el hipocampo al influir en la proliferación de células madre neurales en el SGZ. Ciclina D1, originalmente identificada como una molécula que une el factor de crecimiento de señalización con la maquinaria del ciclo celular, es una molécula crítica en la regulación de la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular {Baldin, 1993 #5153; Matsushime, 1994 #5154}. Ciclina D1 y sus enzimas catalíticas, dependientes de cinasa ciclina 4 (CDK4) y CDK6, promueven la progresión de fase G1a S mediante la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb). La fase G1 es conocida por su longitud como la de progreso de la neurogenesis, la sobreexpresión de reguladores del ciclo celular como la ciclina D1 acorta G1 y promueve la fase proliferativa {Borrell, 2014 #5167}. La disminución de la actividad de ciclina D1 induce la generación prematura de neuronas y la disminución de la reserva de células madre {Borrell, 2014 #5167}. La expresión de ciclina D1 está muy regulada en todo el ciclo celular y su nivel de expresión en cada fase del ciclo ayuda a determinar las características proliferativas globales de la célula. La expresión de ciclina D1 debe ser alta para el paso a través de la fase G1 y para la iniciación de la síntesis de DNA {Hitomi, 1999 #5181; Guo, 2005 #5215}. Su expresión es vital para la progresión del ciclo celular normal y la proliferación celular {Baldin, 1993 #5153} la expresión de ciclina D1 promueve la proliferación celular {Sherr, 1996 #5222} en modelos animales y humanos {Lin, 2006 #5359; Barbash, 2008 #5370}. La sobreexpresión de ciclina D1 puede inducir re-entrada en el ciclo celular desde el estado de diferenciación terminal en diferentes tipos celulares, incluidas las neuronas {Latella, 2001 #5371}.

$\beta$ -catenina, efector clave de la vía de señalización Wnt, regula la proliferación celular {Nelson, 2004 #5378}. La Ciclina D1 es un objetivo transcripcional importante de la vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina {Shtutman, 1999 #5379}.  $\beta$ -catenina puede activar ciclina D1 y ésta influir en la proliferación de células madre neurales en SGZ {Kumar, 2012 #5380}.

Una cuestión fundamental en la neurobiología es cómo se mantiene el equilibrio entre la proliferación y diferenciación de precursores neuronales para asegurar que el número apropiado de neuronas del cerebro se genera por degradación de ciclina D1 via proteasoma durante la fase G1 inducida por fosforilación en Thr286 a través de GSK3 {Diehl, 1997 #5381}. La sobreexpresión del complejo CDK4 (cinasa dependiente de ciclina 4) -cyclinD1 en células de hipocampo de ratón adulto aumenta de manera autónoma la expansión de las células madre y progenitoras neuronales, mientras que la inhibe la neurogénesis {Artegiani, 2011 #5382}. La quimioterapia induce deterioro cognitivo y psicológico, además de afectar negativamente la neurogénesis en hipocampo, esto se ha relacionado con los niveles de ciclina D1 del hipocampo {Kitamura, 2015 #5383}.

## 4.8. PPAR $\gamma$

### 4.8.1. Señalización por los receptores PPAR $\gamma$

Hace aproximadamente 25 años se describieron las acciones de un grupo diverso de sustancias inductoras de la proliferación de peroxisomas. Los proliferadores de peroxisomas (PP) incluyen plastificantes, herbicidas y solventes usados en la industria química, así como agentes terapéuticos, los fibratos, ampliamente prescritos como medicamentos hipolipemiantes. Como su nombre indica, los PP inducen hipertrofia e hiperplasia de los peroxisomas en el hígado, el riñón, y el corazón de algunas especies susceptibles, como ratas y ratones. Los peroxisomas, son organelas celulares que participan en varios procesos bioquímicos como el metabolismo del peróxido de hidrógeno, la síntesis y degradación del colesterol (con formación de ácidos biliares), la síntesis de glicerolípidos y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. En 1990 apareció la primera publicación que describe el descubrimiento del primer receptor involucrado en la generación de estas respuestas y se denominó PPAR (del inglés, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) {Issemann, 1990 #4476}.

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR; del inglés: "peroxisome proliferator-activated receptor") son un grupo de proteínas pertenecientes a la familia de receptores de ubicación nuclear que se comportan como factores que modulan la transcripción de DNA al unirse a elementos de respuesta específicos de ciertos genes que regulan la expresión génica implicada en la reproducción, metabolismo, desarrollo y respuestas inmunes {Desvergne, 1999 #4482}. Hasta el momento se han descrito tres tipos principales de PPAR designados como  $\alpha$ ,  $\delta$ , y  $\gamma$ ; estos receptores se encuentran involucrados en la regulación de diferentes procesos

metabólicos. Los tres receptores tienen distintos patrones de expresión y especificidad a ligandos {Desvergne, 1999 #4482}.

Al igual que otros miembros de la familia de receptores nucleares, los *PPAR* están compuestos de tres dominios principales: la región NH<sub>2</sub> terminal, el dominio de unión al DNA (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD; Figura 12A) {Willson, 2000 #4495}. Al igual que otros receptores nucleares, el LBD sufre cambios conformacionales debido a la unión de agonistas, convirtiendo a los *PPAR* en formas activas que se unen al DNA, a través de una superficie en la que participan los motivos en dedo de zinc del DBD, que interactúan con secuencias específicas de ciertos genes, llamadas elementos de respuesta (PPRE). Además, el LBD también es importante en los procesos de dimerización, localización nuclear y asociación con varias proteínas a estos receptores, formándose un complejo coactivador o correpressor que cambia el estado de acetilación de las histonas y modula la transcripción genética {Olefsky, 2000 #4496; Dowell, 1999 #4497}.

Los *PPAR* forman heterodímeros con los receptores de ácido 9-cis retinoico (RXR) (Figura 12B), {Martin, 2000 #4498}. Por ello pueden unirse a los PPRE, que consisten en secuencias de seis nucleótidos repetidas y separadas por un nucleótido, conocidas como elementos de respuesta DR-1 {Palmer, 1995 #4499}. La unión de cualquiera de los dos ligandos a los receptores que conforman los heterodímeros puede activar el complejo, pero la unión simultánea tiene mayor potencia {Kersten, 2000 #4500}.

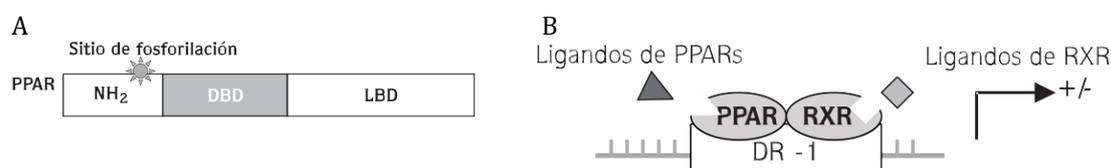


Figura 12: A. Representación linealizada de los *PPAR* y sus dominios funcionales. B: El heterodímero de *PPAR/RXR* se une a elementos de respuesta DR-1 en la región promotora y modula la transcripción de genes blancos

Todos los *PPAR* son, a diferentes niveles, activados por ácidos grasos y sus derivados, aunque la identidad exacta de sus ligandos reguladores endógenos aún permanece incierta. Los *PPAR* $\gamma$  se unen a las tiazolidinedionas (TZD) antihiperlipemiantes, la indometacina y otros antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los ácidos eicosapentaenoico, 9-hidroxi-octadecadienoico (9-HODE) y 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE) y la 15-deoxiprostaglandina.

Los receptores *PPAR* $\gamma$  se expresan en bazo, médula ósea, hígado, testículos, músculo esquelético, tejido adiposo y encéfalo {Elbrecht, 1996 #4505}. Se cree que la señalización de los agonistas *PPAR* $\gamma$  está mediada por fenómenos dependientes e independientes de receptor. La activación por agonistas hace que los receptores *PPAR* $\gamma$  se unan en heterodímeros en asociación con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR); este dímero se dirige al núcleo, uniéndose al ADN para regular la transcripción {Desvergne, 1999 #4482}. Junto a estos efectos genómicos clásicos, los agonistas *PPAR* $\gamma$  tienen otras vías de señalización rápida como algunos de los agonistas de los demás receptores nucleares clásicos {Gardner, 2005 #4512}. En humanos, los *PPAR* $\gamma$  se han relacionado con la adipogénesis, {Vidal-Puig, 1996 #4523} los sensibilizadores a la insulina {Lehmann, 1995 #4524} TZD y la diabetes mellitus tipo 2 {Barroso, 1999 #4525}.

#### 4.8.2. Papel de *PPAR* $\gamma$ en la plasticidad sináptica y la neurogénesis

Recientemente, se ha identificado la participación de los *PPAR* en la proliferación y diferenciación de las células progenitoras neuronales, además están involucrados en vías de señalización implicadas en el control de la proliferación, migración y diferenciación de las células progenitoras neuronales como las vías Wnt, STAT3 y NF $\kappa$ B.

En el cerebro adulto normal, los niveles de receptores *PPAR* $\gamma$  son relativamente bajos, se localizan principalmente en el giro dentado {Braissant, 1996 #4527} y a nivel de los ganglios basales, núcleos caudado, putamen y globo pálido, en el tálamo y la corteza piriforme {Moreno, 2004 #4528}.

*PPAR $\gamma$*  es importante en la regulación del desarrollo temprano del cerebro {Tachibana, 2005 #4529}. La expresión de *PPAR $\gamma$*  es alta en el cerebro durante el desarrollo embrionario (Braissant, 1998) y en las células madre neurales aisladas a partir de embriones de ratón {Wada, 2006 #4533} por el contrario es relativamente baja en el cerebro en recién nacidos y adultos. El silenciamiento génico de *PPAR $\gamma$*  disminuye la tasa de proliferación en células madre neuronales {Tachibana, 2005 #4529;Tachibana, 2005 #4534}. Por el contrario, la activación de la vía de *PPAR $\gamma$*  estimula la proliferación de células madre neurales y su diferenciación a neuronas.

Se ha demostrado recientemente que *PPAR $\gamma$*  desempeña un papel importante en el control de la proliferación y diferenciación de NSCs a neuronas. La activación de la vía de *PPAR $\gamma$*  mediante concentraciones bajas de agonistas específicos, estimula la proliferación y simultáneamente inhibe la diferenciación de las NSCs a neuronas, manteniéndolas como indiferenciadas (nestina+ y MAP2-). Por otro lado una activación excesiva *PPAR $\gamma$*  resulta mortal para las NSCs. Esta acción bimodal sugiere que *PPAR $\gamma$*  regula la expansión y contracción de la población de NSC, de forma que concentraciones óptimas de agonistas *PPAR $\gamma$*  son determinantes para la supervivencia y proliferación in vivo de las NSCs. Teniendo en cuenta la función de la activación de *PPAR $\gamma$*  en la regulación de la proliferación de NSC, los antagonistas *PPAR $\gamma$*  causan apoptosis de NSCs vía activación de la cascada de caspasas, sugiriendo que la señalización de *PPAR $\gamma$* , activada in vivo por ligandos endógenos, normalmente regula el crecimiento de NSC, mientras que su ausencia puede desembocar en la muerte celular programada. Los mecanismos de *PPAR $\gamma$*  que subyacen a la regulación de la proliferación de NSCs esta siendo objeto de debate. Se han implicado la activación de la vía de señalización de ERK mediante sobreexpresión del receptor EGF, la sobreexpresión del nivel de ciclina B y la activación de de la vía de señalización STAT {Wada, 2006 #4537;Matsuda, 1999 #4539}.

Agonistas *PPAR $\gamma$*  ejercen efecto neuroprotector por inhibición de la inflamación y el estrés oxidativo mediante BDNF/ TrkB. {Hong, 2013 #4540}

#### **4.8.3 *PPAR: Interacción con otras vías de señalización***

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) están involucrados en diferentes vías de señalización, controlando la proliferación, migración y diferenciación de NSC, por ejemplo en la vía de señalización de Wnt, y en las vías de señalización de STAT3 y NF $\kappa$ B {Guillemot, 2007 #4541} {Garza, 2008 #4542;Doherty, 2007 #4543}.

La señalización por Wnt silencia la expresión de receptores *PPAR- $\gamma$*  al mismo tiempo induce la expresión de receptores *PPAR- $\beta/\delta$* , lo que refleja el papel diferencial que tienen estos dos subtipos de receptores en la regulación de procesos dependientes de Wnt {Scholtysek, 2013 #4545}. La activación de *PPAR- $\beta/\delta$*  amplifica la actividad de la señalización Wnt y la transcripción dependiente de TCF/LEF en células madre a través de (por lo menos) dos mecanismos: 1) la regulación transcripcional de Lrp5 y 2) la interacción directa con  $\beta$ -catenina {Scholtysek, 2013 #4545}.

#### **4.8.4. *Papel de PPAR $\gamma$ en la etiopatogenia de la depresión y en el mecanismo de acción de los fármacos ADs***

En lo que concierne a los receptores *PPAR $\gamma$*  y depresión muy poco se sabe hasta ahora. Los procesos inflamatorios parecen contribuir significativamente al desarrollo y mantenimiento de los episodios de depresión mayor. Sin embargo, las vías inflamatorias no son el objetivo primario de los fármacos estabilizadores de ánimo convencionales. Dado que los agonistas de *PPAR- $\gamma$*  inhiben la expresión de genes inflamatorios y modulan las vías sensibles al estrés oxidativo {Delerive, 2001 #4547} y que estos mecanismos han sido también implicados en la fisiopatología de la depresión, se podría sugerir que los agonistas de *PPAR- $\gamma$*  actuarían como posibles terapias antidepresivas {Haroon, 2012 #4548}. De hecho algunos agonistas de *PPAR- $\gamma$*  como rosiglitazona o pioglitazona presentan actividad antidepresiva en animales sometidos a los test de la natación forzada y de suspensión de la cola {Eissa Ahmed, 2009 #4549;Sadaghiani, 2011 #4553;Kemp, 2012 #4683}. Efecto revertido por un antagonista de *PPAR- $\gamma$*  {Sadaghiani, 2011 #4686}. La atorvastatina, una estatina lipofílica, ejerce efecto antidepresivo en ratones sometidos al test de la natación forzada {Shahsavarian, 2014 #4687;Ludka, 2014 #4688;Ludka, 2013 #4689}. En seres humanos, se necesitan ensayos bien diseñados para concluir si las estatinas inducen, empeoran o incluso mejorar la depresión {You, 2013 #4693}.

## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**



## HIPOTESIS

Una de las limitaciones importantes del tratamiento actual de la depresión es el periodo de 2-5 semanas de retraso en la respuesta clínica. Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevos antidepresivos que sean capaces de inducir un efecto antidepresivo precoz, para lo cual se necesita la identificación de nuevas dianas celulares que medien un efecto antidepresivo más rápido.

En este contexto, los mecanismos de neuroplasticidad y neuroproliferación están siendo cada vez más implicados en la etiopatogenia de los trastornos depresivos y en el mecanismo de acción de distintos ADs como bases moleculares para el desarrollo de antidepresivos de acción rápida. De hecho diferentes maniobras antidepresivas como el electrochoque producen un efecto antidepresivo precoz y de forma paralela, incrementan la neurogénesis y la plasticidad de forma más rápida que los ADs clásicos.

## OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es la identificación de posibles mediadores moleculares de plasticidad/neurogénesis como dianas para el desarrollo de antidepresivos de acción rápida. El proyecto se basa principalmente en 2 evidencias recientes: 1) los agonistas de los receptores 5-HT<sub>4</sub> inducen un efecto antidepresivo rápido en modelos animales de depresión 2) la vía de señalización Wnt- $\beta$ -catenina media cambios de neuroplasticidad inducidos por antidepresivos clásicos y por agonistas 5HT<sub>4</sub>. Un segundo objetivo general de este trabajo consiste en valorar la implicación de **Single Nucleotide Polymorphism (SNP)** de proteínas de la vía wnt/ $\beta$ -catenina en la etiopatogenia de la depresión.

La identificación de mediadores moleculares de plasticidad/neurogénesis como diana de acción antidepresiva se aborda mediante los siguientes objetivos concretos:

1.- Estudiar el curso temporal de la proliferación celular en cultivos de células progenitoras de hipocampo (1, 4, 16, 24 y 72 horas) y en el giro dentado de cultivos organotípicos de hipocampo (0, 1, 3 y 7 días) inducida por ADs clásicos como la fluoxetina, la paroxetina y la venlafaxina frente a la provocada por los denominados antidepresivos de acción rápida como el agonista de receptores 5HT<sub>4</sub>, el RS 67333.

2.- Estudiar las diferencias en el curso temporal de la expresión de genes implicados en los procesos de proliferación/plasticidad relacionados o no con la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina en cultivos de células progenitoras de hipocampo (1, 4, 16, 24 y 72 horas) así como en la corteza y el hipocampo de rodajas de cultivos organotípicos (0, 1, 3 y 7 días). Los genes elegidos en este estudio han sido: Axin-1; Axin-2; Ctnnb1 ( $\beta$ -catenina); c-Myc; c-Jun; Ccnd1 (ciclina D1); Ppar $\gamma$ ; Notch-1; y Vegf.

3.- Valorar la modulación por antidepresivos clásicos como la venlafaxina frente al agonista de receptores 5HT<sub>4</sub>, el RS67333, sobre la actividad Ppar $\gamma$  en extracto nuclear del hipocampo de cultivo de rodajas de cerebro.

4.- Estudiar la asociación, en humano, entre SNPs de genes candidatos de la vía wnt/ $\beta$ -catenina y AKT1 y los trastornos depresivos o bipolares, partiendo de muestras humanas de sujetos control y pacientes diagnosticados de alguno tipo de trastorno depresivo o trastorno bipolar según criterios del DSM IV



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1.- Estudios en animales

### 1.1.- Animales de experimentación

Como animal de experimentación, se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*) postnatales de P2 para cultivos primarios de células madre neuronales (NSC) y P7-P8 para cultivos organotípicos. Hasta su utilización en el experimento, los animales se mantiene con la madre estabulados bajo condiciones estándar de luz (ciclos de luz-oscuridad de 12 horas), temperatura ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y humedad relativa (60-70%) y con agua y dieta *ad libitum* (pienso A04 para dieta de mantenimiento de ratas, SAFE, Francia).

El cuidado de los animales y los protocolos de investigación fueron aprobados por el Comité de Bioético de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria siguiendo la legalidad vigente española (RD 1201/2005) y las directivas internacionales (86/609/EEC).

El número de animales empleados fue de 32 para cultivos organotípicos y de 12 para cultivos primarios.

#### 1.1.1.- Cultivos organotípicos

El procedimiento para la elaboración de los cultivos organotípicos se realizó siguió el método de Stoppini *et al.* (1991), y se esquematiza en la Figura 13.

Todo el proceso se llevó a cabo en un ambiente estéril dentro de una campana de flujo laminar (TELSTAR, AV-100). Todo el instrumental fue esterilizado antes del procedimiento en autoclave y posteriormente, durante el procedimiento mediante un esterilizador de mesa (Steri 250). Los

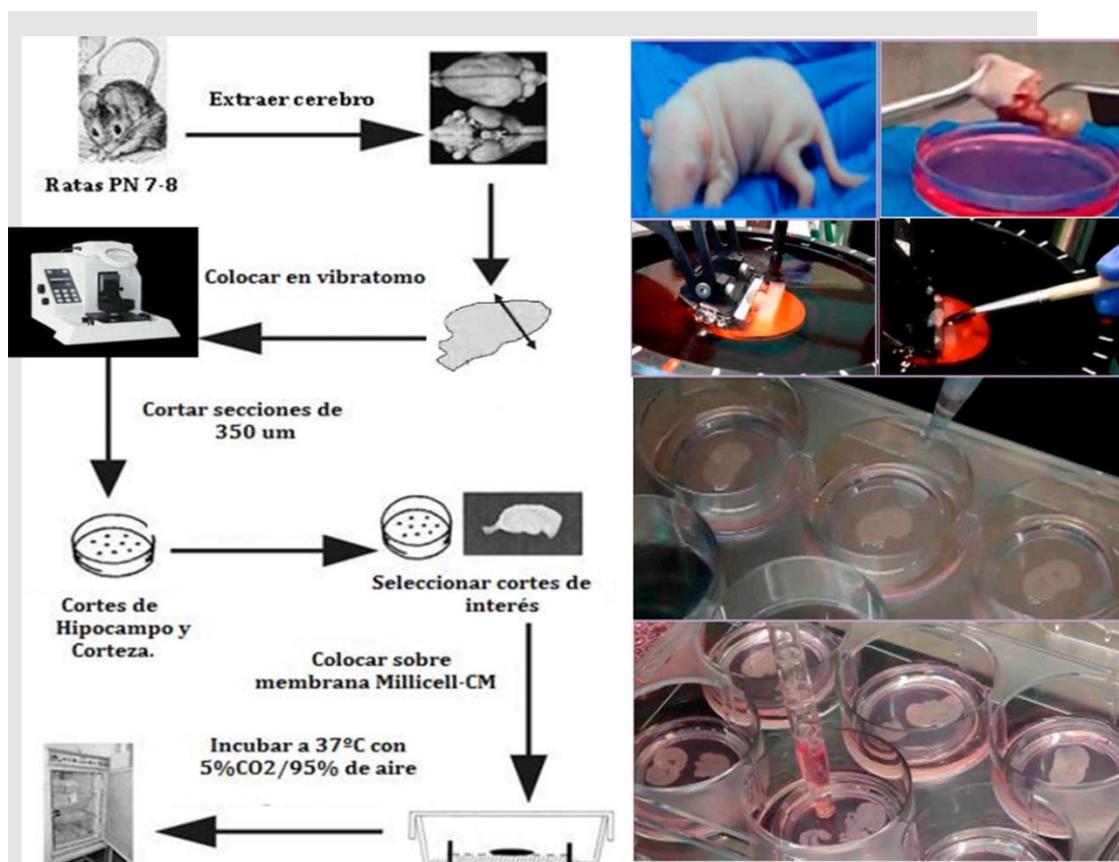


Figura 13.- Esquema del proceso de obtención de cultivo organotípicos de sistema nervioso central.

reactivos utilizados durante el proceso fueron obtenidos de casas comerciales ya estériles –Gibco BRL- o bien fueron filtrados mediante membranas *Millipore* de 0,22µm de diámetro de poro.

Para la obtención de rodajas de cerebro, se utilizaron ratas Sprague-Dawley P7/P8. Tras su decapitación, los cerebros de los animales fueron rápidamente extraídos y se mantuvieron en placas de *petri* con medio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM, Gibco BRL) suplementado con 0,1% de penicilina (10000 U/ml), estreptomycin (10000 U/ml) y anfotericina B (25 µg/ml) una solución antibiótica y antimicótica (Gibco,BRL 15240-062 almacenado a -20°C), este proceso se realiza a 4°C.

Las rodajas de cerebro se obtuvieron mediante vibrátomo (MICROM HM650V). El cerebro se adhirió al soporte con cianocrilato (Superglue) por los polos frontales, reclinado sobre un bloque de agar que servir de apoyo durante el posterior corte. Todo el proceso se realizó con el cerebro sumergido en DMEN a 4°C. Se cortaron secciones en el plano coronal de 300µm de grosor y se seleccionaron los cortes coronales a nivel del hipocampo (Figura 14).

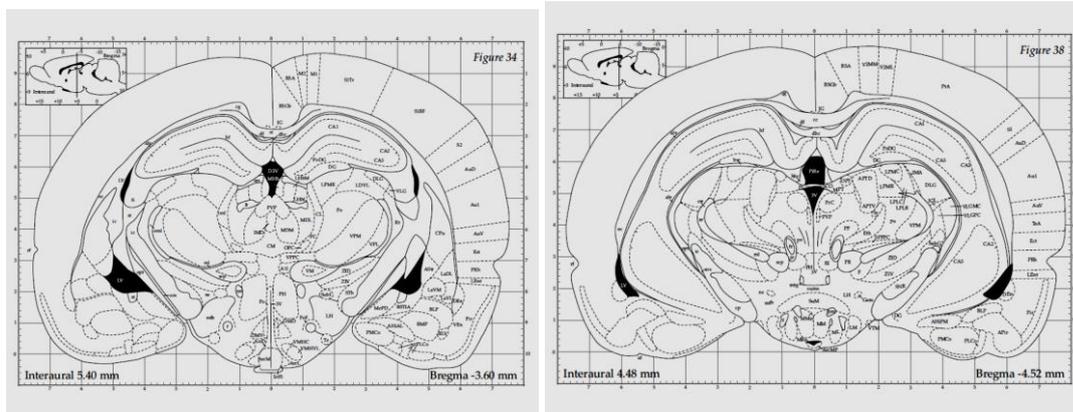


Figura 14. Ilustración de los niveles de hipocampo seleccionados para los cultivos organotípicos. Fig.34-38, The rat Brain by George Paxinos and Charles Watson,

Las secciones seleccionadas niveles de Bregma -3.6 mm a Bregma -4.52 mm (Rat Brain Praxinos and Watson), se depositaron sobre membranas Millicell de 0.4 µm (Millipore, PIC50ORG) colocadas en placas de seis pocillos (Iwaki) con 1ml de medio nutritivo específico (50% de medio basal Eagle, 25% de suero de caballo, 25% de solución salina de Hank, 0,5 mM de glutamina, 1% de glucosa 1mM, penicilina (10000 U/ml), anfotericina B (25 µg/ml) y estreptomycin (10000 U/ml)). Tras el proceso las placas se trasladaron a un incubador de CO<sub>2</sub> con parámetros controlados, 37°C; 0,5% CO<sub>2</sub> y 98%HR (Heraeus, Thermo). Las rodajas de cerebro se mantienen durante 7 días para su estabilización antes de comenzar con los tratamientos farmacológicos, con cambios de medio de cultivo cada dos días.

Al inicio del cultivo las secciones son de 350 µm, durante el proceso de estabilización y tratamiento, las secciones se aplanan hasta aproximadamente 150 µm.

### 1.1.2.- Cultivos primarios de células madre neuronales de hipocampo

Para la obtención de células madre neuronales (NSC) de hipocampo (ver Figura 15), se utilizaron ratas P2 (n=4-6 animales por cada cultivo). Previa decapitación, extracción de los cerebros y separación de los hemisferios, los hipocampos se recolectaron en placa P30 con medio L-15 (Gibco, BRL 11415), se trasladaron a cabina de flujo laminar y se eliminaron los plexos y meninges.

El tejido se transfirió a una nueva placa P30 con solución L-15, donde se troceó cada hipocampo. El hipocampo así troceada se pasó a un tubo de 50 ml y se centrifugó (5 minutos a 300xg) para sedimentar el tejido y retirar el sobrenadante. Se añadieron 3-5 ml de solución enzimática (0.1% Papaína (Sigma, P4762), 0.1% Dispasa II (Sigma, D4693), 0,01%DNAasa I (20000 U/100ml Roche11284932001), y se realizaron cuatro ciclos de disgregación mecánica, incubando cada ciclo durante 10 minutos a 37°C.

Posteriormente las células se traspasaron a un tubo de 15 ml y se centrifugan durante 5 minutos a 1000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó tres veces con 2 ml de medio neurobasal completo (Neurobasal A (Gibco, BRL 10888-022) suplementado con un 2% de B-27 (Gibco, BRL 17504-0449), 2% de penicilina/estreptomicina (SigmaP4458) y 4% Ciprofloxacina (Fluka 17850) a 37°C. Tras los lavados, las células se resuspendieron en medio neurobasal completo.

Se determinó la viabilidad celular en cámara de Neubauer y se sembraron las células en placas de 24 pocillos recubiertos con laminina a una densidad de 100.000 células por pocillo. La ciprofloxacina se mantuvo en el medio de cultivo durante 2 semanas. El medio de cultivo se cambió cada 4 días. El objetivo es obtener a partir del extracto celular de neuronas de hipocampo un cultivo celular homogéneo de mediana densidad.

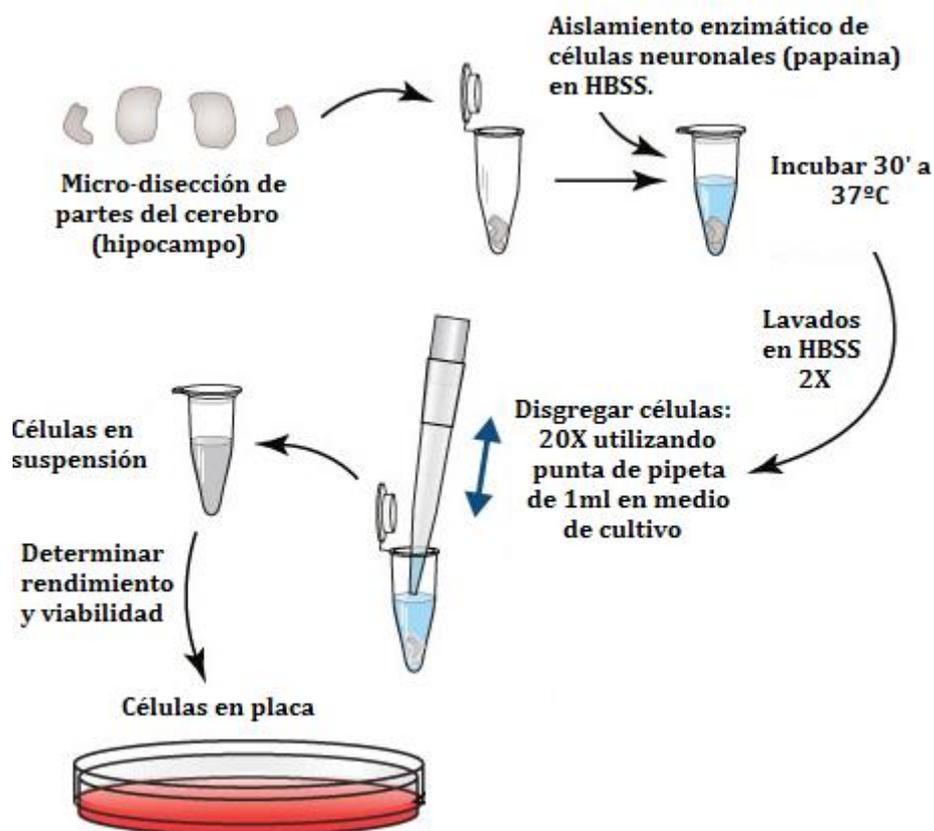


Figura 15.- Esquema proceso de obtención de cultivos primarios de células madre neuronales de hipocampo

## 1.2.-Selección de genes candidatos

Partiendo de bases de datos bibliográficas se seleccionaron posibles genes target o blanco relacionados con la vía de señalización de *Wnt/β-catenina* y vías relacionadas o de interés pero menos estudiadas como *NOTCH* y *VEGF*. Esta búsqueda se realizó en bases de datos públicas como Pubmed y *Gene* del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information, EE. UU.), ALFRED, Medline, y GENSCAN. A partir de los datos existentes se generó el interactoma empleando el software Cytoscape. Finalmente, los datos de microarrays publicados se cruzaron con los proteómicos dando como resultado un conjunto de genes en los cuales hay intersección.

En la Figura 16 observamos un interactoma que integra información parcial obtenida en diferentes experimentos o análisis de expresión génica, presentando una recopilación de las relaciones de pareja que tomadas en conjunto, representan un gráfico donde los nodos en negro son los genes de interés, los nodos en gris son genes que actúan como nexo de unión, y los ejes son las interacciones. El tamaño del nodo está relacionado directamente con el número de interacciones de las que participa. VEGF queda fuera de la red del interactoma pero aun así se seleccionó en función de la bibliografía que la respaldaba como vía asociada a la de *Wnt-β-catenina*.

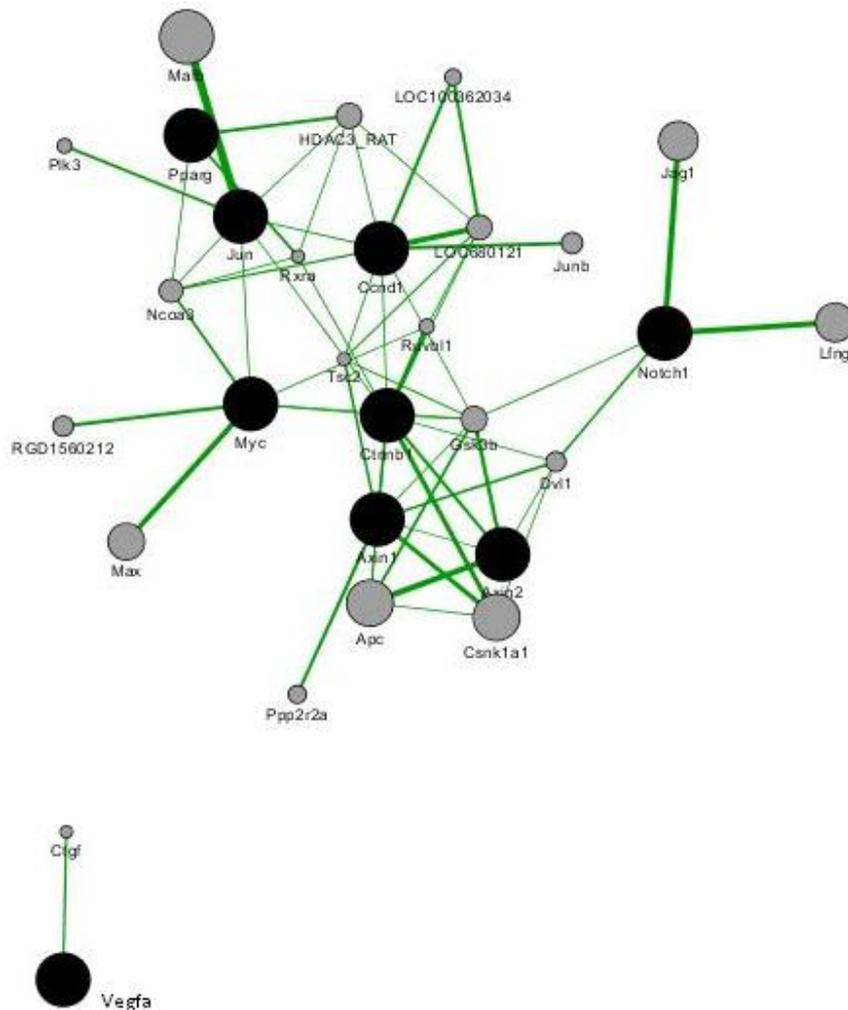


Figura 16.- Interactoma. Mediante Cytoscape 2.3.2 plugin específico para especie (<http://www.cytoscape.org>) se analizaron las redes de interés y se identificaron posibles genes candidatos en rata.

### 1.3.- Tratamientos Farmacológicos

Uno de los objetivos de este trabajo era evaluar las modificaciones en la expresión de genes en el hipocampo y la corteza de cultivos organotípicos y en células madre neuronales (NSC) por distintos fármacos antidepresivos que han demostrado diferencias temporales en el comienzo de la eficacia clínica. Así, se valoró el efecto de un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS) la fluoxetina, un inhibidor dual de la recaptación de serotonina y noradrenalina (ISRN), la venlafaxina y un agonista parcial del receptor 5-HT<sub>4</sub>, el RS 67333. Debido a la alta toxicidad de la dosis de 10 $\mu$ M de fluoxetina en los cultivos organotípicos y en las NSC, se incluyó en el estudio un segundo inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, la paroxetina

#### 1.3.1. Tratamiento de cultivos organotípicos

En el caso de tratamientos en secciones de cultivos organotípicos, se ensayaron dos dosis diferentes 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M de cada fármaco durante 1 día, 3 días y 7 días. Todos los antidepresivos se administraron en el medio de cultivo.

En la Figura 17 se muestra el diagrama de Gantt con la planificación del tratamiento farmacológico de los cultivos organotípicos. El día 1 corresponde a la realización del cultivo, su estabilización durante 14 días. Los tratamientos farmacológicos realizados fueron fluoxetina 1 $\mu$ M; paroxetina 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M; venlafaxina 1  $\mu$ M y 10 $\mu$ M y RS 67333 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M durante 1, 3 y 7 días. Cada fármaco se diluye en medio de cultivo, el medio de los cultivos se cambió cada 2 días

añadiendo nuevamente fármaco. Al finalizar el tratamiento farmacológico, las secciones se separan manualmente de la membrana, se disecciona el hipocampo y la corteza y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Cada muestra de hipocampo y corteza analizada corresponde al pool de dos rodajas de aproximadamente  $150\ \mu\text{m}$  de espesor cultivadas en el mismo pocillo y sometidas al mismo tratamiento.

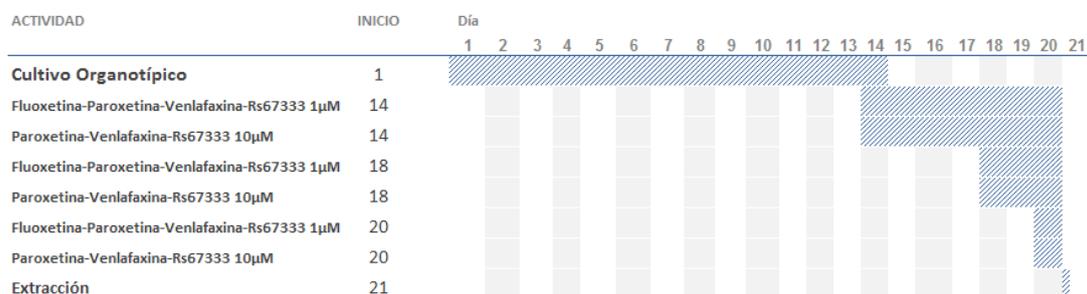


Figura 17.- Diagrama de Gantt en el que se presenta la planificación del tratamiento farmacológico en cultivos organotípicos. El día 1 corresponde a la realización del cultivo, del día 1 al 14 su deja estabilizar el cultivo y el día 14 se comienzan los tratamientos: Fluoxetina  $1\ \mu\text{M}$  o  $10\ \mu\text{M}$ ; Paroxetina  $1\ \mu\text{M}$  o  $10\ \mu\text{M}$ ; Venlafaxina  $1\ \mu\text{M}$  o  $10\ \mu\text{M}$  y RS 67333  $1\ \mu\text{M}$  o  $10\ \mu\text{M}$ . La extracción implica la separación de los cortes de la membrana y el inmediato procesamiento en función de la técnica que se realizará a continuación.

### 1.3.2. Tratamiento de los cultivos primarios de células madre neuronales de hipocampo

En las NSC de hipocampo, se utilizó una dosis de  $1\ \mu\text{M}$  de cada uno de los fármacos, fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333 durante 1 hora, 4 horas, 16 horas, 1 día y 3 días. Una vez finalizados los tratamientos farmacológicos, las células fueron procesadas para valorar la expresión génica o para los estudios de inmunofluorescencia y proliferación Figura 18

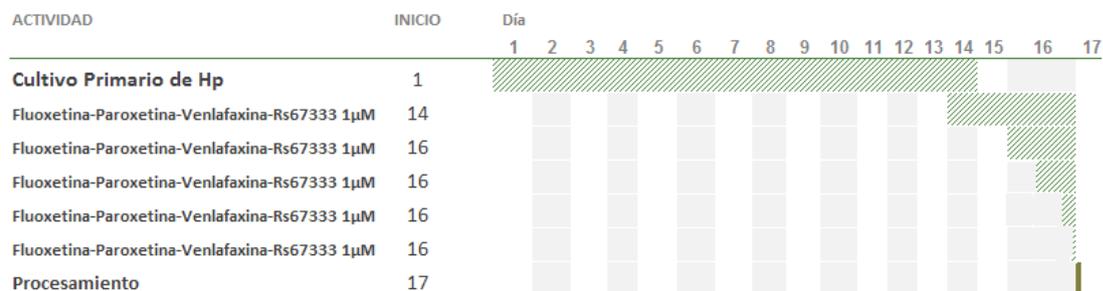


Figura 18.- Diagrama de Gantt en el que se presenta la planificación del tratamiento farmacológico en cultivos primarios de células progenitoras de hipocampo. El día 1 corresponde a la realización del cultivo, desde el día 1 hasta el día 14 se deja estabilizar el cultivo y el día 14 se comienzan los tratamientos: Fluoxetina  $1\ \mu\text{M}$ ; Paroxetina  $1\ \mu\text{M}$ ; Venlafaxina  $1\ \mu\text{M}$  y RS 67333  $1\ \mu\text{M}$ .

## 1.4.- Extracción de ARNt y retrotranscripción (RT)

La extracción de ARN total (ARNt), tanto para secciones de tejido provenientes de cultivos organotípicos, como para los cultivos primarios de células madre neuronales de hipocampo, se realizó mediante el reactivo TRI Reagent® siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### 1.4.1. Extracción de ARNt de los cultivos primarios de células madre neuronales de hipocampo

En el caso de los cultivos primarios de células madre neuronales de hipocampo, se extrajo el medio de cultivo, y las células se lisaron con TRI Reagent® (Figura 19) según la cantidad de células ( $250\ \mu\text{l}$  para 300.000 células en placa de seis pocillos durante 5 min a  $T^{\text{a}}$  ambiente) se homogeneizó varias veces con pipeta y se recolecto en microtubos libres de RNAsa. Se añadieron  $200\ \mu\text{l}$  de cloroformo, se agitó durante 15 s y se incubó 5 min a  $T^{\text{a}}$  ambiente. La fase acuosa, donde se encuentra el RNA se obtuvo por centrifugó a  $12000\ \text{rpm}$  ( $13400\ \text{g}$ ) durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se transfirió a otro tubo libre de RNAsa con  $500\ \mu\text{l}$  de isopropanol. El RNA se precipitó incubando

durante 10 min a temperatura ambiente y centrifugando a 12000 rpm (13400 x g) durante 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet con el RNA se lavó con etanol al 75% (en H<sub>2</sub>O-DEPC) y se centrifugó a 12000 rpm (13400 g) durante 5 min a 4 °C. El RNA se dejó secar, se disolvió en 25 µl de H<sub>2</sub>O DEPCes. Una vez extraído, el ARN se incubó con ADNasa I (0,5 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C para prevenir la posible contaminación de ADN. La integridad del ARN obtenido se comprobó mediante gel de agarosa al 1%. La concentración y pureza del ARN total se determinó midiendo el ratio de absorbancia 260/280 nm de las alícuotas de ARN precipitadas con etanol, utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) (NanoDrop Technologies), para estudios de PCR el ratio debe estar entre 1.6-2. En todas las muestras, tanto de cultivos organotípicos como de cultivos primarios y tanto tratadas como sin tratar, la cantidad de ARN obtenida fue similar (0,5µg/ml).

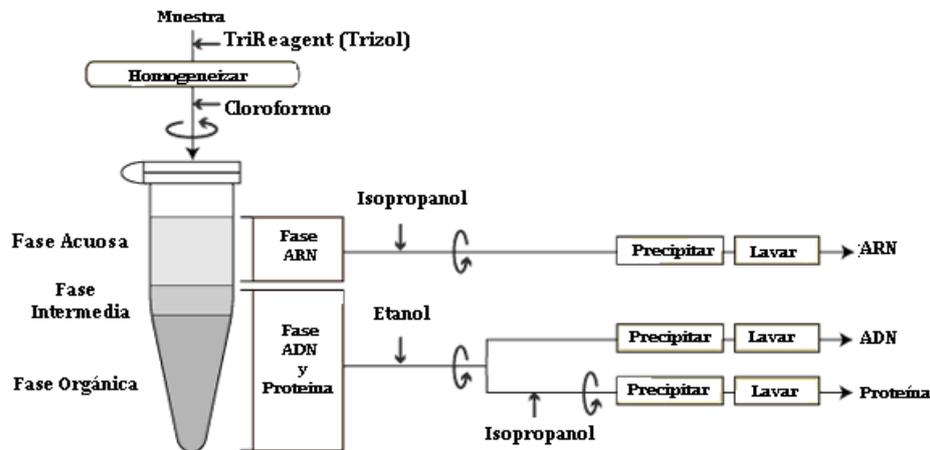


Figura 19.- Esquema de protocolo de extracción de ARN, ADN y proteína con TRI Reagent®.

#### 1.4.2. Extracción de ARN del hipocampo y la corteza de los cultivos organotípicos

En el caso de los cultivos organotípicos, la disgregación del tejido y la lisis de las células se realizó en TRI Reagent® (Sima T9424) con un homogeneizador manual en microtubos libres de RNasa, utilizando la relación 1mg de tejido/10µl de TRI Reagent® para cada pool de hipocampo y/o corteza durante 5 min a T<sup>a</sup> ambiente. A partir de este punto el proceso es igual al descrito en el caso de los cultivos primarios de células madre neuronales de hipocampo.

#### 1.4.3. Retrotranscripción (RT)

La retrotranscripción (RT) se realizó mediante cebadores aleatorios ("random hexamer primers") utilizando 600 ng de ARN total como molde y el kit *High Capacity cDNA Reverse* (Applied Biosystems), donde se siguieron las recomendaciones del fabricante, los ciclos de tiempo y temperatura se especifican en la Tabla 9.

Tabla 9.- Programa de termociclado para RT optimizado para la utilización del *High Capacity cDNA Reverse* para un volumen de reacción de 20µl en el termociclador *Thermal Cycler 2720* de Applied Biosystems.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
<b>Temperatura (°C)</b>	25	37	85	4
<b>Tiempo</b>	10 min	120 min	5 min	∞

### 1.5.- Determinación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real

Tras la retrotranscripción, el ADN complementario (ADNc) se diluyó (1:10) en agua milliQ estéril y se utilizó como molde en los ensayos de PCR en tiempo real. Las secuencias de ARNm se obtuvieron por medio de búsqueda bibliográfica y del GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Los cebadores se diseñaron utilizando el programa *Primer Express* y todos ellos se seleccionaron de modo que entre el cebador directo y el inverso hubiera una secuencia intrónica para asegurar la ausencia de contaminación genómica. Las secuencias de los cebadores utilizados en esta tesis se indican en la Tabla 10.

Tabla 10: Secuencias de los cebadores utilizados en este estudio así como su número de acceso en GenBank.

Nombre del gen	Símbolo	Secuencia 5'-3'	# Acceso
β-catenina	<i>Ctnnb1</i>	f: TGAAGGTGCTGTCTGTCTGC r: GCTGCACTAGAGTCCCAAGG	NM_053357.2
Axin1	<i>Axin1</i>	Rn_Axin1_1 SG Quantitect Primer Assay (QIAGEN)	NM_024405.1
Axin2	<i>Axin2</i>	Rn_Axin2_1 SG Quantitect Primer Assay (QIAGEN)	NM_024355.1
Jun oncogen	<i>Jun</i>	f: AAGAACACAAAGCAGGGAGG r: GGGAGTTCATCCGCAATCTA	NM_021835.3
c-myc	<i>Myc</i>	f: CAGGCCCTGTGAGCGAT r: CTTTCTTCGGTTTCTGCACTT	NM_012603.2
Ciclina D1	<i>Ccnd1</i>	f: CACAACGCACTTTCTTTCCA r: GACCAGCCTCTTCCTCCAC	NM_171992.2
Notch1	<i>Notch1</i>	f: AGCCCCTCTCCATTA AAAACA r: CCGCCTTACAGGACACATTGA	NM_01105721.1
VEGF	<i>VEGF</i>	f: CCCTGGCTTTACTGCTGTAC r: TCTGAACAAGGCTCACAGTG	NM_031836.1
Ppary	<i>Pparg</i>	f): AGGATTCATGACCAGGGAGTT r): AGCAAACCTCAAACCTTAGGCTCCAT	NM_013124.1

Como marcador de fluorescencia en los ensayos de PCR en tiempo real se utilizó *SYBR® Green contenido en la Master Mix PCR* (Applied Biosystems® 4309155) y la amplificación se realizó en el termociclador *Abi Prism 7500* (Applied Biosystems®).

Las condiciones de trabajo utilizadas en los ensayos de PCR fueron:

50°C durante 2 minutos (activación de la Taq polimerasa).

95°C durante 10 minutos (desnaturalización del ADN).

40 ciclos de 15 minutos a 95°C y 1 minuto a 60°C (desnaturalización, elongación e hibridación).

15 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C y 15 segundos a 95°C (curva de disociación para comprobar que los cebadores son específicos del fragmento que se desea amplificar).

Los incrementos en fluorescencia producida durante el proceso de amplificación se analizaron con el programa *Sequence Detector*. Como gen de referencia para la normalización se utilizó la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), al ser el gen que permaneció más estable en las distintas condiciones experimentales.

## **1.6.- Ensayos de inmunofluorescencia**

### **1.6.1.- Ensayos de inmunofluorescencia en cultivos primarios de progenitoras neuronales de hipocampo**

#### **1.6.1.1. Preparación de cubreobjetos de 12 mm**

Los cubreobjetos se mantuvieron en etanol al 70% durante 24 hs, luego realizaron dos lavados en H<sub>2</sub>O destilada, y se colocaron en placas de 12 pocillos, se les añadió 1ml de laminina (10 µg/ml en PBS) y se dejó incubando durante 2 horas a 37°C en incubador. La laminina se retira y los cubres recubiertos son lavados tres veces con H<sub>2</sub>O destilada, y posteriormente se dejaron secar durante 30 min en la campana de flujo laminar con la placa destapada previamente a la siembra. A las 24 horas de sembrar las células, se inician los tratamientos con antidepressivos según el esquema de la Figura 18

Al finalizar el tratamiento farmacológico, se retira el medio y se lavan las células dos veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se fijan con paraformaldehído al 4% durante 1 hora a 4°C y posteriormente se lava con PBS y se conservan en PBS a 4°C hasta el inicio del marcaje.

Para la inmunofluorescencia, las células se lavan tres veces durante 5 minutos en agitación con PBS y se incuban en solución de bloqueo (0,2% de Tritón X-100 al y 5% de suero de burro en PBS, pH 7,4) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron con anticuerpo primario anti-β catenina (mouse 1:500 BD Biosciences) toda la noche a 4°C en agitación en solución de bloqueo.

Los cultivos se lavaron 3 veces durante 5 minutos con agitación en PBS y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, con el anticuerpo secundario Alexa 568 Donkey anti-mouse (Alexa Fluor® 568 A10037) diluido (1:500) en solución de bloqueo.

Tras tres lavados de 5 minutos en agitación con PBS, las células se incubaron con DAPI (1 mg/ml) durante cinco minutos a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo tres veces durante 5 minutos en PBS. Los cubreobjetos con las células se montaron sobre portas gelatinizados con Vectashield. La especificidad de la reacción fue controlada mediante la incubación en paralelo de un cultivo celular en ausencia del anticuerpo primario.

#### **1.6.1.2. Fijación e inmunofluorescencia**

### **1.6.2.- Ensayos de inmunofluorescencia en cultivos organotípicos**

Los ensayos de inmunofluorescencia en las secciones de cerebro, se realizaron por el sistema de secciones libres flotantes utilizando secciones de 150 µm de cultivos organotípicos.

Al finalizar los tratamientos farmacológicos, las secciones de cerebro se lavaron tres veces en 200µl de PBS durante 5 minutos con agitación y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 1h a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron de nuevo en PBS (tres veces en 200µl) y se incubaron en Tritón X-100 al 1% en PBS durante toda la noche a 4°C para su permeabilización. Tras tres lavados de cinco minutos con 200µl de PBS, se incubaron durante treinta minutos a temperatura ambiente con HCl 2N, se lavaron, se soltaron de sus respectivas membranas y se incubaron posteriormente con tetraborato sódico 0,1M durante diez minutos a temperatura ambiente. Tras otros tres lavados de 5 minutos en agitación con 200µl de PBS, las secciones se incubaron con la solución de bloqueo (20% de albúmina sérica bovina (BSA) y 0,1% de Tritón X-100 en PBS) durante una hora a temperatura ambiente y la incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C en agitación en 1% de suero de burro y 0,1% de Tritón X-100 en PBS. Se utilizó los siguientes anticuerpos primarios:

Anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ki67 (1:500 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

Anticuerpo monoclonal de cabra anti-Sox2 (1:200 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las secciones se lavaron 3 veces durante 5 minutos en PBS con agitación y se incubaron con los anticuerpos secundarios (Alexa 568 anti-conejo; 1:1000 y Alexa 488 anti-cabra; 1:1000) durante tres horas a temperatura ambiente en 1% suero de burro y 0,1% de Tritón X-100 en PBS.

Tras la incubación, las secciones se lavaron en 200µl PBS 1x cinco veces durante 5 minutos y se incubaron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1 mg/ml) durante cinco minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces durante 5 minutos 200µl de PBS y se montaron sobre portas gelatinizados por el "método de montaje en puente" con Vectashield (Vector). La especificidad de la reacción fue controlada mediante la ausencia del anticuerpo primario en una de las secciones.

## **1.7.- Estudios de proliferación in vitro de células progenitoras tratadas con antidepresivos.**

### **1.7.1- Preparación para los estudios de proliferación**

Para cuantificar el ratio de proliferación celular, utilizamos la cuantificación de la incorporación de BrdU, mediante el Kit de quimioluminiscente *Cell Proliferation ELISA, BrdU* (Roche Diagnostics). El fundamento de este test es la incorporación de BrdU, un análogo de la pirimidina, a las nuevas células sintetizadas ocupando el lugar de la timidina. Después de esta incorporación en el ADN, el BrdU es detectado por quimioluminiscencia.

El protocolo seguido fue:

Las NSC de hipocampo se cultivan en una placa de 96 pocillos en medio de cultivo completo, a una densidad de  $10^4$  células/pocillo, a 37°C en una atmósfera del 90% humedad y con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células se trataron durante 1 h, 4 h, 16 h, 24 h y 72 h con 1 µM de paroxetina, venlafaxina y RS6733, en un volumen final de 100 µl/pocillo. Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces y cada fármaco y tiempo fue ensayado por triplicado en cada experimento.

Una vez finalizados los distintos tratamientos, se añaden 10 µl/pocillo de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) a una concentración final de 10 µM y las células se dejan incubar 12 horas a 37°C.

Transcurrido este tiempo, se aspira el medio de cultivo de todos los pocillos y se añaden 200 µl/pocillo de Fix Denat y se incuba 30 min a 15-25 °C con el fin de fijar las células.

A continuación, se aspira el Fix Denat, se añade 100 µl/pocillo de solución del anticuerpo Anti-BrdU y se incuba 2 h a 15-25° C. El Anti-BrdU se une así al BrdU incorporado al ADN.

Finalmente, se realizan tres lavados con 200-300 µl/pocillo de solución de lavado y se añaden 100 µl/pocillo de solución de revelado y se deja incubar 5 min a 15-25 °C.

La reacción se cuantifica con la medición de la quimioluminiscencia usando un lector de microplacas multidetector, Mithras LB 940.

Los valores de quimioluminiscencia obtenidos se correlacionan con la cantidad de síntesis de ADN y por lo tanto, con la proliferación de las células en los cultivos.

Como control de marcajes no específicos se usaron pocillos con medio de cultivo solo y células incubadas con anti-BrdU en ausencia de BrdU.

## **1.8.- Determinación de actividad transcripcional de PPAR $\gamma$ .**

### **1.8.1.- Obtención de extracto nuclear y citosólico**

La determinación de la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$  se realizó en la fracción nuclear de los cultivos organotípicos tratados durante 7 días con los distintos antidepresivos mediante kit de ELISA (Cayman Chemical Europe). Después del tratamiento, las secciones fueron retiradas de los

insertos y se incubaron en tampón de lisis durante 15 min a temperaturas ambientes y disgregadas mecánicamente.

La extracción de los núcleos, se realizó según el método de Schreiber (1989) con algunas modificaciones: se aislaron las muestras de corteza cerebral e inmediatamente se homogenizó el tejido con una pipeta en 300µL de tampón HEPES 10mmol/L a pH 7,9 con cóctel de inhibidores de proteasas (Roche), EDTA (1mM), EGTA (1mM), KCl (10mM), NaF (5mM), NaVO<sub>4</sub> (1mM), sacarosa (0.5M) y Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (10mM). Después de 15 minutos en hielo, se añadió el detergente Nonidet P-40 (Roche) a una concentración de 0,5%. Los tubos fueron cuidadosamente vorteados durante 15 segundos y se obtuvieron los núcleos mediante centrifugación a 4000g durante 5 minutos. Se separaron los sobrenadantes que se volvieron a centrifugar 5 minutos a 13000g para aislar la fracción citosólica.

Los “pellets” nucleares restantes fueron resuspendidos en 100 µL de tampón suplementado con 20% glicerol y KCl 0.4M, que se agitaron lentamente durante 30 minutos a 4°C. Los extractos de proteína nuclear fueron obtenidos tras centrifugación a 13000g durante 5 minutos, alicuotados y conservados a -80°C hasta la detección y cuantificación de la actividad transcripcional específica de PPAR $\gamma$ .

### **1.8.2.- Ensayo de actividad transcripcional de PPAR $\gamma$**

Los extractos nucleares se incuban en una placa de 96 pocillos en la que están anclados oligonucleótidos que contienen secuencias PPPE (5'-AACTAGGAAAGGTCA-3') de tal manera que el PPAR activado se une a estas secuencias PPPE, y el resto de proteínas se eliminan tras un lavado. Las tres isoformas de PPAR se unen a las mismas secuencias PPPE, por lo que se hace necesario un segundo paso consistente en un ELISA indirecto para confirmar la presencia de la isoforma  $\gamma$ . La unión del anticuerpo primario específico anti-PPAR $\gamma$  se revela con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP; horseradish peroxidase). Al añadir el sustrato de la peroxidasa se genera un producto coloreado cuantificable por espectrofotometría a 450 nm (Synergy2, BioTeK). La medición se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ensayo es específico para PPAR $\gamma$  y no reacciona de forma cruzada con otras isoformas de PPAR.

## **2.- Estudios en humano: Estudio de Genotipado**

### **2.1.- Diseño del Estudio**

Se trata de un estudio caso-control. Los casos son adultos con un diagnóstico DSM-IV de depresión (DD), depresión mayor (DM), Trastorno Bipolar (BPD) o Distimias (D). Los controles son adultos sin diagnóstico de patología neuropsiquiátrica; procedentes de una población representativa. El período de estudio fue de dos años.

#### **2.1.1- Tamaño de la muestra y cálculos estadísticos de potencia.**

Se capturaron 1273 casos de pacientes y 2834 controles a través de 7 centros clínicos de Granada, Barcelona (2), Valencia, Santander, Oviedo y Vitoria, todos ellos pertenecientes al CIBERSAM. El tamaño de la muestra se consideró suficiente para dar al estudio un poder estadístico del 90% con un nivel de significación de 0,05, y asumiendo las siguientes condiciones medias conservadoras: la prevalencia de DM del 5%, la frecuencia de alelos = 0,5, la prevalencia del factor ambiental = 0,35 (SLES), odds ratio para el factor ambiental = 2; odds-ratio de los factores genéticos = 1,5; odds-ratio de interacciones Gx E = 1,8. Los ejemplos de los cálculos anteriores se han desarrollado utilizando la QUANTO 1,1 software (Gauderman WJ, Morrison JM. QUANTO 1,1). El estudio fue aprobado por el CEIC de Granada, coordinadores del estudio. Todos los sujetos incluidos en el estudio fueron informados de la naturaleza del estudio y aceptaron su participación por escrito. El modelo de consentimiento informado se muestra en el ANEXO 1

#### **2.2.2.- Criterios de inclusión**

Los sujetos incluidos aceptaron por escrito su participación en el mismo tras la información por el médico. Los pacientes participantes fueron diagnosticados por un psiquiatra de alguno tipo

de trastorno depresivo o trastorno bipolar según criterios del DSM IV. Para el estudio de asociación se dividió a los pacientes en 5 categorías, **todos los pacientes** (TP), **pacientes con depresión** (TD), en este grupo de incluyen todos los pacientes diagnosticados de algún trastorno depresivo sin incluir el trastorno bipolar, trastornos depresiones leves (F32.0), moderadas (F32.1), y graves con o sin síntomas psicóticos (F32.2 y F32.3), trastorno depresivo no especificado (F32.9), trastorno depresivo mayor (F32.x y F33.x) y trastorno distímico (F34.1), **depresión mayor** (F32.x y F33.x) (DM), **trastorno distímico** (F34.1) (TDs) y el **trastorno bipolar** (F30.x; F31.0; F31.1; F31.2; F31.3; F31.6; F31.8; F31.9; F31.x; F34.0) (TB).

### 2.1.3.- Variables demográficas

Se recopilaron datos sobre la edad, el sexo y la educación (educación limitada, primaria, secundaria, más allá de la educación secundaria).

## 2.2.- Búsqueda de polimorfismos

A partir de un exhaustivo estudio bibliográfico se seleccionaron variantes genéticas relacionadas con la vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina que pudieran estar implicadas en depresión mayor en humanos. Esta búsqueda se realizó en bases de datos públicas como Pubmed y SNP del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information, EE. UU.), ALFRED, dbSNP, and FastSNP. A partir de los datos existentes se generó el interactoma empleando el software Cytoscape (Figura 20). Finalmente, los datos de microarrays publicados se cruzaron con los proteómicos dando como resultado un conjunto de genes en los cuales hay intersección.

En la Figura 20 observamos el interactoma que integra información parcial obtenida en diferentes experimentos o análisis de expresión génica, presentando una recopilación de las relaciones de pareja que tomadas en conjunto, representan un grafo donde los nodos en negro son los genes de interés, los nodos en gris son genes que actúan como nexo de unión, y los ejes son las interacciones. El tamaño del nodo está relacionado directamente con el número de interacciones de las que participa.

Probablemente polimorfismos de gran relevancia hayan quedado fuera de esta selección, pero la búsqueda finalizó en 2009, posteriormente se han identificado variantes muy interesantes, que se pueden incluir en futuros estudios. La identificación de polimorfismos y su posterior asociación es un proceso que previsiblemente continuará durante muchos años.

## 2.3.- Extracción de ADN

El ADN genómico de cada uno de los individuos analizados se obtuvo a partir de 10-20 ml de sangre periférica. La extracción del DNA se realizó según el método clásico de digestión enzimática con proteinasa K y purificación con una mezcla de fenol: cloroformo: isoamílico, seguido de precipitación con etanol. (Kunkel et al., 1982).

## 2.4.- Tecnología MassARRAY (SEQUENOM) Realizada por el CEGEN

La tecnología de MassArray (Sequenom; Figura 21) se basa en la detección de los productos de la reacción de discriminación alélica mediante MALDI-TOF. Existen dos estrategias de genotipado: hME y IpleGold.

En ambos casos el proceso de genotipado consta de dos reacciones. En primer lugar se amplifican fragmentos de ADN que contienen SNPs de interés mediante una PCR multiplex. A continuación se lleva a cabo la reacción de discriminación alélica, primera extensión, fase en la que se diferencian ambas estrategias.

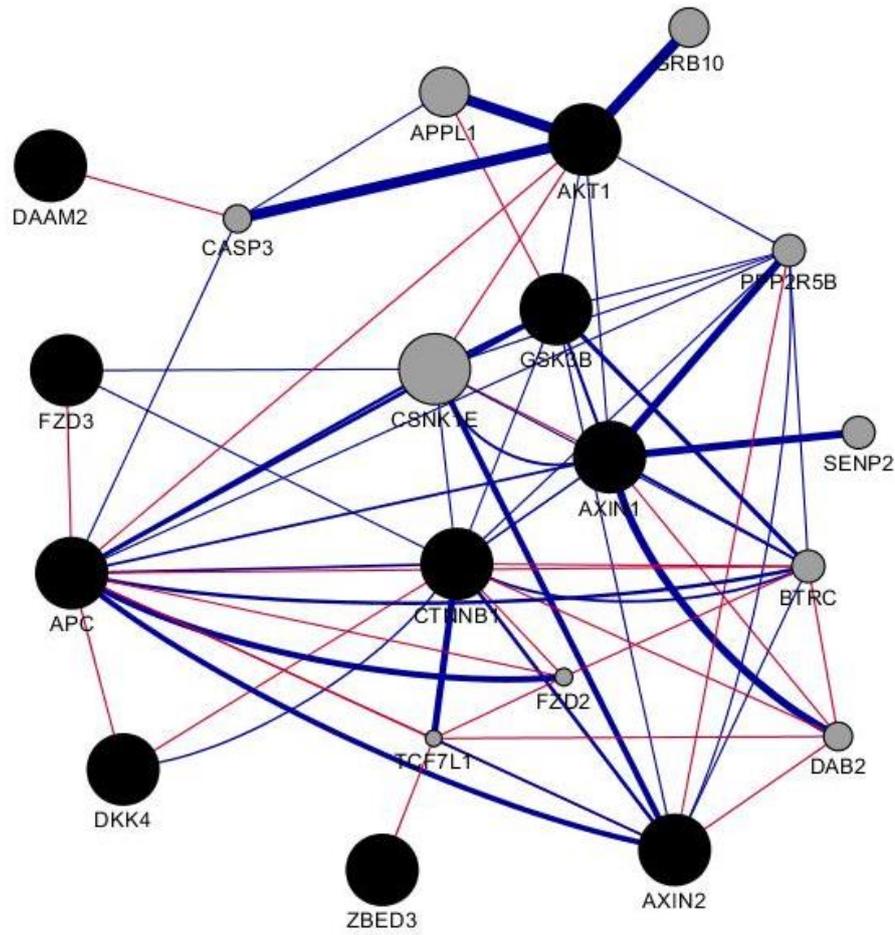


Figura 20.- Redes de genes de interés. Mediante Cytoscape 2.3.2 (<http://www.cytoscape.org>) se analizaron las redes de interés y se identificaron las conexiones principales, a partir de allí se elaboró la lista de SNPs.

En hME la discriminación alélica se realiza mediante una reacción de minisequenciación que genera productos alelo específicos que son generalmente entre 1 y 4 bases más largos que el primer MassEXTEND original. Con esta estrategia hME el número máximo de SNPs por ensayo es de 15 aunque la media se sitúa en 8, ya que depende del número de SNPs candidatos para hacer el diseño y la presencia de motivos en la secuencia, interacciones entre oligonucleótidos, etc.

En el caso de Iplex Gold todas las reacciones terminan tras una extensión de una base (Single Base Extension, SBE). Para solucionar el problema de la pequeña separación de masa entre productos de SBE iPLEX Gold incorpora terminadores con masa modificada. La eficacia del diseño de plexes aumenta debido al uso de una única mezcla de terminación. Esta modificación permite genotipar hasta 36 SNPs por ensayo, con una media de 24 SNPs.

El uso de primer de extensión con distintas longitudes permite identificar los picos de los productos de cada SNP. Las reacciones tienen lugar en placas de 384 pocillos y los productos de dichas reacciones son transferidos de forma automatizada mediante un robot a la superficie del chip que será leído en el espectrómetro, donde se pueden procesar hasta 10 chips simultáneamente.

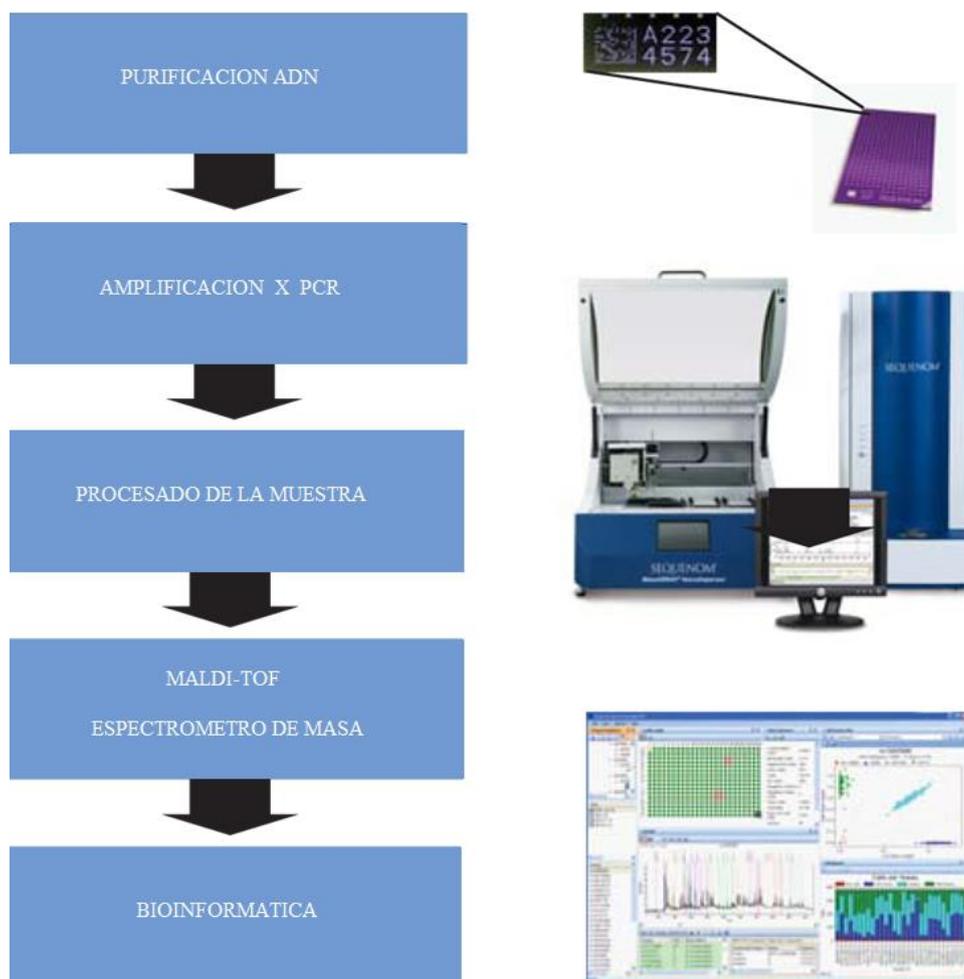


Figura 21.- Esquema del proceso de genotipado SEQUENOM MassARRAYSystem®, que permite la medición de masa directa de ácidos nucleicos.

### 3.- Cálculos

#### 3.1 Niveles de expresión génica

Antes de comenzar los ensayos se determinó la eficiencia para cada pareja de cebadores con cantidades crecientes de una muestra de ADNc. La eficiencia se calcula representando los valores de Ct frente al logaritmo de las concentraciones de ADNc utilizadas. Esto da una recta cuya pendiente se utiliza en el cálculo de la eficiencia mediante la ecuación:

$$\text{Eficiencia} = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$$

Solo se utilizaron las parejas de cebadores cuya eficiencia fue superior al 90%.

Los resultados de RT-PCR se compararon por el “método del  $\Delta\Delta\text{Ct}$ ” (Pfaffl, M.W. 2001). De este modo, los niveles de ARNm de cada gen, normalizados frente a GAPDH se expresaron como  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , mientras que el cambio relativo como consecuencia de los distintos tratamientos en los niveles de ARNm de los genes estudiados frente a los de los animales sin tratar se determinó mediante la ecuación:

$$\text{Cambio relativo} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Donde:

$$\Delta\text{Ct} = (\text{Ct gen} - \text{Ct GAPDH})$$

$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen}-Ct \text{ GAPDH})$  muestras tratadas -  $(Ct \text{ gen}-Ct \text{ GAPDH})$  muestras sin tratar (Livak,K.J. 2001).

### 3.2.- Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas y genotípicas se determinaron con las ecuaciones E1 y E2.

E1. Frecuencia del alelo  $p = A1/2n$   
Frecuencia del alelo  $q = A2/2n$

E2. Frecuencia del genotipo  $p^2 = A1A1/n$   
Frecuencia del genotipo  $2pq = A1A2/n$   
Frecuencia del genotipo  $q^2 = A2A2/n$

### 3.3.- Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se analizó el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para todas las variantes genéticas analizadas en este estudio, en casos y controles. Las ecuaciones que expresan el EHW en términos algebraicos se muestran en la ecuación E3.

La detección de las desviaciones del EHW se realizó mediante la comparación de las frecuencias observadas y las esperadas mediante la prueba estadística Chi cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ;  $p \leq 0,050$ ), con el paquete estadístico R.2.10.0 (R Project for Statistical Computing)

E3.  $p + q = 1$   
 $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

### 3.4.- Odds ratios

La razón de posibilidades (OR, por sus siglas en inglés: odds ratio) es una herramienta estadística/epidemiológica que puede utilizarse para mostrar asociaciones entre dos variables binarias. El cálculo de OR requiere la disposición de los datos en una tabla 2x2 (Tabla 9), por lo que tienen que estar formateados en forma categórica (casos/controles).

Tabla 11. Datos generales de diseño de una tabla 2 x 2.

		Variable 1	
		si	no
Variable 2	si	a	b
	no	c	d

Utilizando esta tabla, la OR puede calcularse con una simple multiplicación y división cruzadas, o sea:

$$OR = \frac{(a*d)}{(b*c)}$$

OR<1 indica una asociación "protectora", lo que significa que es poco probable que ocurra el evento.

OR=1 indica que no hay asociación entre ambas variables.

OR>1 indica que hay una asociación, siendo más fuerte como mayor sea el número.

También se puede calcular el intervalo de confianza (95 % IC) para la OR proporcionando así un rango del valor verdadero esperado.

### 3.5.- Estudio de genotipado: análisis estadístico

Las variables continuas se presentan en forma de media  $\pm$  desviación estándar en las tablas y media  $\pm$  error estándar de la media en las figuras, las variables discretas se muestran como recuentos, porcentajes o mediana [intervalo intercuartílico].

Las variables discretas se compararon utilizando la prueba de la  $\chi^2$ . Las de variables continuas se compararon con la prueba de la t de Student para datos no apareados bilateral o el análisis de la varianza (ANOVA) para varias muestras, seguido de los post tests Student-Newman-Keuls (de pruebas secuenciales) o Dunnett (T de comparación múltiple en todos los pares que compara un conjunto de tratamientos con una única media de control.. En todo los casos se aceptó una  $p < 0,05$  como significativa.

### **3.6.- Estudio de asociación: análisis estadístico**

Mediante la utilización de software SNPStats, para cada SNP, antes de realizar el estudio de asociación, comprobamos las frecuencias alélicas y el equilibrio de Hardy-Weimberg (HWE) mediante un ajuste de  $X^2$ . La hipótesis nula ( $H_0$ ) es que el SNP cumple con el HWE, por lo que necesitamos obtener p-valores mayores a 0,05.

Para evaluar el factor genético de riesgo del alelo y la patología se aplicó la razón de Momios u odds ratio (OR). Se aceptaron como estadísticamente significativos todos los valores de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos). Para testar la hipótesis nula de no asociación entre genotipos y la variable respuesta, llevamos a cabo un test de  $X^2$  con 2 grados de libertad.



**RESULTADOS:**



## Parte A. Estudios de Expresión Génica

### 1. Efecto de los fármacos antidepresivos sobre la proliferación celular

Como punto de partida al estudio del curso temporal de la expresión de genes implicados en la regulación de la neuroproliferación/neuroplasticidad por fármacos antidepresivos (fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333), valoramos el efecto de estos fármacos sobre la proliferación de células progenitoras de hipocampo en cultivo y en el hipocampo de rodajas de cerebro en cultivo.

La proliferación de células progenitoras de hipocampo en cultivo se valoró, mediante la cuantificación de la incorporación de BrdU a las células en respuesta a 1  $\mu$ M de cada fármaco. La cuantificación del BrdU incorporado se realizó con el kit comercial de quimioluminiscencia *The Cell Proliferation ELISA, BrdU* de Roche a 1, 4, 16, 24 y 72 horas del tratamiento farmacológico. Nuestros resultados (ver Figura 22) muestran un incremento significativo en la incorporación de BrdU a la hora del tratamiento con todos los fármacos estudiados (143% fluoxetina, 163% paroxetina, 210% venlafaxina y 303% RS 67333;  $F=34,3$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA). El RS 67333 es el fármaco que produce mayor incorporación de BrdU. A las 4 horas, sólo las células tratadas con RS 67333 muestran un incremento significativo en la incorporación de BrdU respecto a las células sin tratamiento (173%;  $F=6,3$ ;  $p<0,01$ ; ANOVA). No se observan diferencias en la incorporación de BrdU a las 16 o 24 horas. A las 72 horas, las células tratadas con RS 67333 muestran un segundo pico de incorporación de BrdU (171%;  $F=6,3$ ;  $p<0,01$ ; ANOVA).

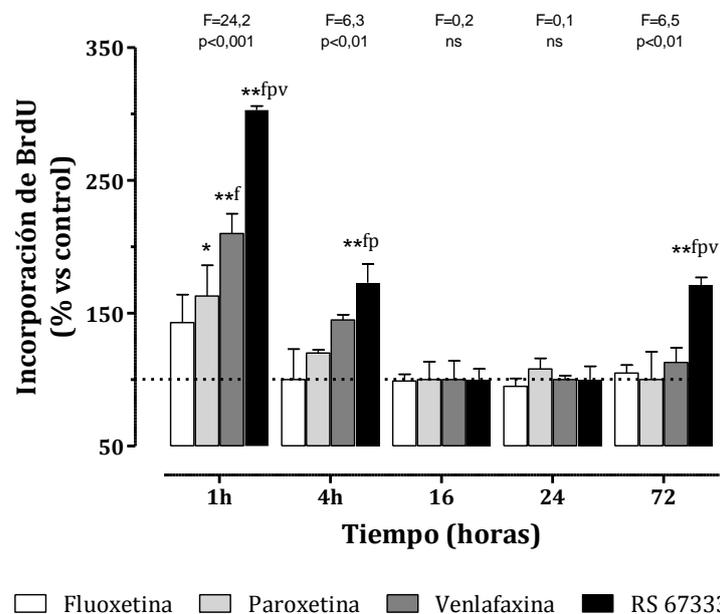
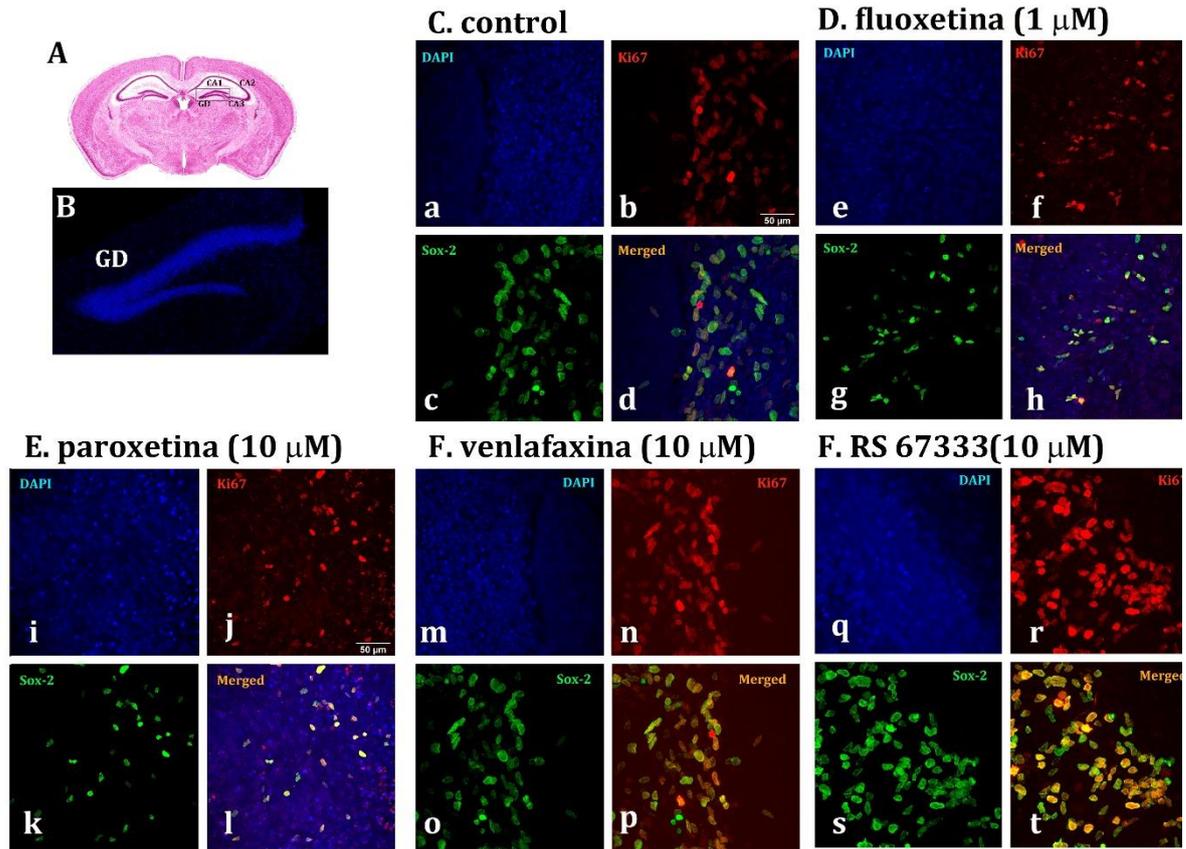


Figura 22. - Curso temporal de la incorporación de BrdU en cultivos de células progenitoras de hipocampo en respuesta 1  $\mu$ M de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333. La incorporación de BrdU se muestra en porcentaje respecto a las células control (sin tratamiento). F=ANOVA del efecto de cada fármaco en un tiempo de tratamiento; \*\*  $p<0,01$  Dunnett post test para cada fármaco vs el control. p=paroxetina, v=venlafaxina Student-Newman-Keuls post test entre los distintos fármacos.

La proliferación celular en el hipocampo de las rodajas de cerebro en cultivo, se determinó mediante inmunofluorescencia con el marcador Ki67, expresado en células en fase de división. Las células progenitoras son marcadas con Sox-2. Un día de tratamiento con 1 o 10  $\mu$ M de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina o RS 67333, no producen cambios en la proliferación (datos no mostrados). Siete días de tratamiento con 10  $\mu$ M de venlafaxina o RS 67333 producen un claro incremento en el marcaje de ki67 respecto a las células sin tratamiento. La fluoxetina a una concentración de 1  $\mu$ M o la paroxetina 10  $\mu$ M durante 7 días no produce un claro incremento en la proliferación celular en el hipocampo (ver Figura 23).

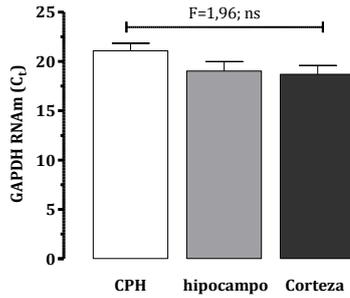


**Figura 23.-** Imagen representativa de la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo de cultivos de rodajas de cerebro sometidos a tratamiento con 1  $\mu\text{M}$  de fluoxetina o 10  $\mu\text{M}$  de paroxetina, venlafaxina o Rs76333 durante 7 días. A, corte histológico sagital de cerebro de rata mostrando las distintas partes del hipocampo (CA1, CA2, CA3 y giro dentado, GD). B. Imagen del GD con los núcleos marcados con DAPI. C. células control. D a F células tratadas con fluoxetina (1  $\mu\text{M}$ ), paroxetina, venlafaxina o Rs76333 (10  $\mu\text{M}$ ). Los núcleos aparecen marcados con DAPI (azul, a, e, i, m y q). Las células progenitoras aparecen marcadas con Sox-2 (verde, c, g, k, o y s). Las células en proliferación aparecen marcadas con Ki67 (rojo, b, f, j, n y r). Triple marcaje de DAPI, Sox-2 y Ki67 realizado con ImageJ (d, h, l, p y t). La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$  en todos los casos.

## 2. Efecto de los fármacos antidepresivos sobre la expresión de genes implicados en procesos de proliferación/plasticidad

El efecto de los fármacos antidepresivos (fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333), sobre la expresión de genes implicados en procesos de proliferación/plasticidad (*Axin-1* y *Axin-2*, *Cttnb1*, *c-Myc*, *Jun*, *Ccnd1*, *Ppar $\gamma$* , *Notch-1* y *Vegf*), se evaluó, mediante la determinación del nivel de RNAm de cada uno de los genes, en células progenitoras inmortalizadas de hipocampo (CPH) de rata y en el hipocampo y la corteza de cultivos de rodajas de cerebro de rata en respuesta al tratamiento con cada uno de los fármacos objeto del estudio.

El nivel basal de expresión de cada gen en las CPH y en el hipocampo y la corteza de las rodajas de tejido cerebral se valoró mediante el  $\Delta C_t$  calculado, en las muestras sin tratamiento, como la diferencia de  $C_t$  del gen de interés con respecto a la  $C_t$  del gen calibrador o housekeeping (GAPDH). La determinación del nivel de expresión en  $C_t$  de GAPDH no mostró diferencias entre las células CPH  $C_t=21,1\pm 0,8$ ; el hipocampo  $C_t=19,1\pm 0,9$  y la corteza  $C_t=18,7\pm 0,9$  de las rodajas de tejido cerebral (Figura 24).



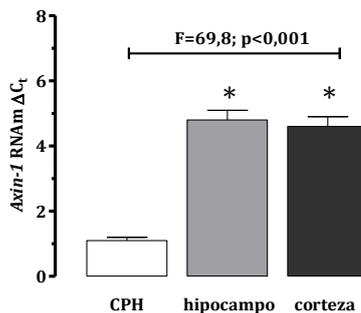
**Figura 24.-** Expresión basal de GAPDH como gen de referencia, en cultivo de células progenitoras de hipocampo y en tejido de hipocampo y corteza de cultivos de rodajas de cerebro. CPH: cultivo de células progenitoras de hipocampo. El nivel de expresión génica se expresa en Ct. F=ANOVA.

En las CPH se valoró el curso temporal de la expresión de cada gen a las 1, 4, 16, 24 y 72 horas de la exposición a 1  $\mu\text{M}$  de cada fármaco (fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333). En las muestras de cerebro, para cada uno de los fármacos del estudio se valoró, el curso temporal de la expresión de cada gen a los 1, 3 y 7 días de tratamiento, en respuesta a 1 y 10  $\mu\text{M}$  de cada fármaco, salvo para la fluoxetina debido a que la dosis de 10  $\mu\text{M}$  mostró una alta toxicidad en el cultivo organotípico.

## 2.1. Axin-1

### 2.1.1.- Expresión basal de Axin-1 en células progenitoras de hipocampo y en cerebro

En condiciones basales, las CPH expresan niveles de *Axin-1* de  $\Delta\text{C}_t=1,4\pm 0,2$  con respecto al gen calibrador (GAPDH). En hipocampo la expresión basal de *Axin-1* fue menor  $\Delta\text{C}_t=4,8\pm 0,7$  y similar a la corteza y  $\Delta\text{C}_t=4,6\pm 0,7$ . Estos datos muestran una expresión de *Axin-1*, unas 3-3,5 veces inferior en hipocampo y corteza al observado en los cultivos de CPH (Figura 25).

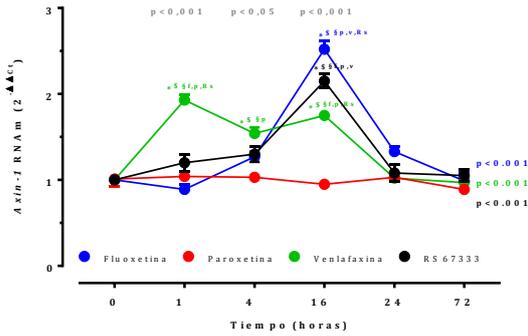


**Figura 25.-** Nivel de expresión basal de *Axin-1* en cultivo de células progenitoras de hipocampo y en tejido de cultivos de rodajas de hipocampo y de corteza. CPH: cultivo de células progenitoras de hipocampo. El nivel de expresión génica se muestra en  $\Delta\text{C}_t$ . F=ANOVA entre  $\Delta\text{C}_t$  de las CPH el hipocampo y la corteza.

### 2.1.2.- Modulación de la expresión de Axin-1 por fármacos antidepressivos

#### 2.1.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH)

El tratamiento de las CPH con 1  $\mu\text{M}$  de **paroxetina** no modifica el nivel de expresión de *Axin-1* (F=1,3; ns; ANOVA efecto de cada fármaco a lo largo del tiempo) para ninguno de los tiempos estudiados (ver Figura 26 y Tabla 12). Por el contrario, 1  $\mu\text{M}$  de **fluoxetina**, **venlafaxina** y **RS 67333** producen un incremento significativo en la expresión de *Axin-1* (F=22,7 p<0,001; F=23,2 p<0,001 y F=9,1 p<0,001, respectivamente para fluoxetina, venlafaxina y RS 67333, ANOVA efecto de cada fármaco a lo largo del tiempo, ver Figura 26). El curso temporal de la expresión de *Axin-1* es distinto para los tres fármacos. El tratamiento con fluoxetina o RS 67333 produce un incremento pequeño y no significativo en la expresión del gen (27% y 30% respectivamente para fluoxetina y RS 67333) a las 4 horas, un pico máximo a las 16 horas (152% y 115% respectivamente para fluoxetina y RS 67333) y una progresiva caída de los niveles de expresión a partir de este tiempo hasta las 72 horas (Figura 26 y Tabla 12). Venlafaxina sin embargo, produce un incremento significativo en la expresión de *Axin-1* a la hora de tratamiento (93%) manteniéndose la expresión elevada durante 16 horas (75%) para luego disminuir los niveles de expresión progresivamente hasta los tres días.



**Figura 26.-** Curso temporal de la expresión de *Axin-1* en células progenitoras de hipocampo en respuesta 1μM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333. La expresión de *Axin-1* se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . p<; p< y p< ANOVA del efecto de cada fármaco respecto al tiempo de tratamiento; \*, \* y \* p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. p< ANOVA del efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento; \$, \$ y \$ p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control para cada tiempo de tratamiento. §p<0,05 Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos, f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333 para cada tiempo de tratamiento.

Tabla 12.- Curso temporal de la expresión de *Axin-1* en células progenitoras de hipocampo en respuesta 1μM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina o RS 67333. La expresión de *Axin-1* se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

<i>Axin-1</i> células progenitoras de hipocampo							F=	p<*
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas	72 horas			
Control	1,00 ± 0,07	1,00 ± 0,07	1,01 ± 0,19	1,00 ± 0,09	1,00 ± 0,07			
Fluoxetina <sup>f</sup>	0,89 ± 0,10	1,27 ± 0,11	2,52 ± 0,18*§§p,v,Rs	1,33 ± 0,11	0,99 ± 0,16	22,7	0,001	
Paroxetina <sup>p</sup>	1,04 ± 0,05	1,03 ± 0,01	0,95 ± 0,03	1,03 ± 0,01	0,89 ± 0,02	1,3	ns	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,93 ± 0,10*§§f,p,Rs	1,54 ± 0,13*§§p	1,75 ± 0,01*§§f,p,Rs	1,02 ± 0,02	0,97 ± 0,12	23,2	0,001	
RS 67333 <sup>Rs</sup>	1,20 ± 0,17	1,30 ± 0,16	2,15 ± 0,13*§§f,p,v	1,08 ± 0,18	1,05 ± 0,12	9,1	0,001	
F <sup>2</sup> ; p<§,§	15,4	0,001	4,1	0,05	27,7	0,001	2,1	ns

F=análisis de la varianza del efecto de cada fármaco a lo largo del tratamiento, \*p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. F<sup>2</sup>: análisis de la varianza entre el efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento. § p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control en cada tiempo de tratamiento. §Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos (f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333) en cada tiempo de tratamiento.

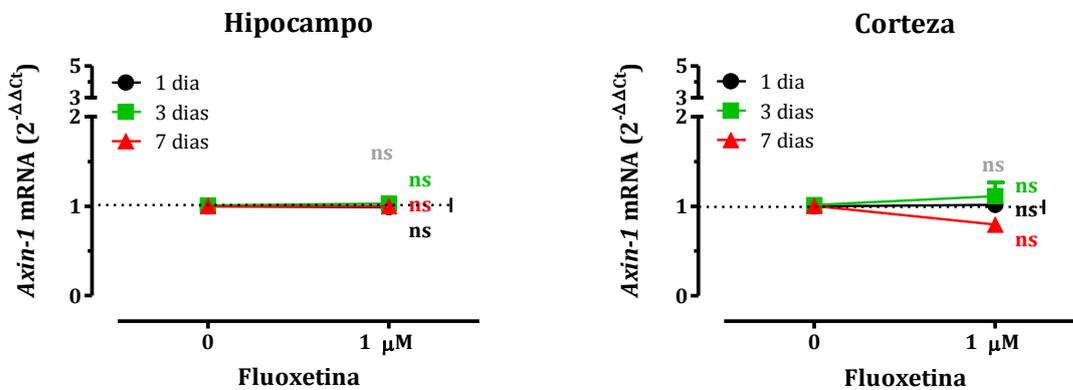
**Resumen de la expresión de *Axin-1* en CPH**

Fluoxetina, venlafaxina y RS 67333 producen un incremento significativo en la expresión de *Axin-1* en las CPH. El mayor incremento en la expresión del gen se observa, a las 16 horas del tratamiento de tratamiento con fluoxetina y RS 67333. Venlafaxina produce un efecto más precoz sobre la expresión de *Axin-1* (Tabla 12).

**2.1.2.2.- Cerebro**

**2.1.2.2.1- Fluoxetina**

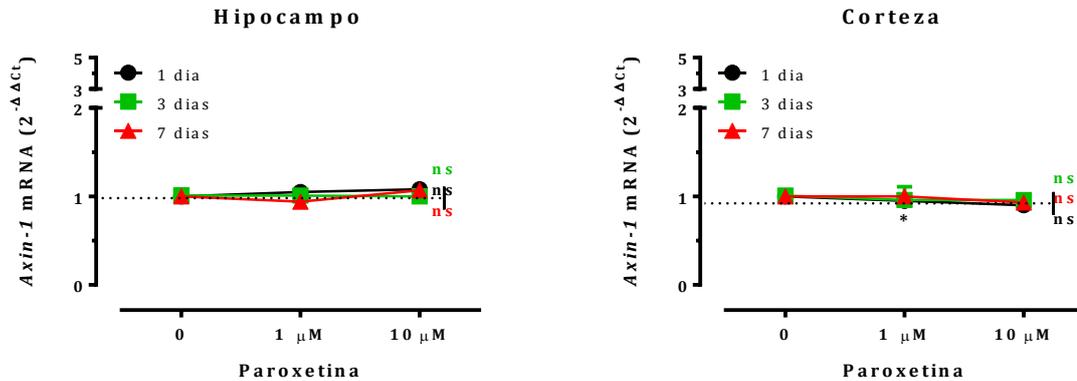
El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 μM de fluoxetina no modifica la expresión de *Axin-1* en el **hipocampo** (t=0,4; ns; t=0,7; ns y t=0,5; ns; respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento; t de Student) ni en la **corteza** (t=0,1; ns; t=0,3; ns y t=1,2; ns, respectivamente para 1, 3 y 7 días, t de Student ver Figura 27 y Tabla 13 ).



**Figura 27.-** Expresión de *Axin-1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1μM de fluoxetina. La expresión de *Axin-1* se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . ns, ns y ns t de Student. ns ANOVA para 1 μM de fluoxetina entre 1, 3 y 7 días de tratamiento.

## 2.1.2.2.2- Paroxetina

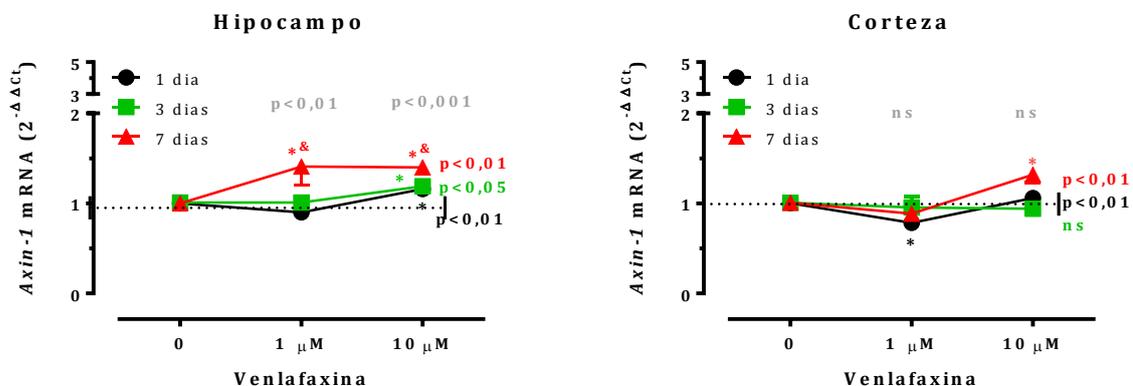
El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 o 10  $\mu\text{M}$  de paroxetina no modifica significativamente la expresión del *Axin-1* ni en el **hipocampo** ( $F=0,5$ ; ns;  $F=0,9$ ; ns y  $F=2,2$ ; ns respectivamente para 1, 3 y 7 días) ni en la **corteza** para ninguno de los tiempos estudiados ( $F=2,1$ ; ns;  $F=0,5$ ; ns y  $F=1,8$ ; ns respectivamente para 1, 3 y 7 días, ver Figura 28 y Tabla 13)



**Figura 28.-** Expresión de *Axin-1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de paroxetina. La expresión de *Axin-1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .  $p < p < p < \text{ANOVA}$  para 1 y 3 días de tratamiento.

## 2.1.2.2.3- Venlafaxina

En el **hipocampo**, el tratamiento de los cultivos organotípicos con venlafaxina modifica de forma significativa, dosis ( $F=17,2$ ;  $p < 0,01$ ;  $F=4,4$ ;  $p < 0,05$  y  $F=12,5$ ;  $p < 0,01$ ; respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA para las dosis) y tiempo dependiente ( $F=10,6$  y  $F=15,5$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente para las dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$ , ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento) la expresión de *Axin-1*. La administración de una dosis única o de 3 dosis, produce un ligero incremento de la expresión de *Axin-1* significativo solo con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  (16% y 19% respectivamente para 1 y 3 días de tratamiento,  $p < 0,05$  Dunnett post test), 7 días de tratamiento producen un mayor incremento de la expresión del gen, alcanzando los niveles máximos de expresión con la dosis de 1  $\mu\text{M}$  (41% y 40% respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,05$  Dunnett Student–Newman–Keuls post test; ver Figura 29 y Tabla 13).



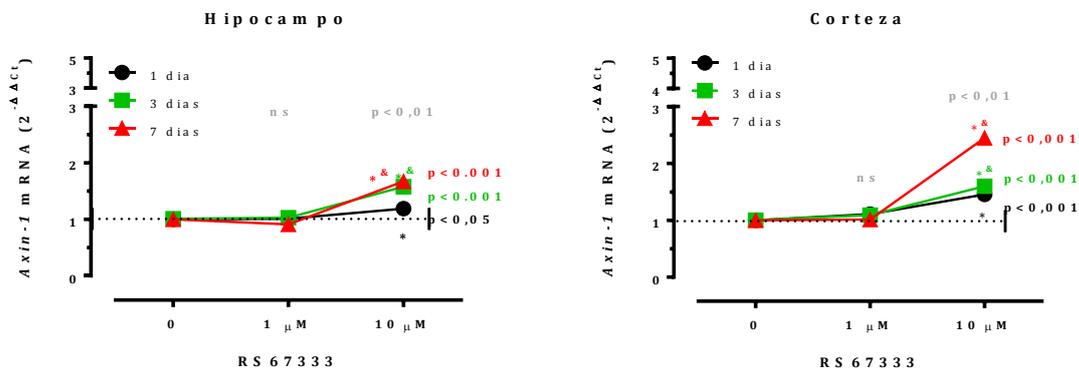
**Figura 29.-** Curso temporal y dosis-efecto de la expresión de *Axin-1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de venlafaxina. La expresión de *Axin-1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .  $p < p < p < \text{ANOVA}$  para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10  $\mu\text{M}$  venlafaxina \*, \* y \*  $p < 0,05$  Dunnett post test entre las dosis de 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p < \text{ANOVA}$  entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y &  $p < 0,05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

En la **corteza** (ver Figura 29 y Tabla 13), venlafaxina incrementa de forma significativa la expresión de *Axin-1* pero sólo tras 7 días de tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  (32%;  $F=11,4$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA para las dosis; ver Figura 29 y Tabla 13). Tres días de tratamiento no modifican la expresión de *Axin-1* ( $F=0,2$ ; ns, ANOVA para las dosis) y una dosis única de 1  $\mu\text{M}$  incluso disminuye la expresión de *Axin-1* (-22%;  $F=10,7$ ;  $p<0,01$ , ANOVA para las dosis).

#### 2.1.2.2.4- RS 67333

El tratamiento de las rodajas de cerebro con RS 67333, modificó significativamente la expresión de *Axin-1* en el **hipocampo** sólo con la dosis de 10 $\mu\text{M}$  (ver Figura 30 y Tabla 13). La dosis de 1  $\mu\text{M}$  de RS 67333 no modifica la expresión de *Axin-1* ( $F=5,2$ ; ns; ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento). Por el contrario la dosis de 10 $\mu\text{M}$  produce un incremento, tiempo dependiente ( $F=16,8$ ;  $p<0,01$  ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento), en la expresión de *Axin-1* tras 3 días (58%;  $p<0,05$  Dunnett post test) y 7 días de tratamiento (69%;  $p<0,05$  Dunnett post test).

En la **corteza** (ver Figura 30 y Tabla 13), el RS 67333, incrementa de forma tiempo dependiente, la expresión de *Axin-1*. Como en el hipocampo, 1  $\mu\text{M}$  de Rs76333 no modifica la expresión de *Axin-1* en la corteza ( $F=0,9$ ; ns ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento). La dosis de 10  $\mu\text{M}$  incrementó de forma tiempo dependiente ( $F=48,2$   $p<0,00$ , ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento) la expresión del gen (46%, 60%, y 145% respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento,  $p<0,05$  Dunnett post test).



**Figura 30.- Curso temporal y dosis-efecto de la expresión de *Axin-1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1 $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de RS 67333.** La expresión de *Axin-1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ .  $p<$ ;  $p<$  y  $p<$  ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10  $\mu\text{M}$  venlafaxina \*, \* y \*  $p<0,05$   $p<0,05$  Dunnett post test entre las dosis de 1 $\mu\text{M}$  y 10 $\mu\text{M}$  vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p<$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y &  $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

#### Resumen de la expresión de *Axin-1* en cerebro

En tejido cerebral, tanto venlafaxina como RS 67333 incrementan la expresión de *Axin-1*. El efecto del RS 67333 es más intenso y precoz (Tabla 13).

## 2.2.- Axin-2

### 2.2.1.- Expresión basal de Axin-2 en células progenitoras de hipocampo y en cerebro

En condiciones basales, no observamos diferencias significativas en el nivel de expresión de *Axin-2* entre las CPH ( $\Delta\text{Ct}=4,6\pm 1,3$ ), el hipocampo ( $\Delta\text{Ct}=5,5\pm 0,1$ ), y la corteza ( $\Delta\text{Ct}=5,8\pm 0,2$ ; ver ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

Tabla 13.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Axin-1* en hipocampo y corteza de cultivos de rodajas de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días tratamiento. La expresión de *Axin-1* se muestra en valores de 2<sup>ΔΔCt</sup>

<b>Axin-1 hipocampo</b>						<b>Axin-1 hipocampo</b>					
<b>1 día</b>						<b>3 días</b>					
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*		0	1 µM	10 µM	F=	p<*
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,05	1,03 ± 0,03		0,4	ns	Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,03	1,03 ± 0,03		0,7	ns
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,05	1,05 ± 0,37	1,08 ± 0,07	0,5	ns	Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,03	1,01 ± 0,02	1,00 ± 0,05	0,9	ns
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,05	0,90 ± 0,01	1,16 ± 0,02*	17,2	0,01	Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,03	1,01 ± 0,07	1,19 ± 0,02* <sup>§</sup>	4,4	0,05
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,05	1,01 ± 0,03	1,17 ± 0,05*	4,8	0,05	RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,03	1,03 ± 0,01	1,58 ± 0,03* <sup>§</sup>	168,4	0,001
F''=: p< <sup>§</sup>	0,3	ns	0,8	ns	0,9	ns	F''=: p< <sup>§</sup>	0,5	ns	2,6	ns
										119,3	0,001
<b>Axin-1 hipocampo</b>						<b>Axin-1 hipocampo</b>					
<b>7 días</b>						<b>1 µM 10 µM</b>					
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*		F'	p< <sup>§</sup>	F'	p< <sup>§</sup>	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,04		0,5	ns	Fluoxetina	0,3	ns			
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,05	0,94 ± 0,01	1,07 ± 0,03	2,2	ns	Paroxetina	0,8	ns	1,1	ns	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,05	1,41 ± 0,09* <sup>§</sup>	1,40 ± 0,05* <sup>§</sup>	12,5	0,01	Venlafaxina	10,6	0,01	15,5	0,01	
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,05	0,91 ± 0,03	1,69 ± 0,10* <sup>§</sup>	28,6	0,001	RS 67333	5,2	ns	16,8	0,01	
F''=: p< <sup>§</sup>	0,01	ns	20,5	0,001	14,5	0,001					
<b>Axin-1 corteza</b>						<b>Axin-1 corteza</b>					
<b>1 día</b>						<b>3 días</b>					
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*		0	1 µM	10 µM	F=	p<*
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,03	1,02 ± 0,05		0,1	ns	Fluoxetina <sup>f</sup>	1,01 ± 0,10	1,12 ± 0,22		0,3	ns
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,03	0,95 ± 0,01	0,90 ± 0,04	2,1	ns	Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,10	0,96 ± 0,15	0,96 ± 0,04	0,5	ns
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,03	0,78 ± 0,04*	1,06 ± 0,06	10,7	0,01	Venlafaxina <sup>v</sup>	1,01 ± 0,10	0,96 ± 0,20	0,94 ± 0,10	0,2	ns
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,03	1,11 ± 0,04 <sup>§</sup>	1,46 ± 0,01* <sup>§</sup>	66,7	0,001	RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,10	1,09 ± 0,01	1,60 ± 0,02* <sup>§</sup>	29,9	0,001
F''=: p< <sup>§</sup>	0,1	ns	1,1	ns	47,1	0,001	F''=: p< <sup>§</sup>	0,0	ns	0,8	ns
										35,3	0,01
<b>Axin-1 corteza</b>						<b>Axin-1 corteza</b>					
<b>7 días</b>						<b>1 µM 10 µM</b>					
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*		F'	p< <sup>§</sup>	F'	p< <sup>§</sup>	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,09	0,90 ± 0,05		1,2	ns	Fluoxetina	4,1	ns			
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,09	1,00 ± 0,04	0,93 ± 0,04	1,8	ns	Paroxetina	2,4	ns	2,1	ns	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,01 ± 0,09	1,00 ± 0,04	1,32 ± 0,15* <sup>§</sup>	11,4	0,01	Venlafaxina	1,5	ns	3,1	ns	
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,09	1,01 ± 0,03	2,45 ± 0,14* <sup>§</sup>	71,2	0,001	RS 67333	0,9	ns	42,8	0,001	
F''=: p< <sup>§</sup>	0,0	ns	1,8	ns	39,3	0,001					

F=análisis de la varianza para cada fármaco respecto a la dosis. \*p<0,05 Dunnett post test para las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento. En el caso de fluoxetina es t de Student. F': análisis de la varianza para las distintas dosis respecto al tiempo de tratamiento, § Student–Newman–Keuls post test para las dosis de 1µM y 10µM respecto al tiempo de tratamiento y F'': análisis de la varianza para cada tiempo y dosis respecto del fármaco, § p<0,05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control en cada tiempo de tratamiento y § Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos (f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y rs=RS 67333) en cada tiempo de tratamiento.

## 2.2.2.- Modulación de la expresión de *Axin-2* por fármacos antidepressivos

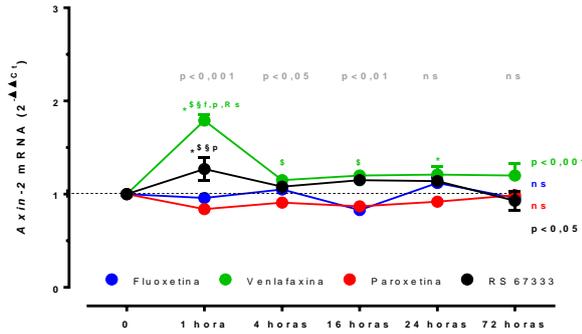
### 2.2.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH)

La adición al medio de cultivo de 1µM de fluoxetina o paroxetina no produce cambios significativos en el nivel de expresión de *Axin-2* (F=1,7 y F=2,3; ns, respectivamente para fluoxetina y paroxetina, ANOVA del efecto de cada fármaco a lo largo del tiempo ver Figura 31 y Tabla 14).

Por el contrario, 1 µM de venlafaxina y RS 67333 producen un incremento significativo en la expresión de *Axin-2* en las CPH (79%, F=28,5; p<0,001 y 27%, F=3,2; p<0,05, respectivamente para venlafaxina y RS 67333; ANOVA del efecto de cada fármaco a lo largo del tiempo), siendo el incremento mayor con venlafaxina (p<0,05, Student–Newman–Keuls post test). El curso temporal del incremento de la expresión de *Axin-2* es similar entre estos dos fármacos, un incremento inicial en la expresión del gen a 1 hora de tratamiento, con una disminución en el nivel de expresión a las 4 horas que se mantiene hasta los 3 días.

#### Resumen de la expresión de *Axin-2* en CPH

El mayor incremento en la expresión de *Axin-2* en las CPH se observa, para todas las condiciones estudiadas, a 1 hora del tratamiento con venlafaxina (Tabla 14).



**Figura 31.-Curso temporal de la expresión de *Axin-2* en células progenitoras de hipocampo** en respuesta a 1μM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333. La expresión de *Axin-2* se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . p<; p< y p< ANOVA del efecto de cada fármaco respecto al tiempo de tratamiento; \*, \* y \* p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. p< ANOVA del efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento; \$, \$ y \$ p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control para cada tiempo de tratamiento. \$p<0,05 Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos, f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333 para cada tiempo de tratamiento.

**Tabla 14.- Curso temporal de la expresión de *Axin-2* en células progenitoras de hipocampo** en respuesta 1μM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina o RS 67333. La expresión de *Axin-2* se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$

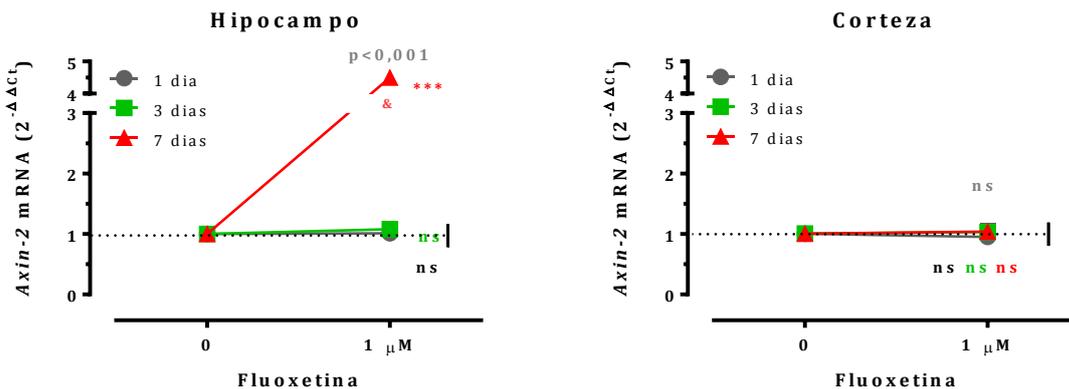
<b><i>Axin-2</i> células progenitoras de hipocampo</b>						F=	p<*			
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas	72 horas					
Control	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,07	1,01 ± 0,08	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,05					
Fluoxetina <sup>f</sup>	0,96 ± 0,02	1,05 ± 0,05	0,83 ± 0,08	1,12 ± 0,10	0,96 ± 0,10	1,7	ns			
Paroxetina <sup>p</sup>	0,84 ± 0,05	0,91 ± 0,04	0,87 ± 0,00	0,92 ± 0,03	0,99 ± 0,03	2,3	ns			
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,79 ± 0,10* <sup>\$f,p,R,s</sup>	1,15 ± 0,05 <sup>s</sup>	1,20 ± 0,03 <sup>s</sup>	1,21 ± 0,13*	1,20 ± 0,13	28,5	0,001			
RS 67333 <sup>Rs</sup>	1,27 ± 0,16* <sup>\$p</sup>	1,08 ± 0,03	1,15 ± 0,02	1,14 ± 0,08	0,93 ± 0,08	3,3	0,05			
F’=; p< <sup>\$,s</sup>	18,5	0,001	3,3	0,05	9,6	0,01	1,8	ns	1,9	ns

F=análisis de la varianza del efecto de cada fármaco a lo largo del tratamiento, & p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. F’: análisis de la varianza entre el efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento. \$ p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control en cada tiempo de tratamiento. \$Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos (F=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333) en cada tiempo de tratamiento.

2.2.2.2.- Cerebro

2.2.2.2.1- Fluoxetina

El tratamiento con 1 μM de fluoxetina de las rodajas de cerebro, sólo incrementa de forma significativa, la expresión de *Axin-2* en el **hipocampo** tras 7 días de exposición al fármaco (350%; F=1182; p<0,001, ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento; p<0,05, Student–Newman–Keuls post test). 1 y 3 días de tratamiento con 1 μM de fluoxetina no modifican de forma significativa la expresión de *Axin-2* en el hipocampo ( $t=0,1$ ; ns y  $t=2,2$ ; ns respectivamente para 1 y 3 días,  $t$  de Student ver Figura 32 y Tabla 15).



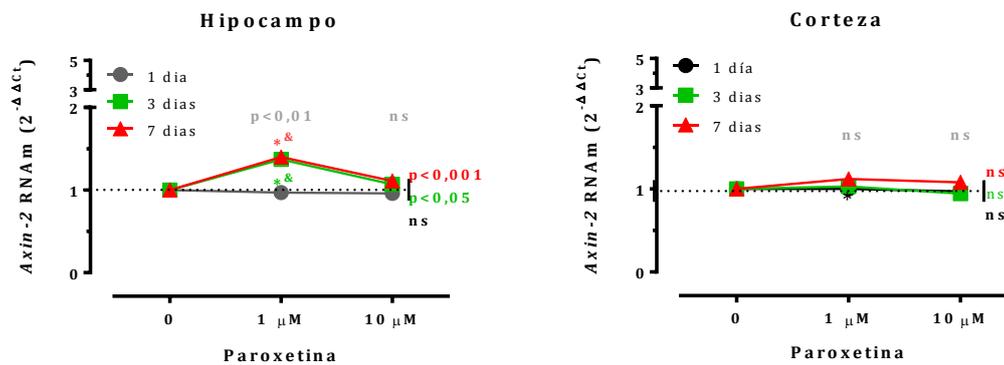
**Figura 32.- Expresión de *Axin-2* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta 1μM de fluoxetina.** La expresión de *Axin-2* se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . \*\*\* p<0,001 t de Student para la dosis de 1μM en cada tiempo de tratamiento p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis, & y & p<0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

En la **corteza cerebral**, 1  $\mu\text{M}$  de fluoxetina no modifica la expresión de *Axin-2* en ninguno de los tiempos estudiados ( $t=2,2$ ; ns;  $t=0,1$ ; ns y  $t=0,2$ ; ns respectivamente para 1, 3 y 7 días, ver Figura 32 y Tabla 15).

#### 2.2.2.2.2- Paroxetina

En el **hipocampo**, una dosis única de paroxetina no modifica significativamente la expresión de *Axin-2* ( $F=2,7$ ; ns; ANOVA vs dosis). 3 y 7 días de tratamiento con 1  $\mu\text{M}$ , pero no con 10  $\mu\text{M}$  de paroxetina, incrementan significativamente la expresión del gen (37%;  $F=9,3$   $p<0,05$  y 40%;  $F=54,7$   $p<0,001$  respectivamente para 3 y 7 días de tratamiento; ANOVA vs dosis;  $p<0,05$  Dunnett post test, ver Figura 33 y Tabla 15).

En la **corteza**, el tratamiento con 1  $\mu\text{M}$  o 10  $\mu\text{M}$  de paroxetina no modifica la expresión de *Axin-2* para ninguna de las dosis o los tiempos ( $F=0,8$ ; ns;  $F=2,0$ ; ns; y  $F=3,1$ ; ns ANOVA vs dosis, respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento, ver Figura 33 y Tabla 15).

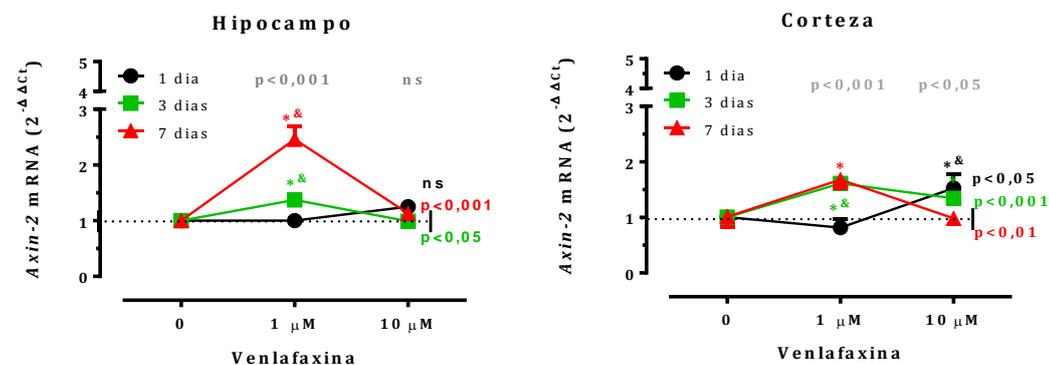


**Figura 33.-** Expresión de *Axin-2* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de paroxetina. La expresión de *Axin-2* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .  $p<$ ;  $p<$  y  $p<$  ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10  $\mu\text{M}$  venlafaxina \*, \* y \*  $p<0,05$  Dunnett post test entre las dosis de 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  en cada tiempo de tratamiento  $p<$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis & , & y &  $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post test entre los tiempos de tratamiento.

#### 2.2.2.2.3- Venlafaxina

El tratamiento de las rodajas de cerebro con venlafaxina modifica de forma significativa la expresión de *Axin-2* tanto en hipocampo como en corteza.

En el **hipocampo**, 1  $\mu\text{M}$  de venlafaxina incrementa la expresión de *Axin-2* de forma tiempo-dependiente ( $F=25,3$ ;  $p<0,001$ ) siendo significativo a los 3 (37%;  $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post test) y 7 días (146%;  $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post test) de tratamiento. 10  $\mu\text{M}$  del fármaco no produce modificaciones en la expresión del gen para ninguno de los tiempos estudiados (ver Figura 34 y Tabla 15).



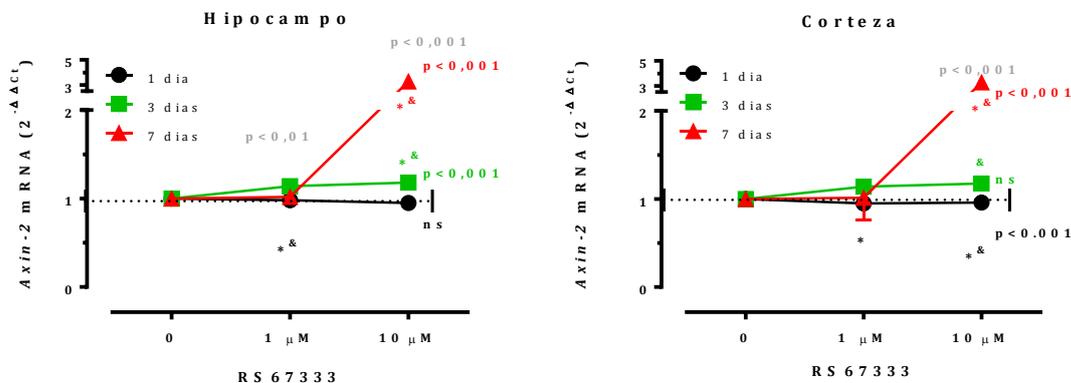
**Figura 34.- Expresión de *Axin2* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de venlafaxina.** La expresión de *Axin 2* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . **p<**; **p<** y **p<** ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \*  $p<0.05$   $p<0.05$  Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p<$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y &  $p<0.05$  Student-Newman-Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

En la **corteza**, de forma similar al hipocampo, 1 µM de venlafaxina incrementa de forma tiempo-dependiente la expresión de *Axin-2* ( $F=17,0$ ;  $p<0,00$ ; ANOVA vs tiempo) siendo significativo a los 3 y 7 días (61% y 68% respectivamente para 1 y 3 días;  $p<0,05$  Student-Newman-Keuls post test). Con la dosis de 10 µM se observa un incremento significativo con 1 día y 3 días de tratamiento (53%;  $F=4,9$ ;  $p<0,05$  y 34%;  $F=28,7$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA vs dosis) sin embargo el nivel de expresión alcanzado con tres días es ya significativo con la dosis de 1 µM ( $\cong 60\%$ ), (ver Figura 34 y Tabla 15).

### 2.2.2.2.- RS 67333

En el **hipocampo**, el tratamiento agudo de RS 67333, no modifica la expresión de *Axin-2* ( $F=2,6$ ; ns ANOVA vs dosis). 3 y 7 días de tratamiento, por el contrario, incrementan la expresión del gen con la dosis de 10 µM pero no 1 µM. El incremento observado con la dosis alta fue mayor a los 3 (352%;  $F=476,6$ ;  $p<0,001$ ) que a los 7 días (26%;  $F=18,6$ ;  $p<0,001$ ) de tratamiento (ver Figura 35 y Tabla 15).

En la **corteza**, el tratamiento durante 1 o 3 días con el fármaco, no produce cambios en el nivel de expresión de *Axin-2* ( $F=0,7$  y  $F=3,3$ ; ns respectivamente para 1 y 3 días de tratamiento; ANOVA vs dosis;). El tratamiento crónico durante 7 días produce, por el contrario, un incremento significativo de la expresión del gen con la dosis de 10 µM (228%;  $F=77,8$ ;  $p<0,001$ , ANOVA vs dosis; ver Figura 35 y Tabla 15).



**Figura 35.- Expresión de *Axin2* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de RS 67333.** La expresión de *Axin 2* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . **p<**; **p<** y **p<** ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \*  $p<0.05$   $p<0.05$  Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p<$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y &  $p<0.05$  Student-Newman-Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

#### Resumen de la expresión de *Axin-2* en cerebro

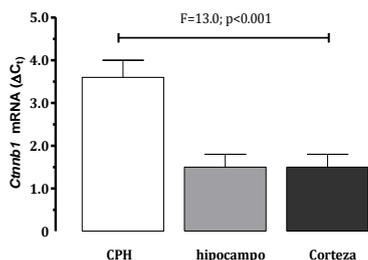
Todos los fármacos estudiados incrementan la expresión de *Axin-2*. En el hipocampo, el mayor incremento se observa con RS 67333 y fluoxetina, siendo más precoz el efecto del RS 67333. En la corteza, el mayor incremento en la expresión de *Axin-2* se observó con RS 67333, pero es más tardío que en hipocampo (Tabla 15).

## 2.3. Ctnnb1

### 2.3.1.- Expresión basal de *Ctnnb1* en células progenitoras de hipocampo y en cerebro

**En condiciones basales** las CPH expresan niveles de *Ctnnb1*  $\Delta Ct=3,6\pm 0,4$  con respecto al gen calibrador. En hipocampo la expresión basal de *Ctnnb1* es mayor  $\Delta Ct=1,5\pm 0,3$  que en las CPH y similar a la

corteza  $\Delta C_t = 1,5 \pm 0,3$  (Figura 36). Estos datos muestran una expresión 2 veces menor de *Ctnnb1* en los cultivos de CPH que en hipocampo o la corteza.



**Figura 36.- Nivel de expresión basal de *Ctnnb1* en cultivo de células progenitoras de hipocampo y en tejido de hipocampo y corteza de cultivos de rodajas de cerebro. CPH: cultivo de células progenitoras de hipocampo, F=ANOVA**

**Tabla 15.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Axin 2* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1μM de fluoxetina y 1μM y 10 μM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Axin 2* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$**

Axin-2 hipocampo						Axin-2 hipocampo							
1 día						3 días							
	0	0	1 μM	10 μM	F=	p<*		0	1 μM	10 μM	F=	p<*	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,07	1,01 ± 0,04	1,00 ± 0,07	0,96 ± 0,06	0	ns	Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,03	1,08 ± 0,07	1,07 ± 0,04	2,2	ns	
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,07	1,00 ± 0,03	0,90 ± 0,02	1,25 ± 0,28	2,7	ns	Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,03	1,37 ± 0,10* <sup>§</sup>	0,99 ± 0,02	9,3	0,05	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,07	1,00 ± 0,03	0,96 ± 0,02	0,96 ± 0,02	0,2	ns	Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,03	1,37 ± 0,11* <sup>§</sup>	0,99 ± 0,02	10,5	0,05	
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,07	0,96 ± 0,02	0,96 ± 0,02	0,96 ± 0,02	2,6	ns	RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,03	1,06 ± 0,01	4,52 ± 0,10* <sup>§</sup>	476,6	0,001	
F''=;	0,0	ns	0,9	ns	3,3	ns	F''=;	0,06	ns	5,1	0,05	725,2	0,001

Axin-2 hipocampo						Axin-2 hipocampo					
7 días						1 μM					
	0	0	1 μM	10 μM	F=	p<*		F'	p<*	F'	p<*
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,04	4,50 ± 0,17* <sup>§</sup>	1,11 ± 0,02	1,13 ± 0,02	1182	0,001	Fluoxetina	226,4	0,001	1,1	ns
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,04	1,40 ± 0,09* <sup>§</sup>	1,13 ± 0,02	1,13 ± 0,02	54,7	0,001	Paroxetina <sup>p</sup>	12,1	0,01	1,9	ns
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,01 ± 0,04	2,46 ± 0,24* <sup>§</sup>	1,13 ± 0,02	1,13 ± 0,02	171	0,001	Venlafaxina	25,3	0,001	1,9	ns
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,04	0,95 ± 0,03	1,25 ± 0,09* <sup>§</sup>	1,25 ± 0,09* <sup>§</sup>	18,6	0,001	RS 67333	11,9	0,01	511,8	0,001
F''=;	0,02	ns	119,4	0,001	3,3	0,05	F''=;	0,1	ns	28,5	0,001

Axin-2 corteza						Axin-2 corteza							
1 día						3 días							
	0	0	1 μM	10 μM	F=	p<*		0	1 μM	10 μM	F=	p<*	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,03	0,95 ± 0,02	0,97 ± 0,08	1,53 ± 0,25* <sup>§</sup>	2,2	ns	Fluoxetina <sup>f</sup>	1,01 ± 0,08	1,03 ± 0,10	0,94 ± 0,01	0,1	ns	
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,03	1,00 ± 0,02	0,97 ± 0,08	1,53 ± 0,25* <sup>§</sup>	0,8	ns	Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,08	1,03 ± 0,05	1,34 ± 0,06* <sup>§</sup>	2,0	ns	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,03	0,92 ± 0,14	1,53 ± 0,25* <sup>§</sup>	1,53 ± 0,25* <sup>§</sup>	4,9	0,05	Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,08	1,61 ± 0,03* <sup>§</sup>	1,18 ± 0,01* <sup>§</sup>	28,7	0,001	
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,03	0,95 ± 0,02* <sup>§</sup>	0,96 ± 0,04* <sup>§</sup>	0,96 ± 0,04* <sup>§</sup>	0,7	ns	RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,08	1,14 ± 0,04	1,18 ± 0,01* <sup>§</sup>	3,3	ns	
F''=;	0,01	ns	1,5	ns	8,6	0,01	F''=;	0,1	ns	28,5	0,001	12,9	0,01

Axin-2 corteza						Axin-2 corteza					
7 días						1 μM					
	0	0	1 μM	10 μM	F=	p<*		F'	p<*	F'	p<*
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,06	1,04 ± 0,09	1,08 ± 0,04	0,98 ± 0,03 <sup>§</sup>	0,2	ns	Fluoxetina	1,2	ns	1,5	ns
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,06	1,12 ± 0,06	1,08 ± 0,04	0,98 ± 0,03 <sup>§</sup>	3,1	ns	Paroxetina <sup>p</sup>	1,7	ns	4,3	ns
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,01 ± 0,06	1,68 ± 0,15* <sup>§</sup>	0,98 ± 0,03 <sup>§</sup>	0,98 ± 0,03 <sup>§</sup>	12,9	0,01	Venlafaxina	17,0	0,001	4,3	0,05
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,06	1,02 ± 0,25	3,28 ± 0,17* <sup>§</sup>	3,28 ± 0,17* <sup>§</sup>	77,8	0,001	RS 67333	1,0	ns	2085,5	0,001
F''=;	0,1	ns	4,1	0,05	317,7	0,001	F''=;	0,1	ns	2085,5	0,001

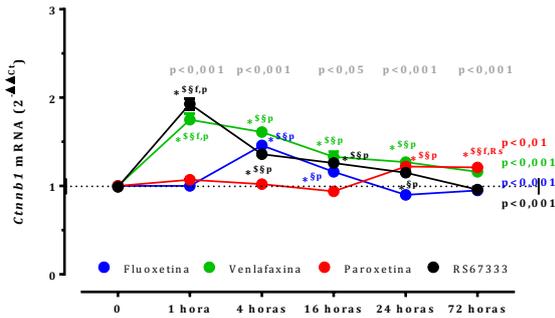
F=análisis de la varianza para cada fármaco respecto a la dosis. \*p<0,05 Dunnett post test para las dosis de 1μM y 10μM vs el control en cada tiempo de tratamiento. En el caso de fluoxetina es t de Student. F': análisis de la varianza para las distintas dosis respecto al tiempo de tratamiento, & Student–Newman–Keuls post test para las dosis de 1μM y 10μM respecto al tiempo de tratamiento y F'': análisis de la varianza para cada tiempo y dosis respecto del fármaco, § p<0,05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control en cada tiempo de tratamiento y §Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos (f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y rs=RS 67333) en cada tiempo de tratamiento.

### 2.3.2.- Modulación de la expresión de *Ctnnb1* por fármacos antidepressivos

#### 2.3.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH)

Todos los antidepressivos incluidos en el estudio incrementan la expresión de *Ctnnb1* en las CPH, el curso temporal del efecto varía de unos fármacos a otros (ver Figura 37 y Tabla 16). La **fluoxetina**, incrementa el nivel de expresión del gen a las cuatro horas de tratamiento (46%, F=47,1; p<0,001; ANOVA vs tiempo) con posterior descenso a niveles basales a las 24 horas. La **paroxetina**, tiene un efecto más tardío que la fluoxetina, incrementa significativamente el nivel de expresión de *Ctnnb1* a las 24 horas (22%) y permaneciendo elevado hasta los 3 días (21%; F=7,1; p<0,01, ANOVA vs tiempo) de la adición de fármaco.

Por el contrario **venlafaxina** (F=40,0; p<0,001, ANOVA vs tiempo) y el **RS 67333** (F=72,8 p<0,001, ANOVA vs tiempo) tiene un efecto más rápido y prolongado, con un pico de expresión a la hora (93% y 75% respectivamente par el RS 67333 y la venlafaxina), manteniéndose los niveles de expresión elevados durante 24 horas, ver Figura 37 y Tabla 16).



**Figura 37.-** Curso temporal de la expresión de *Ctnnb1* en células progenitoras de hipocampo en respuesta a 1µM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333. La expresión de *Ctnnb1* se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . p<; p<; p< y p< ANOVA del efecto de cada fármaco vs el tiempo de tratamiento; \*, \* y \* p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. p<ANOVA del efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento; \$, \$ y \$ p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control para cada tiempo de tratamiento; \$, \$, \$ y \$ p<0,05 Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos, f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333 para cada tiempo de tratamiento.

**Tabla 16.-** Curso temporal de la expresión de *Ctnnb1* en células progenitoras de hipocampo en respuesta 1µM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina o RS 67333. La expresión de *Axin 1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ .

<b><i>Ctnnb1</i> células progenitoras de hipocampo</b>										
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas	72 horas	F=	p<*			
Control	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,04	0,99 ± 0,02	1,00 ± 0,10					
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,13	1,46 ± 0,09* <sup>\$</sup> <sup>p</sup>	1,16 ± 0,20* <sup>\$</sup> <sup>p</sup>	0,90 ± 0,01	0,95 ± 0,03	47,1	0,001			
Paroxetina <sup>p</sup>	1,07 ± 0,01	1,02 ± 0,06	0,94 ± 0,02	1,22 ± 0,05* <sup>\$</sup> <sup>p</sup>	1,21 ± 0,05* <sup>\$</sup> <sup>f,rs</sup>	7,1	0,01			
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,75 ± 0,11* <sup>\$</sup> <sup>f,p</sup>	1,61 ± 0,07* <sup>\$</sup> <sup>p</sup>	1,33 ± 0,10* <sup>\$</sup> <sup>p</sup>	1,27 ± 0,08* <sup>\$</sup> <sup>p</sup>	1,16 ± 0,02	40,0	0,001			
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,93 ± 0,10* <sup>\$</sup> <sup>f,p</sup>	1,36 ± 0,09* <sup>\$</sup> <sup>p</sup>	1,26 ± 0,04* <sup>\$</sup> <sup>p</sup>	1,15 ± 0,04* <sup>\$</sup> <sup>p</sup>	0,96 ± 0,09	72,8	0,001			
F'=: p< <sup>\$, \$</sup>	58,3	0,001	41,8	0,001	7,7	0,01	29,3	0,001	3,3	0,05

F=análisis de la varianza del efecto de cada fármaco a lo largo del tratamiento, & p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. F': análisis de la varianza entre el efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento. \$ p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control en cada tiempo de tratamiento. \$Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos (f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333) en cada tiempo de tratamiento..

**Resumen de la expresión de *Ctnnb1* en CPH**

Todos los fármacos incrementan la expresión de *Ctnnb1* en CPH. Venlafaxina y RS 67333 producen el efecto más rápido e intenso sobre la expresión de *Ctnnb1*, (Tabla 16)

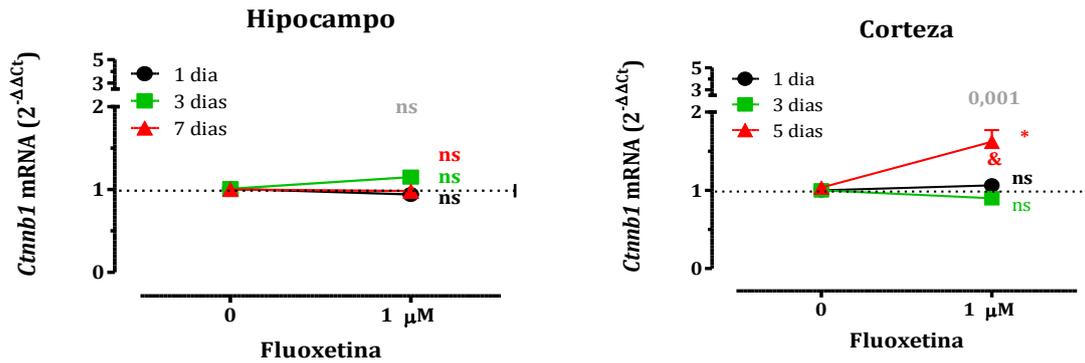
**2.3.2.2.- Cerebro**

**2.3.2.2.1.- Fluoxetina**

El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 µM de fluoxetina no modifica significativamente la expresión de *Ctnnb1* para ninguno de los tiempos estudiados en el **hipocampo**, ( $t=2,3$ ;  $t=2,1$  y  $t=0,3$ ; ns respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento). En la **corteza**, 1 y 3 días de tratamiento con 1 µM de fluoxetina no modifica significativamente la expresión de *Ctnnb1* ( $t=1,6$ ; y  $t=2,1$ ; ns, respectivamente para 1 y 3 días de tratamiento) pero 7 días de tratamiento produce un incremento significativo de la expresión del gen (62%;  $t=3,5$ ;  $p<0,05$ ; ver Figura 38 y Tabla 16).

**2.3.2.2.2.- Paroxetina**

El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 µM de paroxetina no modifica significativamente la expresión de *Ctnnb1* para ninguna de las dosis en los tiempos estudiados ni en el hipocampo (F=1,1; F=1,6; y F=1,4; ns respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento) ni en la **corteza** (F=1,5; F=1,8; y F=2,1; ns respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento; ver Figura 39 y Tabla 16).

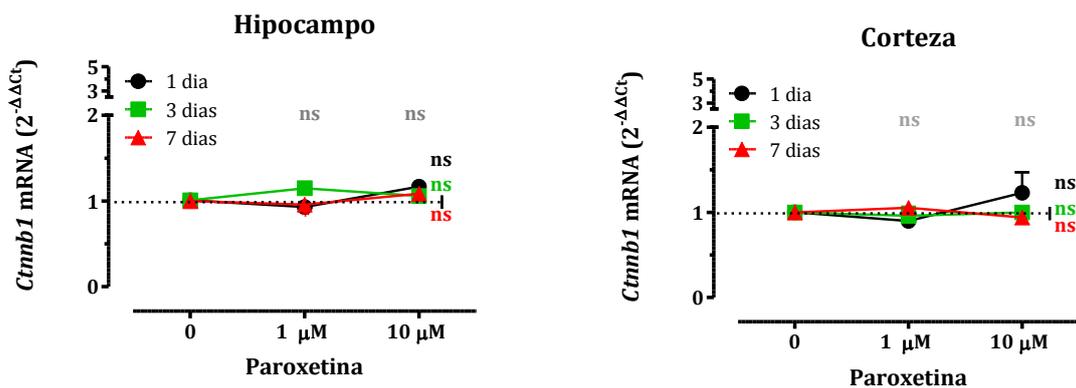


**Figura 38.-** Expresión de *Ctnnb1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM de fluoxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Ctnnb1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ . \*  $p < 0.05$  *t* de Student.  $p < \text{ANOVA}$  entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &  $p < 0.05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

### 2.3.2.2.3.- Venlafaxina

La venlafaxina incrementa la expresión de *Ctnnb1* tanto en el hipocampo como en la corteza. En el **hipocampo**, la administración única (1 día) de venlafaxina no modifica significativamente la expresión de *Ctnnb1*, ni con 1 µM ni con 10 µM ( $F=4,1$ ; ns), aunque la dosis de 10 µM produce un ligero incremento en la expresión del gen (22%; ns). Por el contrario, la administración repetida durante 3 o 7 días de venlafaxina incrementa de forma significativa la expresión de *Ctnnb1*. 3 días de tratamiento, incrementan de forma dosis dependiente la expresión del gen con 1 µM (51%) y 10 µM (360%;  $F=17,1$ ;  $p < 0,001$ ). El tratamiento durante 7 días incrementa la expresión de *Ctnnb1* ( $F=15,2$ ;  $p < 0,01$ ) más que 3 días con la dosis de 1 µM (142% vs 51%) pero no con la dosis de 10 µM (54% vs 360%; ver Figura 40)

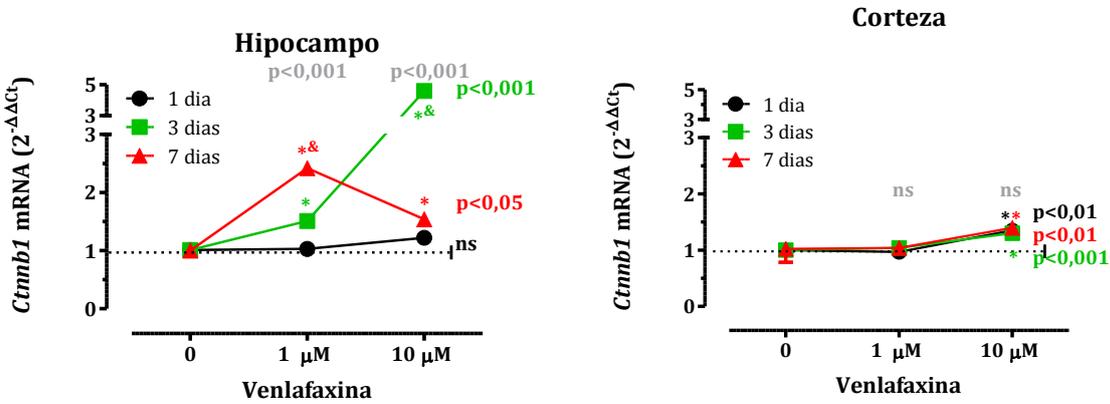
**Tabla 17.-** Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Ctnnb1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ctnnb1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$



**Figura 39.-** Expresión de *Ctnnb1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de paroxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Ctnnb1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ .  $p < p < p < \text{ANOVA}$  para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \*  $p < 0.05$   $p < 0.05$  Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p < \text{ANOVA}$  entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis & , & y &  $p < 0.05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento..

En la **corteza** por el contrario, la venlafaxina no modifica la expresión de *Ctnnb1* a dosis bajas (1 µM) en ninguno de los tiempos estudiados ( $F=0,3$ ; ns; ANOVA vs tiempo de tratamiento para 1 µM). La dosis de

10  $\mu\text{M}$  incrementa la expresión de *Ctnnb1* de forma similar ( $F=0,8$ ; ns; ANOVA para 10  $\mu\text{M}$  vs tiempo de tratamiento) en todos los tiempos estudiados (35%, ( $F=19,4$ ;  $p<0,01$ ), 29% ( $F=22,5$ ;  $p<0,001$ ) y 39% ( $F=22,4$ ;  $p<0,01$ ) respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento ANOVA vs dosis para cada tiempo ver Figura 40 y Tabla 16).



**Figura 40.-** Expresión de *Ctnnb1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de venlafaxina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Ctnnb1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .  $p<$ ;  $p<$  y  $p<$  ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10  $\mu\text{M}$  venlafaxina \*, \* y \*  $p<0,05$   $p<0,05$  Dunnett post test entre las dosis de 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p<$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y &  $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

**Tabla 17.-** Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Ctnnb1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1  $\mu\text{M}$  de fluoxetina y 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ctnnb1* se muestra en valores de  $2\Delta\Delta Ct$

<b><i>Ctnnb1</i> hipocampo 1 día</b>						
	0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,07	0,94 ± 0,13			2,3 ns	
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,07	0,93 ± 0,21	1,17 ± 0,27	1,1	ns	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,07	1,03 ± 0,21	1,22 ± 0,27	4,1	ns	
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,07	0,91 ± 0,04	0,91 ± 0,11	1,9	ns	
F''=: $p<^{\$}$	0,0	ns	2,9	ns	1,5	ns

<b><i>Ctnnb1</i> hipocampo 3 días</b>						
	0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,02	1,15 ± 0,04			2,1 ns	
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,02	1,15 ± 0,13	1,06 ± 0,01		1,6 ns	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,02	1,51 ± 0,03 <sup>*56f,p,rs</sup>	4,60 ± 0,98 <sup>*58</sup>	11,7	0,001	
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,02	0,92 ± 0,01	6,45 ± 0,81 <sup>*58</sup>	135,6	0,001	
F''=: $p<^{\$}$	0,0	ns	12,9	0,001	55,2	0,001

<b><i>Ctnnb1</i> hipocampo 7 días</b>						
	0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,04	0,98 ± 0,02 <sup>8</sup>			0,3 ns	
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,04	0,96 ± 0,01	1,09 ± 0,09	1,4	ns	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,04	2,42 ± 0,55 <sup>*58f,p,rs</sup>	1,54 ± 0,04 <sup>*58p</sup>	15,2	0,01	
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,04	1,2 ± 0,03 <sup>8</sup>	1,3 ± 0,08 <sup>*5</sup>	8,0	0,05	
F''=: $p<^{\$}$	0,0	ns	26,6	0,001	13,1	0,01

<b><i>Ctnnb1</i> hipocampo 1 μM 10 μM</b>					
	F'	p< <sup>8</sup>	F'	p< <sup>8</sup>	
Fluoxetina	1,9	ns			
Paroxetina	2,8	ns	0,7	ns	
Venlafaxina	7,6	0,01	11,0	0,05	
RS 67333	17,2	0,001	42,9	0,001	

<b><i>Ctnnb1</i> corteza 1 día</b>						
	0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,02	1,06 ± 0,04			1,6 ns	
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,02	0,90 ± 0,08	1,23 ± 0,48	1,5	ns	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,02	0,97 ± 0,01	1,35 ± 0,08 <sup>*</sup>	19,4	0,01	
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,01 ± 0,02	0,98 ± 0,03	1,17 ± 0,14	1,5	ns	
F''=: $p<^{\$}$	0,0	ns	1,9	ns	0,4	ns

<b><i>Ctnnb1</i> corteza 3 días</b>						
	0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,04	0,90 ± 0,07			2,1 ns	
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,04	0,96 ± 0,18	1,00 ± 0,02		1,8 ns	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,04	1,04 ± 0,01	1,29 ± 0,03 <sup>*56p</sup>	22,5	0,001	
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,01 ± 0,04	0,90 ± 0,04	1,50 ± 0,10 <sup>*56p</sup>	70,5	0,001	
F''=: $p<^{\$}$	0,0	ns	2,3	ns	18,4	0,001

<b><i>Ctnnb1</i> corteza 7 días</b>						
	0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,05	1,62 ± 0,27 <sup>*58</sup>			3,5 0,05	
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,05	1,05 ± 0,01	0,94 ± 0,01	2,1	ns	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,05	1,04 ± 0,12	1,39 ± 0,04 <sup>*</sup>	22,4	0,01	
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,05	0,95 ± 0,12	3,80 ± 0,56 <sup>*58p,v,8</sup>	79,6	0,001	
F''=: $p<^{\$}$	0,0	ns	3,7	0,05	22,5	0,001

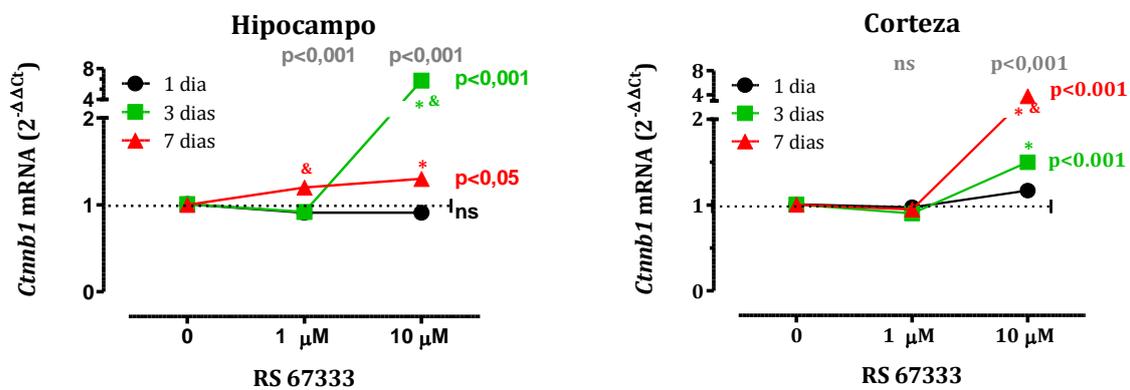
  

<b><i>Ctnnb1</i> corteza 1 μM 10 μM</b>					
	F'	p< <sup>8</sup>	F'	p< <sup>8</sup>	
Fluoxetina	19,8	0,001			
Paroxetina	1,9	ns	0,9	ns	
Venlafaxina	0,3	ns	0,8	ns	
RS 67333	0,4	ns	19,8	0,001	

F=análisis de la varianza para cada fármaco respecto a la dosis. \* $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post test para las distintas dosis en cada fármaco. F': análisis de la varianza para cada fármaco y dosis respecto al tiempo de tratamiento, <sup>8</sup> $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post test para los distintos tiempos. F'': análisis de la varianza para cada dosis y tiempo respecto al fármaco, <sup>5</sup> $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post test para los distintos fármacos.

## 2.3.2.2.4.- RS 67333

En el **hipocampo**, la administración única de 1  $\mu\text{M}$  o 10  $\mu\text{M}$  de RS 67333 no modifica la expresión de *Ctnnb1* ( $F=1,9$ ; ns). Por el contrario, la administración repetida durante 3 o 7 días incrementa de forma significativa la expresión de *Ctnnb1*. Con 3 días de tratamiento, observamos un incremento significativo en la expresión del gen con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  (545%;  $F=135,6$ ;  $p<0,001$ ) pero no con la de 1  $\mu\text{M}$ . 7 días de tratamiento con RS 67333, incrementan significativamente la expresión de *Ctnnb1* con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  (30%;  $F=60,9$ ;  $p<0,001$ ). El incremento observado fue menor con 7 que con 3 días de tratamiento (Figura 41 y Tabla 16). En la **corteza**, observamos un incremento tiempo dependiente ( $F=19,8$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA vs tiempo de tratamiento) en la expresión de *Ctnnb1* con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  (17%; ns; 50%;  $F=70,5$ ;  $p<0,001$  y 280%  $F=79,6$ ;  $p<0,001$  respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento ANOVA vs dosis (Figura 41 y Tabla 16).)

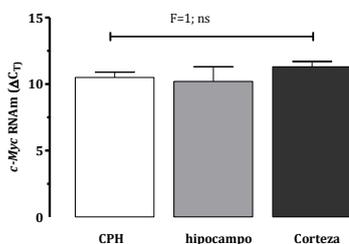


**Figura 41.-** Expresión de *Ctnnb1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) en de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de RS 67333 tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Ctnnb1* se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .  $p<$ ;  $p<$  y  $p<$  ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10  $\mu\text{M}$  venlafaxina \*, \* y \*  $p<0,05$  Dunnett post test entre las dosis de 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p<$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y &  $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento..

## 2.4. c-Myc

## 2.4. 1.- Expresión basal de c-Myc en células progenitoras de hipocampo y en cerebro

**En condiciones basales**, la expresión de *c-Myc*, con respecto al gen calibrador GAPDH, fue similar en las CPH  $\Delta C_t=10,6\pm 0,4$ , el hipocampo ( $\Delta C_t=10,1\pm 1,1$ ) y la corteza ( $\Delta C_t=11,3\pm 0,4$ ; ver Figura 42).

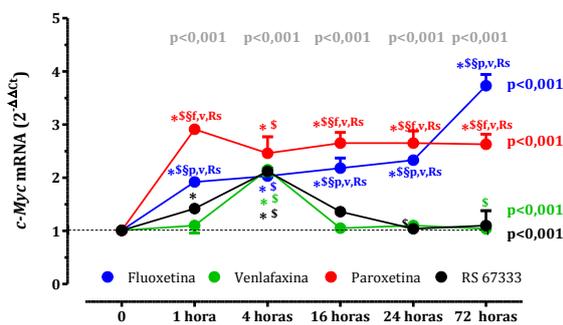


**Figura 42.-** Nivel de expresión basal de *c-Myc* en cultivo de células progenitoras de hipocampo y en tejido de hipocampo y corteza de cultivos de rodajas de cerebro. CPH: cultivo de células progenitoras de hipocampo,  $F=ANOVA$ .

2.4.2.- Modulación de la expresión de *c-Myc* por fármacos antidepresivos

2.4.2.1- Células progenitoras de hipocampo (CPH)

Todos los antidepresivos incluidos en el estudio incrementan la expresión de *c-Myc* en las CPH, pero con un el curso temporal diferente. 1µM de **fluoxetina** incrementa progresivamente el nivel de expresión de *c-Myc* desde 1 hora (92%,) hasta alcanzar el máximo a los 3 días (276%; F=37,9; p<0,001). El incremento en la expresión de *c-Myc* producido por **paroxetina** fue máximo a la hora (191%), manteniéndose los niveles de expresión del gen elevados durante 3 días (163%; F=37,9; p<0,001). Ambos ISRS producen un incremento mantenido en la expresión del gen. La **venlafaxina** y el **RS 67333** por el contrario, producen un pico de expresión de *c-Myc* a las 4 horas del tratamiento (115%; F=24,8; p<0.001 y 112%; F=14,1 p<0.001; respectivamente para venlafaxina y RS 67333), recuperándose el nivel de expresión basal a las 16 horas (Figura 43y Tabla 18).



**Figura 43.-** Curso temporal de la expresión de *c-Myc* en células progenitoras de hipocampo en respuesta a 1µM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333. La expresión de *c-Myc* se muestra en valores de 2<sup>-ΔΔCt</sup>. p<; p< y p< ANOVA del efecto de cada fármaco vs el tiempo de tratamiento; \*, \*, \* y \* p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. p<ANOVA del efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento; \$, \$ y \$ p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control para cada tiempo de tratamiento, \$, \$, \$ y \$ p<0,05 Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos, f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333 para cada tiempo de tratamiento.

**Tabla 18.-** Curso temporal de la expresión de *c-Myc* en células progenitoras de hipocampo en respuesta 1µM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina o RS 67333. La expresión de *c-Myc* se muestra en valores de 2<sup>-ΔΔCt</sup>

c-Myc células progenitoras de hipocampo							F=	p<*			
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas	72 horas						
Control	1,01 ± 0,18	1,01 ± 0,15	1,01 ± 0,18	1,01 ± 0,16	1,00 ± 0,03						
Fluoxetina	1,92 ± 0,05* <sup>§p,v,Rs</sup>	2,03 ± 0,26* <sup>§</sup>	2,18 ± 0,33* <sup>§v,Rs</sup>	2,33 ± 0,14* <sup>§v,Rs</sup>	3,73 ± 0,37* <sup>§v,Rs</sup>	37,9	0,001				
Paroxetina	2,91 ± 0,00* <sup>§f,v,Rs</sup>	2,46 ± 0,44* <sup>§</sup>	2,65 ± 0,28* <sup>§v,Rs</sup>	2,65 ± 0,39* <sup>§v,Rs</sup>	2,63 ± 0,32* <sup>§v,Rs</sup>	15,3	0,001				
Venlafaxina	1,10 ± 0,24	2,15 ± 0,19* <sup>§</sup>	1,05 ± 0,05	1,10 ± 0,12	1,04 ± 0,04	24,8	0,001				
RS 67333	1,42 ± 0,09*	2,12 ± 0,10* <sup>§</sup>	1,36 ± 0,11	1,04 ± 0,03	1,10 ± 0,40	14,1	0,001				
F <sup>2</sup> ;	p< <sup>§</sup>	90,3	0,001	13,5	0,001	34,2	0,001	43,5	0,001	52,3	0,001

F=análisis de la varianza del efecto de cada fármaco a lo largo del tratamiento, & p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. F<sup>2</sup>: análisis de la varianza entre e efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento. § p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control en cada tiempo de tratamiento. §Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos (f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333) en cada tiempo de tratamiento.

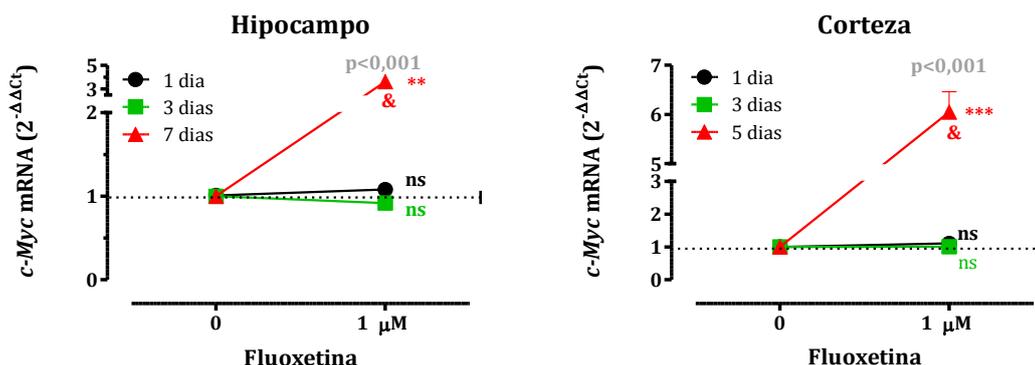
Resumen de la expresión de *c-Myc* en CPH

Todos los fármacos incrementan la expresión de *c-Myc* en CPH. El mayor incremento se observa a los tres días con fluoxetina (Tabla 18).

2.4.2.2.- Cerebro

2.4.2.2.1.- Fluoxetina

El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 µM de fluoxetina sólo incrementa significativamente la expresión de *c-Myc* tras 7 días de tratamiento, ambos en el **hipocampo** (261%; t=14,6; p<0,01, t de Student) y en la **corteza** (505%; t=15,5; p<0,001; t de Student, ver Figura 44 y Tabla 19). Sin cambios tras 1 o 3 días en el hipocampo (t=0,9; ns y t=1,9; ns, respectivamente para 1 y 3 días de tratamiento, t de Student) y en la corteza (t=1,5 y t=0,0; ns, respectivamente para 1 y 3 días).



**Figura 44.-** Expresión de *c-Myc* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM de fluoxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *c-Myc* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ . \*, \* y \* *t* de Student para 1, 3 y 7 días de tratamiento para la dosis de 1µM en cada tiempo de tratamiento  $p < ANOVA$  entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para 1µM. & & y &  $p < 0.05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

#### 2.4.2.2.2.- Paroxetina

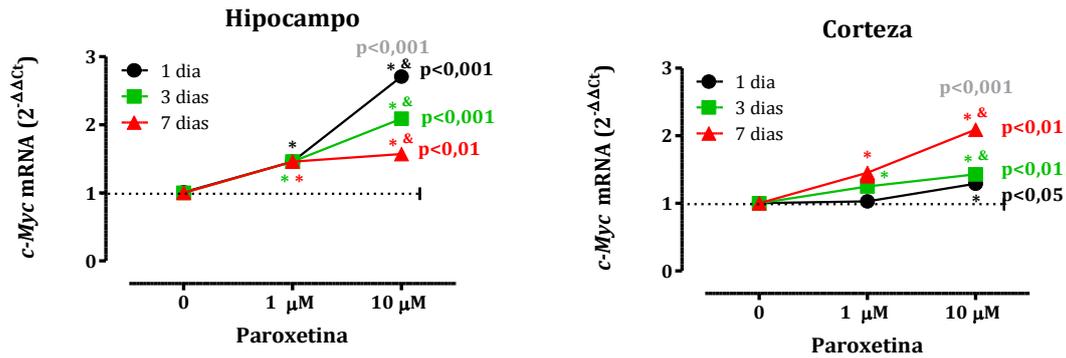
En el **hipocampo** (Figura 45), el tratamiento de las rodajas de cerebro con paroxetina incrementa de forma dosis dependiente la expresión de *c-Myc*. Una administración única de paroxetina producen los máximos niveles de expresión del gen para las dos dosis estudiadas (46% y 171%;  $F=34,8$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente para 1 y 10 µM ANOVA vs dosis). Con 3 y 7 días de tratamiento, la dosis de 1 µM produce un incremento en la expresión de *c-Myc* igual al observado tras 1 dosis ( $F=2,8$ ; ns; ANOVA vs tiempo). Por el contrario, el incremento en la expresión de *c-Myc* con la dosis de 10 µM es máximo tras 1 dosis, siendo el nivel alcanzado menor con 3 y 7 días de tratamiento (174%, 109%, 57% y %;  $F=8,9$ ;  $p < 0,01$ ; respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento ANOVA vs tiempo, ver Tabla 19 y Figura 45).

En la **corteza** (Figura 45), el tratamiento con paroxetina incrementa de forma dosis y tiempo dependiente la expresión de *c-Myc*. El tratamiento agudo (1 día) incrementa significativamente la expresión del gen con 10 µM pero no con 1 µM de paroxetina (3% y 29%; respectivamente para 1 y 10 µM  $F=4,4$ ;  $p < 0,05$ ; ANOVA vs dosis). Tres días de tratamiento con paroxetina, incrementan de forma dosis dependiente y significativa la expresión de *c-Myc* (25% y 43% respectivamente para 1 y 10 µM;  $F=10,1$ ;  $p < 0,01$ ; ANOVA vs dosis). 7 días de tratamiento produce un efecto similar al descrito con 1 y 3 dosis (45% y 109%,  $F=13,1$ ;  $p < 0,01$  respectivamente para 1 y 10 µM ANOVA vs dosis). Sólo 10 µM de paroxetina, produce un incremento tiempo-dependiente en la expresión de *c-Myc* en la corteza ( $F=30,2$ ;  $p < 0,001$ , ver Tabla 19).

#### 2.4.2.2.3.- Venlafaxina

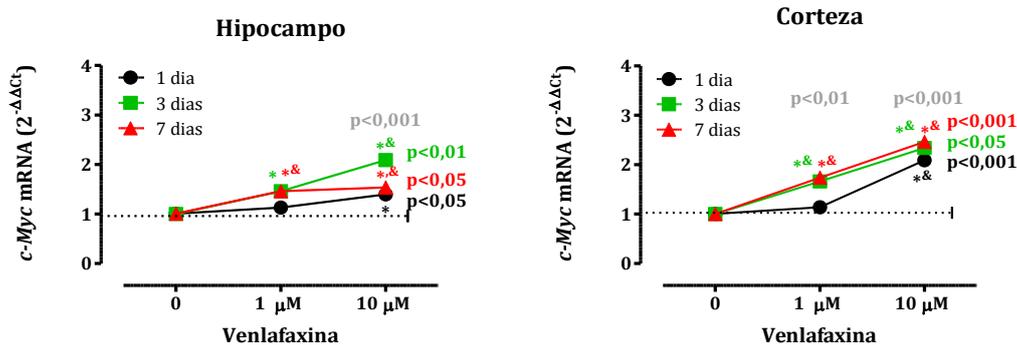
El tratamiento de las rodajas de cerebro con Venlafaxina, incrementa significativamente la expresión de *c-Myc* en hipocampo y corteza.

En el **hipocampo** (Figura 46), una dosis única de venlafaxina incrementa la expresión de *c-Myc* de forma significativa sólo con la dosis de 10 µM (40%;  $F=5,3$ ;  $p < 0,05$ ; ANOVA vs dosis). El tratamiento durante tres días, por el contrario, incrementa la expresión de *c-Myc* con 1 µM y 10 µM (46% y 109%;  $F=8,4$ ;  $p < 0,05$ ; respectivamente para 1 y 10 µM ANOVA vs dosis). Finalmente, el tratamiento de las rodajas de cerebro con venlafaxina durante 7 días, incrementa de forma significativa la expresión de *c-Myc* con la dosis de 1µM (46%) y 10 µM (54%;  $F=8,1$ ;  $p < 0,01$ ; ANOVA vs dosis), el incremento observado con 7 dosis de 10 µM fue menor al obtenido con tres días de tratamiento. El incremento en la expresión de *c-Myc* producido por venlafaxina, fue tiempo dependiente para las dosis de 10 µM ( $F=39,3$ ;  $p < 0,001$ , ANOVA vs tiempo Tabla 19).



**Figura 45.-** Expresión de *c-Myc* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de paroxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *c-Myc* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ .  $p <$ ;  $p <$  y  $p <$  ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10  $\mu\text{M}$  venlafaxina \*, \* y \*  $p < 0.05$   $p < 0.05$  Dunnett post test entre las dosis de 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p <$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis & & y &  $p < 0.05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento..

En la **corteza**, el tratamiento con venlafaxina incrementa de forma dosis y tiempo dependiente la expresión de *c-Myc* (Figura 46). Una dosis única de venlafaxina incrementa la expresión de *c-Myc* de forma significativa sólo con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  (100%;  $F=96,1$ ;  $p < 0,001$ ; ANOVA vs dosis) pero no con 1  $\mu\text{M}$  (14%; ns; ANOVA vs dosis). 3 y 7 días de tratamiento incrementan de forma dosis dependiente (66% y 134%;  $F=4,7$ ;  $p < 0,05$  y 45% y 146%;  $F=59,8$ ;  $p < 0,001$  respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$  durante 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). Venlafaxina también incrementa de forma tiempo-dependiente la expresión de *c-Myc*, tanto para la dosis de 1  $\mu\text{M}$  como para la de 10  $\mu\text{M}$  ( $F=31,2$ ;  $p < 0,01$  y  $F=55,6$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente para las dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$ ; ANOVA vs tiempo Tabla 19).



**Figura 46.-** Expresión de *c-Myc* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de venlafaxina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *c-Myc* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ .  $p <$ ;  $p <$  y  $p <$  ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10  $\mu\text{M}$  venlafaxina \*, \* y \*  $p < 0.05$   $p < 0.05$  Dunnett post test entre las dosis de 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p <$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis & & y &  $p < 0.05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento..

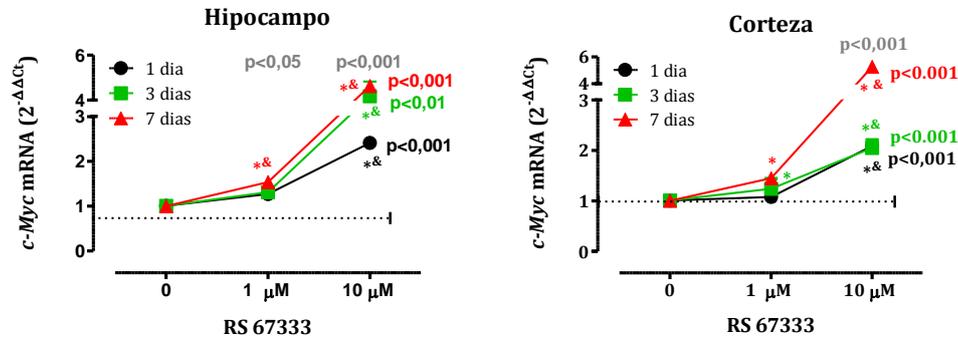
#### 2.4.2.2.4.- RS 67333

El tratamiento de las rodajas de cerebro con Rs6733, incrementa significativamente la expresión de *c-Myc* en el hipocampo y en corteza (Figura 47).

En el **hipocampo**, el tratamiento de las rodajas de cerebro con 1  $\mu\text{M}$  de RS 67333, produce un incremento significativo dosis y tiempo dependiente de la expresión de *c-Myc* (Figura 47). El efecto fue mayor con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  para todos los tiempos estudiados (27% y 141%;  $F=73,6$ ;  $p < 0,001$ ; 31% y 317%  $F=13,6$ ;  $p < 0,01$  y 54% y 363%;  $F=245,5$ ;  $p < 0,001$  respectivamente para 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  tras 1, 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). La expresión de *c-Myc* fue mayor tras 7 días de tratamiento que tras 1 dosis o tres días con la dosis baja, 10  $\mu\text{M}$  de RS 67333 producen el máximo incremento en la expresión de *c-Myc* a los 3 días de tratamiento ( $F=8,1$   $p < 0,05$ ;  $F=8,9$   $p < 0,01$  respectivamente para las dosis de 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  ANOVA vs tiempo, Tabla 19).

En la **corteza** (Figura 47) al igual que ocurre en el hipocampo, el RS 67333, incrementa de forma dosis y tiempo dependiente la expresión de *c-Myc*. La administración única de RS 67333 sólo incrementa

significativamente la expresión de *c-Myc* con la dosis 10  $\mu\text{M}$  (8% y 109%;  $F=27,5$   $p<0,001$ ; respectivamente para 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , ANOVA vs dosis). 3 y 7 días de tratamiento incrementa significativamente la expresión de *c-Myc* con todas las dosis estudiadas (24% y 105%;  $F=36,4$   $p<0,001$ ; y 45% y 427%;  $F=67,2$   $p<0,001$  respectivamente para 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , ANOVA vs dosis) el incremento fue mayor con 7 días que con dosis únicas o tres días de tratamiento en todas las dosis estudiadas y significativo para las dosis de 10  $\mu\text{M}$  ( $F=41,8$   $p<0,001$  Tabla 19).



**Figura 47.-** Expresión de *c-Myc* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) en de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1 $\mu\text{M}$  y 10 $\mu\text{M}$  de RS 67333 tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *c-Myc* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ .  $p<$ ;  $p<$  y  $p<$  ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10  $\mu\text{M}$  venlafaxina \*, \* y \*  $p<0,05$   $p<0,05$  Dunnett post test entre las dosis de 1 $\mu\text{M}$  y 10 $\mu\text{M}$  vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p<$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y &  $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

**Tabla 19.-** Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *c-Myc* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de ratas en respuesta a 1 $\mu\text{M}$  de fluoxetina y 1 $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *c-Myc* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$

<b>c-Myc hipocampo</b>					<b>c-Myc hipocampo</b>								
<b>1 día</b>					<b>3 días</b>								
	0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*		0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*		
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,01 ± 0,11	1,08 ± 0,13		0,9	ns	Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,08	0,92 ± 0,25		1,9	ns		
Paroxetina <sup>p</sup>	1,01 ± 0,11	1,46 ± 0,08 <sup>*5</sup>	2,71 ± 0,22 <sup>*59v&amp;</sup>	34,8	0,001	Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,08	1,46 ± 0,13 <sup>*</sup>	2,09 ± 0,10 <sup>*&amp;</sup>	75,6	0,001		
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,01 ± 0,11	1,13 ± 0,09	1,40 ± 0,05 <sup>*&amp;</sup>	5,3	0,05	Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,08	1,46 ± 0,13 <sup>*5</sup>	2,09 ± 0,09 <sup>*&amp;</sup>	8,4	0,05		
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,01 ± 0,11	1,27 ± 0,04	2,41 ± 0,09 <sup>*59v&amp;</sup>	76,3	0,001	RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,08	1,31 ± 0,05 <sup>*</sup>	4,17 ± 1,15 <sup>*5&amp;</sup>	13,6	0,01		
F''=; p< <sup>5&amp;</sup>	0,01	ns	3,5	0,05	36,7	0,001	F''=; p< <sup>5&amp;</sup>	0,01	ns	3,1	ns	5,2	0,05

<b>c-Myc hipocampo</b>					<b>c-Myc hipocampo</b>					
<b>7 días</b>					<b>1 <math>\mu\text{M}</math> 10 <math>\mu\text{M}</math></b>					
	0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*		F'	p< <sup>&amp;</sup>	F'	p< <sup>&amp;</sup>
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,01 ± 0,12	3,61 ± 0,11 <sup>5&amp;pv,rs&amp;</sup>		14,6	0,01	Fluoxetina	57,9	0,001		
Paroxetina <sup>p</sup>	1,01 ± 0,12	1,46 ± 0,13 <sup>*5</sup>	1,57 ± 0,01 <sup>*5&amp;</sup>	8,7	0,01	Paroxetina	0,2	ns	16,7	0,01
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,01 ± 0,12	1,46 ± 0,12 <sup>*5&amp;</sup>	1,54 ± 0,01 <sup>*5&amp;</sup>	8,1	0,01	Venlafaxina	2,8	ns	39,3	0,001
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,01 ± 0,12	1,54 ± 0,06 <sup>*5&amp;</sup>	4,63 ± 0,17 <sup>*59v,p&amp;</sup>	245,5	0,001	RS 67333	8,1	0,05	8,9	0,01
F''=; p< <sup>5&amp;</sup>	0,01	ns	85,8	0,001	250,6	0,001				

<b>c-Myc corteza</b>					<b>c-Myc corteza</b>								
<b>1 día</b>					<b>3 días</b>								
	0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*		0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*		
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,08	1,11 ± 0,04		1,5	ns	Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,05	1,01 ± 0,21		0,0	ns		
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,08	1,03 ± 0,03	1,29 ± 0,10 <sup>*</sup>	4,4	0,05	Paroxetina <sup>p</sup>	1,01 ± 0,05	1,25 ± 0,05 <sup>*5</sup>	1,43 ± 0,09 <sup>*&amp;</sup>	10,1	0,01		
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,08	1,14 ± 0,04	2,00 ± 0,04 <sup>*59p&amp;</sup>	91,6	0,001	Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,05	1,66 ± 0,12 <sup>*5&amp;</sup>	2,34 ± 0,12 <sup>59p&amp;</sup>	4,7	0,05		
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,08	1,08 ± 0,07	2,09 ± 0,17 <sup>*59p&amp;</sup>	27,5	0,001	RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,05	1,24 ± 0,36 <sup>*</sup>	2,05 ± 0,28 <sup>*5&amp;</sup>	36,4	0,001		
F''=; p< <sup>5&amp;</sup>	0,02	ns	1,1	ns	24,2	0,001	F''=; p< <sup>5&amp;</sup>	0,01	ns	6,8	0,01	14,1	0,001

<b>c-Myc corteza</b>					<b>c-Myc corteza</b>					
<b>7 días</b>					<b>1 <math>\mu\text{M}</math> 10 <math>\mu\text{M}</math></b>					
	0	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	F=	p<*		F'	p< <sup>&amp;</sup>	F'	p< <sup>&amp;</sup>
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,04	6,05 ± 0,58 <sup>59v,rs&amp;</sup>		15,5	0,001	Fluoxetina	65,9	0,001		
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,04	1,45 ± 0,24 <sup>*</sup>	2,09 ± 0,08 <sup>*5&amp;</sup>	13,1	0,01	Paroxetina	0,11	ns	30,2	0,001
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,04	1,74 ± 0,11 <sup>*&amp;</sup>	2,46 ± 0,11 <sup>*5&amp;</sup>	59,8	0,001	Venlafaxina	31,3	0,01	55,6	0,001
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,04	1,45 ± 0,14 <sup>*</sup>	5,27 ± 0,47 <sup>*59v,p&amp;</sup>	67,2	0,001	RS 67333	1,8	ns	41,8	0,001
F''=; p< <sup>5&amp;</sup>	0,02	ns	51,2	0,001	59,9	0,001				

F=análisis de la varianza para cada fármaco respecto a la dosis. \* $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post test para las distintas dosis en cada fármaco. F': análisis de la varianza para cada fármaco y dosis respecto al tiempo de tratamiento, & $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post test para los distintos tiempos. F'': análisis de la varianza para cada dosis y tiempo respecto al fármaco, <sup>5</sup> $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post test para los distintos fármacos.

**Resumen de la expresión de *c-Myc* en cerebro**

Todos los antidepresivos estudiados incrementan la expresión de *c-Myc* en el hipocampo y en la corteza. El mayor incremento se observó con RS 67333 tanto en hipocampo como en corteza. (Tabla 19).

**2.5. c-Jun**

2.5.1.- Expresión basal de c-Jun en células progenitoras de hipocampo y en cerebro

En condiciones basales, la expresión de c-Jun, con respecto al gen calibrador GAPDH, fue similar en las CPH  $\Delta C_t=7,4\pm 0,5$ ; el hipocampo ( $\Delta C_t= 6,1\pm 0,5$ ) y la corteza ( $\Delta C_t=6,9\pm 0,1$ ; ver Figura 48).

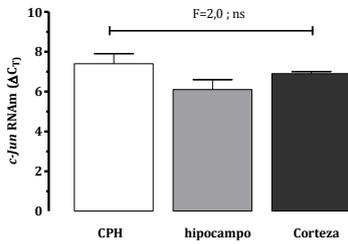


Figura 48.- Nivel de expresión basal de c-Jun en cultivo de células progenitoras de hipocampo y en tejido de hipocampo y corteza de cultivos de rodajas de cerebro. CPH: cultivo de células progenitoras de hipocampo, F=ANOVA.

2.5.2.- Modulación de la expresión de c-Jun por fármacos antidepresivos

2.5.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH)

De los antidepresivos incluidos en el estudio, sólo **venlafaxina** y **paroxetina** incrementan, de forma significativa, la expresión de c-Jun en las CPH (ver Figura 49). La **fluoxetina** y el **RS 67333**, no modifican significativamente el nivel de expresión del gen para ninguno de los tiempos estudiados (ver Tabla 20). La **venlafaxina**, produce un incremento precoz y significativo en el nivel de expresión de c-Jun a la hora de tratamiento (41%;  $F=8,3$ ;  $p<0,01$ ; ANOVA vs tiempo). La **paroxetina**, produce un incremento menor, más tardío significativo a las 24 horas (27% y 29%, respectivamente para 16 y 24 horas;  $F=4,1$ ;  $p<0,05$ ; ANOVA vs tiempo, ver Tabla 20).

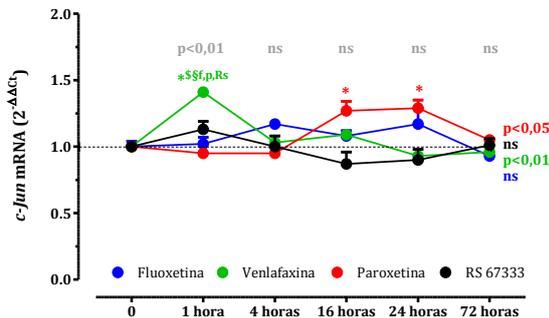


Figura 49.- Curso temporal de la expresión de c-Jun en células progenitoras de hipocampo en respuesta a 1 $\mu$ M de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333. La expresión de c-Jun se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .  $p<$ ;  $p<$ ;  $p<$  y  $p<$  ANOVA del efecto de cada fármaco vs el tiempo de tratamiento; \*, \*, \* y \*  $p<0,05$  Dunnett post test para cada fármaco vs el control.  $p<$  ANOVA del efecto de los distintos fármacos vs el control.  $p<0,05$  Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control para cada tiempo de tratamiento; \$, \$ y \$  $p<0,05$  Dunnett post test entre los distintos fármacos y Rs=RS 67333 para cada tiempo de tratamiento. \$, \$, \$ y \$  $p<0,05$  Student-Newman-Keuls post test entre los distintos fármacos, f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333 para cada tiempo de tratamiento.

Resumen de la expresión de c-Jun en CPH

Venlafaxina y paroxetina incrementan la expresión de c-Jun en las CPH. El mayor incremento se observa tras 1 hora con venlafaxina (Tabla 20).

Tabla 20.- Curso temporal de la expresión de c-Jun en células progenitoras de hipocampo en respuesta 1 $\mu$ M de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina o RS 67333. La expresión de c-Jun se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$

c-Jun células progenitoras de hipocampo							F=	p<*
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas	72 horas			
Control	1,00 ± 0,09	1,00 ± 0,08	1,00 ± 0,08	1,00 ± 0,08	1,01 ± 0,18			
Fluoxetina	1,02 ± 0,05	1,17 ± 0,04	1,08 ± 0,07	1,17 ± 0,21	0,93 ± 0,01	1,0	ns	
Paroxetina	0,95 ± 0,02	0,95 ± 0,03	1,27 ± 0,13*	1,29 ± 0,10*	1,05 ± 0,01	4,1	0,05	
Venlafaxina	1,41 ± 0,05*\$\$f,p,Rs	1,03 ± 0,04	1,09 ± 0,04	0,93 ± 0,07	0,96 ± 0,06	8,3	0,01	
RS 67333	1,13 ± 0,11	1,00 ± 0,15	0,87 ± 0,15	0,90 ± 0,13	1,00 ± 0,08	0,7	ns	
F'=: $p<^{S,\$}$	6,5	0,01	1,1	ns	2,1	ns		
						1,7	ns	
						0,7	ns	

F=análisis de la varianza del efecto de cada fármaco a lo largo del tratamiento, &  $p<0,05$  Dunnett post test para cada fármaco vs el control. F': análisis de la varianza entre e efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento. \$  $p<0,05$  Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control en cada tiempo de tratamiento. \$Student-Newman-Keuls post test entre los distintos fármacos (f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333) en cada tiempo de tratamiento.

### 2.5.2.2.- Cerebro

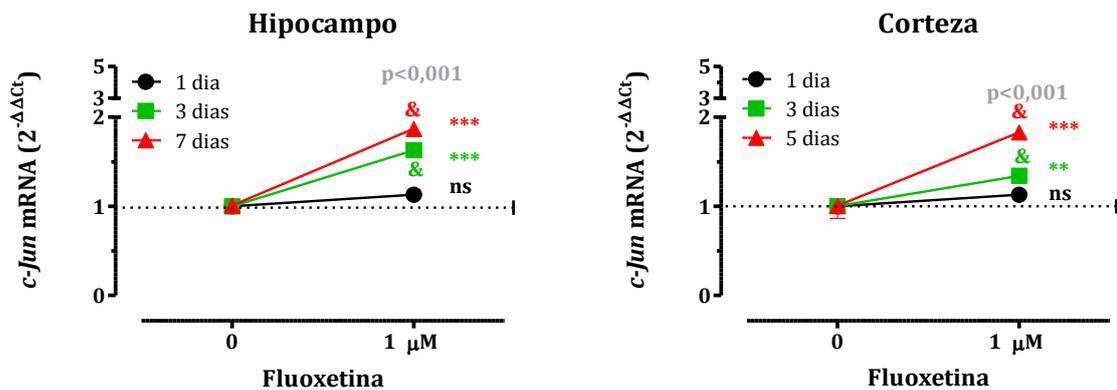
#### 2.5.2.2.1- Fluoxetina

El tratamiento de la rodajas de cerebro con 1  $\mu\text{M}$  de fluoxetina 1, 3 y 7 días, incrementa de forma significativa y tiempo dependiente la expresión de *c-Jun* tanto en el hipocampo ( $F=44,5$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA vs tiempo) como en la corteza ( $F=70,6$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA vs tiempo).

En el **hipocampo**, fluoxetina modifica significativamente la expresión del gen para 3 y 7 de tratamiento, sin cambios tras 1 dosis (13%; ns, 63%;  $p<0,001$  y 87%  $p<0,001$ , *t* de Student, ver Figura 50 y Tabla 21).

En la **corteza**, el efecto de la fluoxetina sobre la expresión de *c-Jun* es similar al descrito en el hipocampo. 3 y 7 días, pero no 1 día, de tratamiento con 1  $\mu\text{M}$  de fluoxetina incrementa de forma significativa, la expresión de *c-Jun* (13%; ns, 34%;  $p<0,001$  y 83%  $p<0,001$ , *t* de Student, ver Figura 50 y Tabla 21).

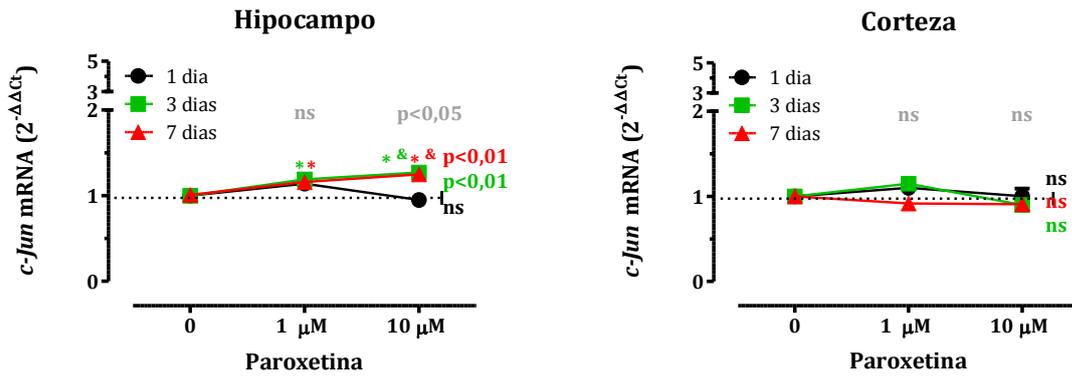
#### 2.5.2.2.2- - Paroxetina



**Figura 50.-** Expresión de *c-Jun* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1  $\mu\text{M}$  de fluoxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *c-Jun* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ . \*, \*y \* *t* de Student para 1, 3 y 7 días de tratamiento para la dosis de 1  $\mu\text{M}$  en cada tiempo de tratamiento  $p<$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para 1  $\mu\text{M}$ . & y &  $p<0,05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

En el **hipocampo** (Figura 51), la administración aguda de paroxetina (1 día) no modifica significativamente la expresión de *c-Jun* ( $F=1,0$ ; ns). El tratamiento de las rodajas de cerebro durante 3 o 7 días, produce un incremento similar dosis dependiente y significativo de la expresión del gen (19% y 27%;  $F=14,5$ ;  $p<0,01$  y 16% y 25%;  $F=15,4$ ;  $p<0,01$  respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$  a los 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis, **Tabla 21**). 10  $\mu\text{M}$  de paroxetina incrementa de forma tiempo dependiente la expresión de *c-Jun*, (0%, 27% y 25,  $F=8,9$ ;  $p<0,05$  respectivamente para 1 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs tiempo, **Tabla 21**)

En la **corteza**, No se observaron cambios significativos en la expresión de *c-Jun* para ninguna dosis ni tiempos estudiados. (Ver Figura 51 y Tabla 21).



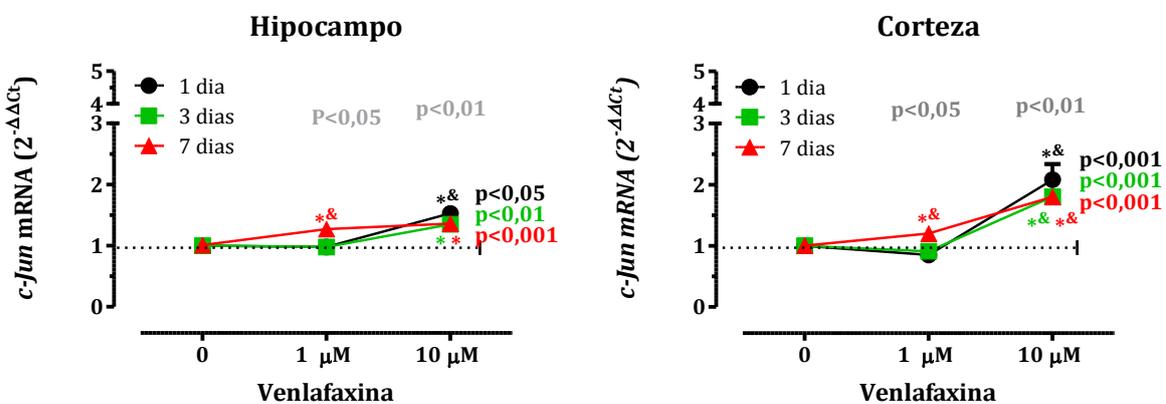
**Figura 51.-** Expresión de *c-Jun* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de paroxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *c-Jun* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ . p<; p< y p< ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \* p<0.05 p<0.05 Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento. p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis & & y & p<0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento..

### 2.5.2.2.3- Venlafaxina

El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 µM y 10 µM de venlafaxina modifica de forma significativa la expresión de *c-Jun* tanto en el hipocampo como en la corteza.

En el **hipocampo** (Figura 52), 1 µM de venlafaxina incrementan la expresión de *c-Jun* solo tras 7 días de tratamiento no con 1 o 3 dosis (27%, Tabla 21). La dosis de 10 µM, incrementa de forma significativa el nivel de expresión del gen con 1 dosis (53%;  $F=5,6$ ;  $p<0,05$ , ANOVA vs dosis), 3 dosis (35%;  $F=9,8$ ;  $p<0,01$ , ANOVA vs dosis) y 7 dosis (36%;  $F=55,4$ ;  $p<0,001$ , ANOVA vs dosis), el nivel de expresión es máximo con 1 dosis, dosis repetidas no incrementan más en nivel de expresión de *c-Jun* que una dosis única. El incremento de expresión del gen producido por venlafaxina es tiempo-dependiente ( $F=7,8$ ;  $p<0,05$  y  $F=20,8$ ;  $p<0,001$ ; respectivamente para 1 y 10 µM, ANOVA vs tiempo, Tabla 21).

En **corteza** (Figura 52), el efecto de venlafaxina sobre la expresión de *c-Jun* es similar al descrito en el hipocampo para este fármaco, el nivel de expresión fue mayor en la corteza que en el hipocampo. 1 µM venlafaxina produce un incremento significativo la expresión de *c-Jun* solo tras 7 días de tratamiento (20%). La dosis de 10 µM, incrementa de forma significativa el nivel de expresión del gen con 1 dosis (108%;  $F=27,8$ ;  $p<0,001$ , ANOVA vs dosis), 3 dosis (80%;  $F=57,7$ ;  $p<0,001$ , ANOVA vs dosis) y 7 dosis (80%;  $F=144,4$ ;  $p<0,001$ , ANOVA vs dosis), el nivel de expresión es máximo con 1 dosis, dosis repetidas no incrementan más en nivel de expresión de *c-Jun* que una dosis única. El incremento de expresión del gen producido por venlafaxina es tiempo-dependiente ( $F=5,1$ ;  $p<0,05$  y  $F=15,1$ ;  $p<0,01$ ; respectivamente para 1 y 10 µM, ANOVA vs tiempo, Tabla 21).



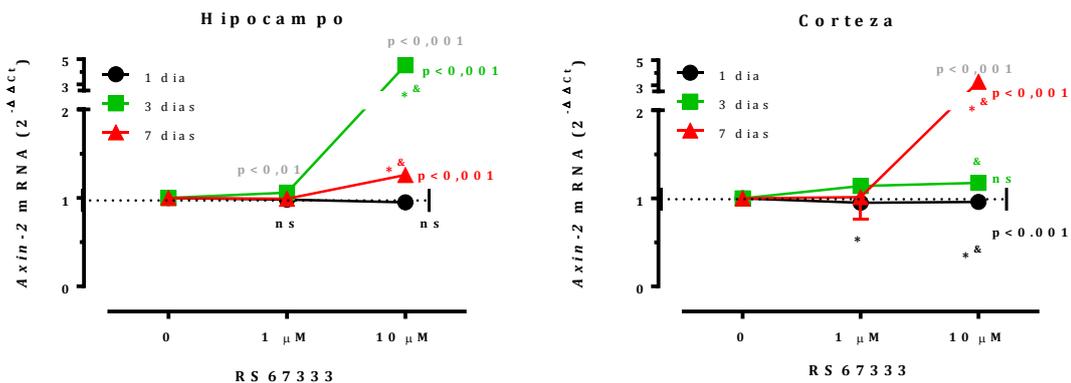
**Figura 52.- Expresión de *c-Jun* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de venlafaxina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *c-Jun* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . p<; p< y p< ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \* p<0.05 p<0.05 Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento. p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y & p<0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.**

### 2.5.2.2.1- RS 67333

El tratamiento de las rodajas de cerebro con RS 67333, produce un incremento significativo y similar de la expresión de *c-Jun* en hipocampo y corteza sólo con dosis de 10µM.

En el **hipocampo**, la dosis de 1µM de RS 67333 no produce incrementos significativos de la expresión de *c-Jun* en dosis únicas, 3 dosis o 7 dosis. La dosis de 10µM de RS 67333, incrementa de forma significativa y tiempo-dependiente (F=20,8; p<0,001; ANOVA vs tiempo) la expresión de *c-Jun* (22%; F=6,7; p<0,05 dosis única, 169%; F=24,2 p<0,01 3 dosis y 622%; F=46,2; p<0,001 con 7 dosis, ANOVA vs dosis ver ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. y Tabla 21).

En la **corteza**, 10µM de RS 67333, incrementa significativamente la expresión de *c-Jun* con 3 (193%; F=224,1; p<0,001; ANOVA vs dosis) y 7 días de tratamiento (304%; F=423,3; p<0,001; ANOVA vs dosis) pero no con una dosis única. El incremento fue tiempo-dependiente (F: 82,3 p<0,001; ANOVA vs tiempo). Al igual que en el hipocampo, no observamos cambios significativos en el nivel de expresión de *c-Jun* en la corteza con la dosis de 1µM de RS 67333 para ninguno de los tiempos estudiados, (ver ¡Error! No se



**Figura 53.- Expresión de *Axin2* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de RS 67333. La expresión de *Axin2* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . p<; p< y p< ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \* p<0.05 p<0.05 Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento. p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y & p<0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.**

encuentra el origen de la referencia. y Tabla 21).

#### Resumen de la expresión de *c-Jun* en cerebro

El mayor incremento en la expresión de *c-Jun* en el cerebro, se observó con la administración repetida (3 y 7 dosis) de 10µM RS 67333 tanto en hipocampo como en corteza, Tabla 21.

## 2.6. Ccnd1

### 2.6.1.- Expresión basal de *Ccnd1* en células progenitoras de hipocampo y en cerebro

**En condiciones basales**, en las CPH expresan niveles de *Ccnd1* de  $\Delta Ct=0,1\pm 0,6$  con respecto al gen calibrador (GAPDH). En hipocampo la expresión basal de *Ccnd1* fue menor  $\Delta Ct=5,7\pm 0,3$  que en las CPH y

similar a la corteza y  $\Delta Ct=5,7\pm 0,4$ . Estos datos muestran una expresión mayor de *Ccnd1*, unas 50 veces superior, en los cultivos de CPH al observado en el hipocampo y en la corteza (Figura 54).

**Tabla 21 .- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *c-Jun* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *c-Jun* se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$**

c-Jun hipocampo 1 día					c-Jun hipocampo 3 días							
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*		0	1 µM	10 µM	F=	p<*	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,08	1,13 ± 0,03	0,95 ± 0,09	0,1	ns	Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,05	1,63 ± 0,11 <sup>*\$p,v,RS</sup>	1,27 ± 0,07 <sup>*\$</sup>	9,3	0,001	
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,08	1,14 ± 0,03	0,95 ± 0,09	1,0	ns	Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,05	1,13 ± 0,05 <sup>*\$</sup>	1,27 ± 0,07 <sup>*\$</sup>	14,5	0,01	
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,08	0,98 ± 0,17	1,53 ± 0,13 <sup>*\$p,RS</sup>	5,6	0,05	Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,05	0,98 ± 0,03	1,35 ± 0,08 <sup>*\$</sup>	9,8	0,01	
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,08	1,00 ± 0,02	1,22 ± 0,02 <sup>*\$</sup>	6,7	0,05	RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,05	0,91 ± 0,01	2,69 ± 0,61 <sup>*\$p,RS</sup>	24,2	0,01	
F''=;	p< <sup>\$</sup>	0,01	ns	1,12	ns	8,8	0,01	ns	60,0	0,001	14,2	0,001

c-Jun hipocampo 7 días					c-Jun hipocampo 1 µM		c-Jun hipocampo 10 µM		
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*	F'	p< <sup>\$</sup>	F'	p< <sup>\$</sup>
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,01 ± 0,04	1,87 ± 0,17 <sup>*\$p,RS</sup>	1,25 ± 0,03 <sup>*\$</sup>	8,6	0,001	44,5	0,001	8,9	0,05
Paroxetina <sup>p</sup>	1,01 ± 0,04	1,16 ± 0,04 <sup>*</sup>	1,25 ± 0,03 <sup>*\$</sup>	15,4	0,01	3,3	ns	20,8	0,001
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,01 ± 0,04	1,27 ± 0,05 <sup>*\$</sup>	1,36 ± 0,04 <sup>*\$</sup>	55,4	0,001	7,8	0,05	35,7	0,001
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,01 ± 0,04	1,20 ± 0,02 <sup>*\$</sup>	7,22 ± 1,56 <sup>*\$p,v,RS</sup>	46,2	0,001	4,1	0,05	35,7	0,001
F''=;	p< <sup>\$</sup>	0,03	ns	6,2	0,05	68,4	0,001		

c-Jun corteza 1 día					c-Jun corteza 3 días						
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*		0	1 µM	10 µM	F=	p<*
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,03	1,13 ± 0,10	1,00 ± 0,14	1,3	ns	Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,05	1,34 ± 0,08 <sup>*\$p,v,RS</sup>	0,90 ± 0,12	6,2	0,01
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,03	1,1 ± 0,01 <sup>*</sup>	1,00 ± 0,14	0,5	ns	Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,05	1,15 ± 0,09	0,90 ± 0,12	2,6	ns
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,03	0,85 ± 0,07	2,08 ± 0,37 <sup>*\$p,RS</sup>	27,8	0,001	Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,05	0,91 ± 0,07	1,80 ± 0,17 <sup>*\$p,RS</sup>	57,7	0,001
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,01 ± 0,03	1,00 ± 0,04	1,11 ± 0,12	0,7	ns	RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,05	0,90 ± 0,07	2,93 ± 0,21 <sup>*\$p,RS</sup>	224,1	0,001
F''=;	p< <sup>\$</sup>	0,33	ns	0,7	ns	18,6	0,01	117,7	0,001		

c-Jun corteza 7 días					c-Jun corteza 1 µM		c-Jun corteza 10 µM		
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*	F'	p< <sup>\$</sup>	F'	p< <sup>\$</sup>
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,01 ± 0,09	1,83 ± 0,03 <sup>*\$p,v,RS</sup>	0,91 ± 0,03	15,1	0,001	70,6	0,001	2,1	ns
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,09	0,92 ± 0,02	0,91 ± 0,03	0,9	ns	0,7	ns	15,1	0,01
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,09	1,20 ± 0,06 <sup>*\$p,RS</sup>	1,80 ± 0,06 <sup>*\$p,RS</sup>	144,4	0,001	5,1	0,05	82,3	0,001
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,09	1,10 ± 0,12	4,04 ± 0,21 <sup>*\$p,RS</sup>	423,3	0,001	4,9	ns	82,3	0,001
F''=;	p< <sup>\$</sup>	0,03	ns	71,8	0,001	164,7	0,001		

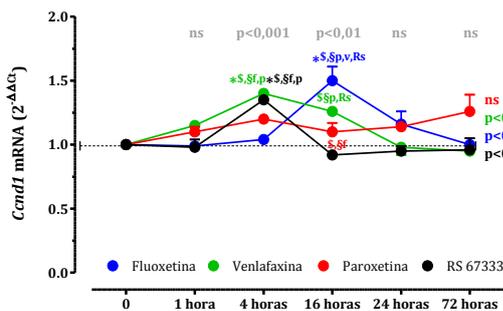
F=análisis de la varianza para cada fármaco respecto a la dosis. \*<0.05 Student–Newman–Keuls post test para las distintas dosis en cada fármaco. F': análisis de la varianza para cada fármaco y dosis respecto al tiempo de tratamiento, \*p<0.05 Student–Newman–Keuls post test para los distintos tiempos. F'': análisis de la varianza para cada dosis y tiempo respecto al fármaco, \$ p<0.05 Student–Newman–Keuls post test para los distintos fármacos.

**2.6.2.- Modulación de la expresión de *Ccnd1* por fármacos antidepresivos**

**2.6.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH)**

El tratamiento de las CPH con 1µM de fluoxetina (F=5,1; p<0,05; F: 82,3 p<0,001; ANOVA vs tiempo), venlafaxina (F=6,1; p<0,01; F: 82,3 p<0,001; ANOVA vs tiempo) y RS 67333 (F=4,2; p<0,05; F: 82,3 p<0,001; ANOVA vs tiempo), pero no de paroxetina (F=0,7; ns; F: 82,3 p<0,001; ANOVA vs tiempo), incrementan significativamente nivel de expresión de *Ccnd1* pero con distinto curso temporal (Figura 55)

1 µM RS 67333 o venlafaxina incrementan la expresión de *Ccnd1* de forma rápida a las 4 horas (40% y 35%, respectivamente para venlafaxina y RS 67333; F'=12,7; p<0,001; F: 82,3 p<0,001; ANOVA vs fármaco), el incremento en la expresión del gen producido por venlafaxina, se mantiene elevado durante 16 horas. 1 µM de fluoxetina, produce un incremento de la expresión de *Ccnd1* más tardío, a las 16 horas (50%; F'=8,5; p<0,01; ANOVA vs fármaco, Tabla 22).



**Figura 55.- Curso temporal de la expresión de *Ccnd1* en células progenitoras de hipocampo en respuesta a 1µM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  p<; p<; p< y p< ANOVA del efecto de cada fármaco vs el tiempo de tratamiento; \*, \* y \* p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. p<ANOVA del efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento; \$, \$ y \$ p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control para cada**

**Tabla 22.- Curso temporal de la expresión de *Ccnd1* en células progenitoras de hipocampo** en respuesta 1µM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina o RS 67333. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

<b><i>Ccnd1</i> células progenitoras de hipocampo</b>										
	<b>1 hora</b>	<b>4 horas</b>	<b>16 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>F=</b>	<b>p&lt;*</b>			
Control	1,00 ± 0,07	1,00 ± 0,03	1,01 ± 0,04	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,10					
Fluoxetina	0,99 ± 0,02	1,04 ± 0,01	1,50 ± 0,16* <sup>§,§p,v,RS</sup>	1,16 ± 0,12	1,00 ± 0,04	5,1	0,05			
Paroxetina	1,10 ± 0,07	1,20 ± 0,03 <sup>§,§f</sup>	1,10 ± 0,01	1,14 ± 0,05	1,26 ± 0,23	0,7	ns			
Venlafaxina	1,15 ± 0,11	1,40 ± 0,08* <sup>§,§f,p</sup>	1,26 ± 0,04 <sup>§§p,RS</sup>	0,98 ± 0,08	0,95 ± 0,02	6,1	0,01			
RS 67333	0,98 ± 0,09	1,35 ± 0,04* <sup>§,§f,p</sup>	0,92 ± 0,02	0,95 ± 0,07	0,96 ± 0,13	4,2	0,05			
F <sup>2</sup> ; p< <sup>§,§</sup>	1,0	ns	48,5	0,001	8,5	0,01	1,4	ns	3,4	ns

F=análisis de la varianza del efecto de cada fármaco a lo largo del tratamiento, & p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. F': análisis de la varianza entre e efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento. § p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control en cada tiempo de tratamiento. §§Student-Newman-Keuls post test entre los distintos fármacos (f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333) en cada tiempo de tratamiento.

#### Resumen de la expresión de *Ccnd1* en CPH

La fluoxetina es el fármaco que más incrementa la expresión de *Ccnd1*, pero el efecto es más tardío que el obtenido con venlafaxina y RS 67333, (Tabla 22).

### 2.6.2.2.- Cerebro

#### 2.6.2.2.1.- Fluoxetina

El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 µM de fluoxetina, incrementa la expresión de *Ccnd1* en el hipocampo más que en la corteza con 7 días tratamiento.

En el **hipocampo**, el incremento en la expresión de *Ccnd1* por fluoxetina es significativo con 1 día (20%;  $t=4,1$ ;  $p<0,05$ ;  $t$  de Student), 3 días (36%;  $t=8,6$ ;  $p<0,01$ ;  $t$  de Student) y 7 días de tratamiento (104%;  $t=10,5$ ;  $p<0,001$ ;  $t$  de Student). 7 días de tratamiento con 1 µM de fluoxetina producen un efecto mayor que 1 y 3 dosis ( $F'=68,5$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA vs tiempo, ver Figura 56 y

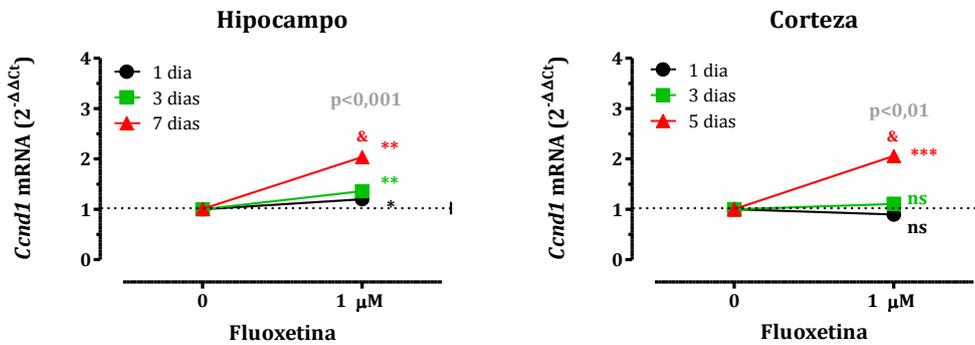
**Tabla 23.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Ccnd1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1  $\mu$ M de fluoxetina y 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

).

En la **corteza**, sólo se observa un incremento significativo en el nivel de expresión de *Ccnd1* tras 7 días de tratamiento (106%;  $t=41,5$ ;  $p<0,001$ ;  $t$  de Student) pero no con una (-10%;  $t=0,5$ ; ns,  $t$  de Student) o tres dosis de fluoxetina (11%;  $t=0,7$ ; ns,  $t$  de Student). 7 días de tratamiento con 1  $\mu$ M de fluoxetina producen un efecto mayor que 3 dosis ( $F'=38,1$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA vs tiempo, ver Figura 56 y

**Tabla 23.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Ccnd1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$**

).



**Figura 56.- Expresión de *Ccnd1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM de fluoxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . \*, \*y \* t de Student para 1, 3 y 7 días de tratamiento para la dosis de 1µM en cada tiempo de tratamiento p < ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para 1µM. & , & y & p < 0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.**

#### 2.6.2.2.2.- Paroxetina

El tratamiento con 1 µM o 10 µM paroxetina no modifica la expresión de *Ccnd1* en el **hipocampo**, a ninguno de los tiempos estudiados (F=2,0; ns, F= 1,5; ns y F=1,8; ns, respectivamente para uno, tres y siete días de tratamiento, ANOVA vs dosis) ni en la corteza (F=2,2; ns, F= 1,2; ns y F=1,7; ns, respectivamente para uno, tres y siete días de tratamiento, ANOVA vs dosis, ver Figura 57 y

Tabla 23.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Ccnd1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

).

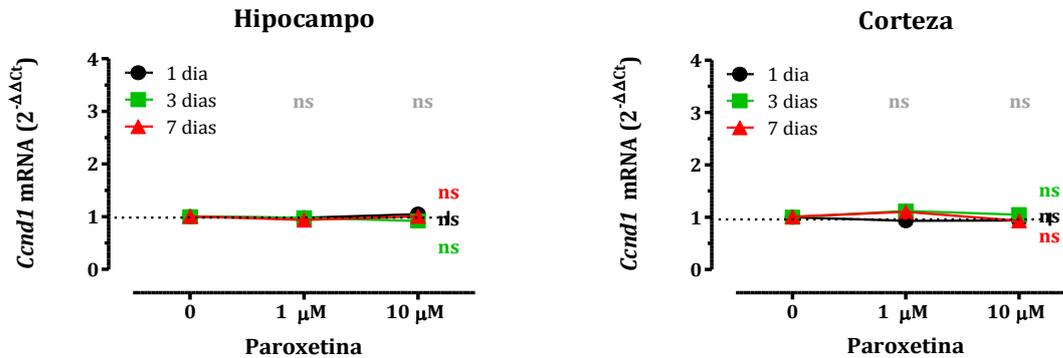


Figura 57.- Expresión de *Ccnd1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de paroxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .  $p < p < p <$  ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \*  $p < 0.05$   $p < 0.05$  Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p <$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis & & y  $p < 0.05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

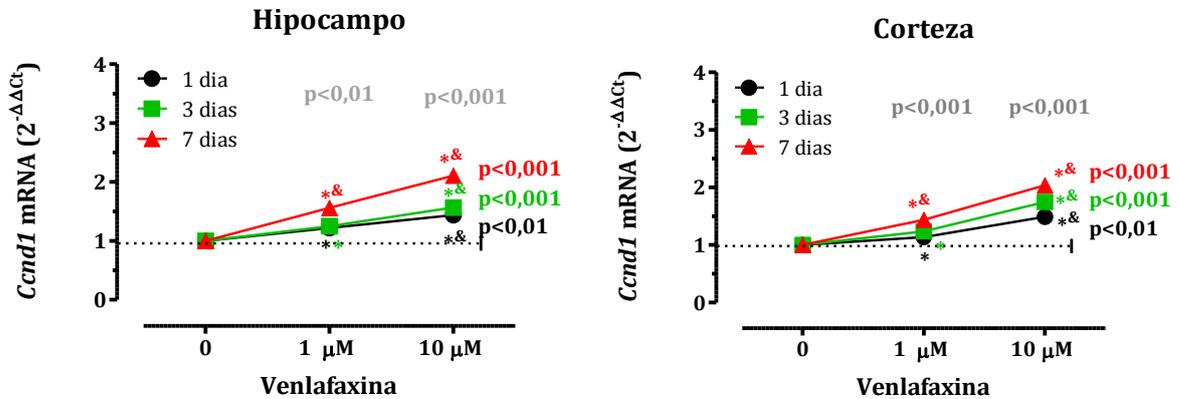
#### 2.6.2.2.3.- Venlafaxina

El tratamiento de las rodajas de cerebro con venlafaxina modifica de forma significativa la expresión de *Ccnd1* tanto en el hipocampo como en la corteza (Figura 58)

En el **hipocampo**, la venlafaxina incrementa significativamente la expresión de *Ccnd1* de forma dosis dependiente (22% y 44%;  $F = 23,1$ ;  $p < 0,01$ ; 25%; y 57%;  $F = 42,2$ ;  $p < 0,001$  y 56% y 111%;  $F = 792,2$ ;  $p < 0,001$  respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis. El efecto fue tiempo dependiente y significativamente mayor con 7 días de tratamiento ( $F = 11,3$ ;  $p < 0,01$  y  $F = 133,9$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente para las dosis de 1 y 10 µM, ANOVA vs tiempo, ver Figura 58 y

**Tabla 23.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Ccnd1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$**

).



**Figura 58.- Expresión de *Ccnd1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de venlafaxina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . p<; p< y p< ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \* p<0.05 p<0.05 Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento. p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y & p<0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.**

En la **corteza**, El efecto de la fue similar al descrito en el hipocampo. La venlafaxina incrementa significativamente la expresión de *Ccnd1* de forma dosis dependiente (14% y 49%; F= 23,1; p<0,01; 24%; y 75%; F=173,3; p<0,001 y 44% y 104%; F= 147,8; p<0,001 respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El efecto fue tiempo dependiente y significativamente mayor con 7 días de tratamiento (F'=63,2; p<0,001 y F'=60,3; p<0,001, respectivamente para las dosis de 1 y 10 µM, ANOVA vs tiempo, ver Figura 58 y

**Tabla 23.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Ccnd1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

).

#### 2.6.2.2.4.- RS 67333

El tratamiento de las rodajas de cerebro con RS 67333 modifica significativamente la expresión de *Ccnd1* en el hipocampo y en la corteza, ver Figura 59.

En el **hipocampo**, RS 67333 incrementa de forma dosis dependiente y significativa la expresión de *Ccnd1* a 1 3 y 7 días de tratamiento (21% y 84%; F= 248,9; p<0,001; 41%; y 197%; F=74,5; p<0,001 y 127% y 273%; F= 117,7; p<0,001 respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El efecto fue tiempo dependiente y significativamente mayor con 7 días de tratamiento (F'=24,8; p<0,001 y F'=131,3; p<0,001, respectivamente para las dosis de 1 y 10 µM, ANOVA vs tiempo, ver Figura 59 y

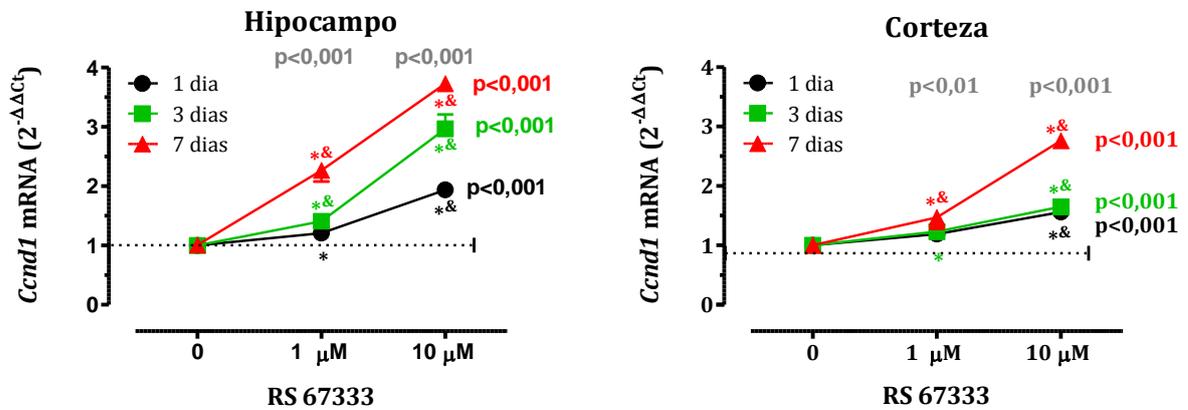
**Tabla 23.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Ccnd1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

).

En la **corteza** el efecto del tratamiento con RS 67333 sobre la expresión de *Ccnd1* es similar al descrito en el hipocampo, los niveles de expresión alcanzados fueron menores que en el hipocampo sobre todo con 3 días de tratamiento (19% y 56%;  $F=119,7$ ;  $p<0,001$ ; 23% y 65%;  $F=199,5$ ;  $p<0,001$  y 47% y 176%;  $F=56,4$ ;  $p<0,001$  respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El efecto fue tiempo dependiente y significativamente mayor con 7 días de tratamiento ( $F'=8,7$ ;  $p<0,01$  y  $F'=522,1$ ;  $p<0,001$ , respectivamente para las dosis de 1 y 10 µM, ANOVA vs tiempo, ver Figura 59 y

**Tabla 23.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Ccnd1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$**

).



**Figura 59.- Expresión de *Ccnd1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) en cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de RS 67333 tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .  $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \*  $p < 0,05$   $p < 0,05$  Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p < 0,001$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y &  $p < 0,05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.**

#### Resumen de la expresión de *Ccnd1* en cerebro

Fluoxetina, venlafaxina y RS 67333 incrementan la expresión de *Ccnd1*, el efecto es más precoz con venlafaxina y RS 67333 que es el fármaco que más incrementa la expresión de *Ccnd1*,

**Tabla 23.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Ccnd1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$**



F=597.2  $p<0.001$ , ANOVA vs tiempo), observándose a las 72 horas una disminución (-31%) de la expresión de *Ppar $\gamma$* . La venlafaxina y el RS 67333 producen un incremento significativo en la expresión de *Ppar $\gamma$*  desde 1 hora (214% y 165%), que se mantiene elevado hasta las 24 horas (288% y 190%, F=16,1; y F=195,7  $p<0.001$ , respectivamente para venlafaxina y RS 67333, ANOVA vs tiempo). El RS6733 pero no la venlafaxina, producen una disminución significativa de la expresión de *Ppar $\gamma$*  a las 24 horas (-76% y más a las 72 horas (-86%). Por el contrario la paroxetina produce un incremento más tardío (16 horas) en la expresión del gen (264%, F=29,9;  $p<0.001$ , ANOVA vs tiempo, Tabla 24)

#### Resumen de la expresión de *Ppar $\gamma$* en CPH

La venlafaxina y Paroxetina inducen los niveles más altos de expresión de *Ppar $\gamma$* . RS 67333 y venlafaxina producen el incremento más rápido, Tabla 24.

**Tabla 24.- Curso temporal de la expresión de *Ppar $\gamma$*  en células progenitoras de hipocampo en respuesta 1 $\mu$ M de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina o RS 67333. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$**

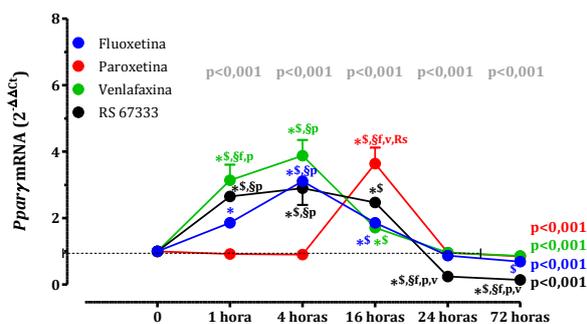
<b><i>Ppar<math>\gamma</math></i> células progenitoras de hipocampo</b>							F=	p<*		
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas	72 horas					
Control	1,00 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,11					
Fluoxetina	1,86 $\pm$ 0,15*	3,11 $\pm$ 0,61* <sup>§p</sup>	1,86 $\pm$ 0,14* <sup>§</sup>	0,87 $\pm$ 0,04	0,69 $\pm$ 0,16 <sup>§</sup>	33,2	0,001			
Paroxetina	0,92 $\pm$ 0,04	0,90 $\pm$ 0,04	3,64 $\pm$ 0,85* <sup>§f,v,RS</sup>	0,96 $\pm$ 0,05 <sup>§</sup>	0,85 $\pm$ 0,07	29,9	0,001			
Venlafaxina	3,14 $\pm$ 0,94* <sup>§f,p</sup>	3,88 $\pm$ 0,95* <sup>§p</sup>	1,71 $\pm$ 0,13* <sup>§</sup>	0,96 $\pm$ 0,17	0,86 $\pm$ 0,12	16,1	0,001			
RS 67333	2,65 $\pm$ 0,28* <sup>§p</sup>	2,90 $\pm$ 0,10* <sup>§p</sup>	2,47 $\pm$ 0,22* <sup>§</sup>	0,24 $\pm$ 0,03* <sup>§f,p,v</sup>	0,14 $\pm$ 0,03* <sup>§f,p,v</sup>	195,7	0,001			
F <sup>2</sup> ; p< <sup>§</sup>	12,6	0,001	20,7	0,001	18,1	0,001	38,1	0,001	32,4	0,001

F=análisis de la varianza del efecto de cada fármaco a lo largo del tratamiento, &  $p<0.05$  Dunnett post test para cada fármaco vs el control. F<sup>2</sup>: análisis de la varianza entre e efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento. §  $p<0.05$  Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control en cada tiempo de tratamiento. §Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos (f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333) en cada tiempo de tratamiento.

### 2.7.2.2.- Cerebro

#### 2.7.2.2.1.- Fluoxetina

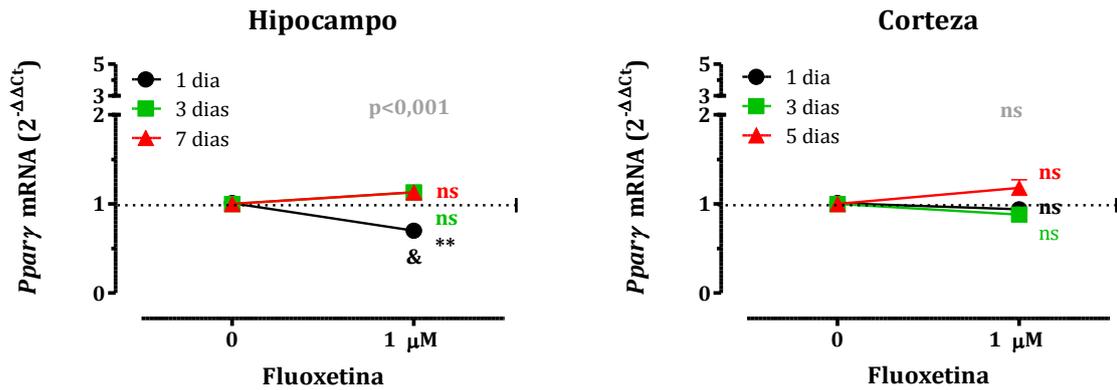
El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1  $\mu$ M de fluoxetina sólo modifica la expresión de *Ppar $\gamma$*  en hipocampo, sin cambios significativos en la corteza (ver Figura 62).



**Figura 61.- Curso temporal de la expresión de *Ppar $\gamma$*  en células progenitoras de hipocampo en respuesta a 1 $\mu$ M de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$  p< p< p< y p< ANOVA del efecto de cada fármaco vs el tiempo de tratamiento; \*, \*, \* y \*  $p<0.05$  Dunnett post test para cada fármaco vs el control. p<ANOVA del efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento; \$, \$ y \$  $p<0.05$  Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control para cada tiempo de tratamiento, \$, \$ y \$  $p<0.05$  Student–Newman–Keuls post test entre los distintos fármacos, f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333 para cada tiempo de tratamiento.**

En el **hipocampo**, 1 día de tratamiento con 1  $\mu$ M de fluoxetina disminuye significativamente la expresión de *Ppar $\gamma$*  (30%;  $t=5,5$ ;  $p<0,01$ ;  $t$  de Student). 3 o 7 días de tratamiento no modifican de forma significativa la expresión de *Ppar $\gamma$*  (13%;  $t=0,7$  y 13%;  $t=4,4$ ; ns; respectivamente para 3 y 7 días de tratamiento,  $t$  de Student, ver Tabla 25).

En la **corteza**, el tratamiento con 1  $\mu$ M de fluoxetina no modifican de forma significativa la expresión de *Ppar $\gamma$*  para ninguno de los tiempos estudiados (-6%;  $t=0,4$ ; -12%;  $t=0,1$  y 18%;  $t=0,3$ ; ns; respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento,  $t$  de Student, ver Tabla 25).



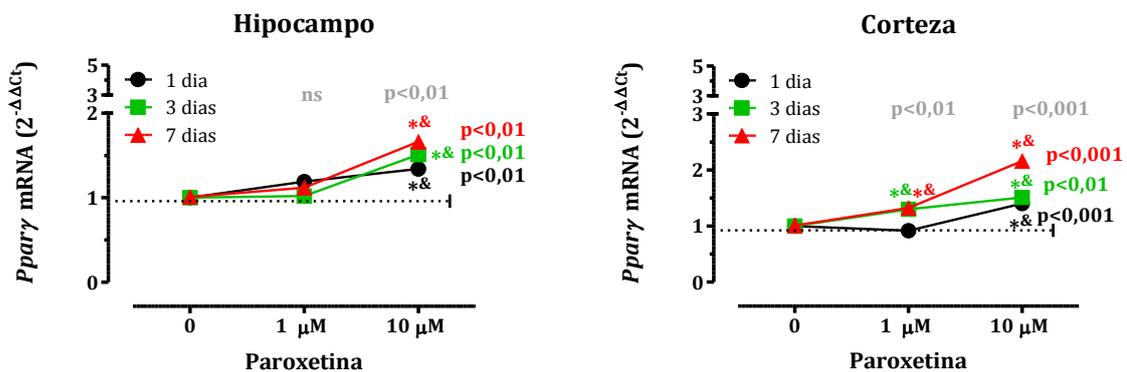
**Figura 62.-** Expresión de *Pparγ* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1  $\mu$ M de fluoxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *c-Myc* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ . \*, \* y \* *t* de Student para 1, 3 y 7 días de tratamiento para la dosis de 1  $\mu$ M en cada tiempo de tratamiento p < ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para 1  $\mu$ M. & & y & p < 0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

#### 2.7.2.2.2.- Paroxetina

El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 y 10  $\mu$ M de paroxetina, produce un incremento dosis y tiempos dependiente en la expresión de *Pparγ* en el hipocampo y en la corteza (ver Figura 63).

En el **hipocampo**, la administración de 10  $\mu$ M de paroxetina incrementa significativamente la expresión de *Pparγ* a todos los tiempos estudiados (34%, 51% y 66%,  $F=17,8$ ;  $F=21,8$  y  $F=17,2$  p < 0,01, respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para la dosis de 10  $\mu$ M ( $F=12,9$  p < 0,01; ANOVA vs tiempo, Tabla 25).

En la **corteza**, el incremento en la expresión de *Pparγ* fue mayor que en el hipocampo, y significativo para 1 y 10  $\mu$ M cuando el fármaco se administra de forma repetida. 1 día de tratamiento incrementa significativamente la expresión del gen sólo con 10  $\mu$ M (40%;  $F=31,5$  p < 0,001) con 3 y 7 días de tratamiento el incremento en la expresión de *Pparγ* fue significativo con ambas dosis del fármaco (30% y 51%;  $F=14,7$  p < 0,01 y 32% y 116%;  $F=49,5$  p < 0,001; respectivamente para 1 y 10  $\mu$ M de paroxetina a los 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para la dosis de 1 y 10  $\mu$ M ( $F=13,1$  p < 0,01 y  $F=27,7$  p < 0,001; respectivamente para 1 y 10  $\mu$ M; ANOVA vs tiempo, Tabla 25).

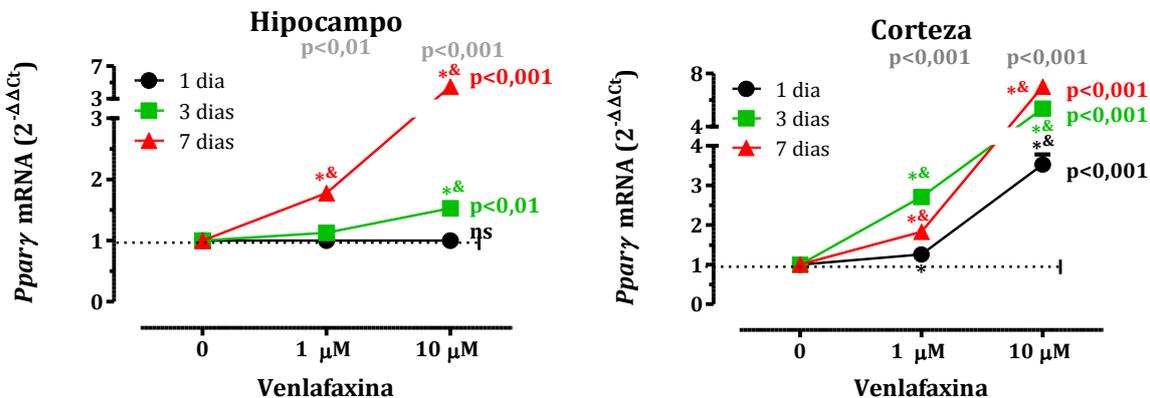


**Figura 63.-** Expresión de *Pparγ* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M de paroxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Cnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ . p < ; p < y p < ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10  $\mu$ M venlafaxina \*, \* y \* p < 0.05 p < 0.05 Dunnett post test entre las dosis de 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M vs el control en cada tiempo de tratamiento. p < ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis & & y & p < 0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

## 2.7.2.2.3.- Venlafaxina

El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 y 10  $\mu\text{M}$  de venlafaxina, produce un incremento en la expresión de *Ppar $\gamma$*  similar al descrito con paroxetina. El incremento en la expresión del gen fue dosis y tiempos dependiente en el hipocampo y en la corteza (ver Figura 64).

En el **hipocampo**, la administración aguda de venlafaxina no modifica la expresión de *Ppar $\gamma$*  ( $F=0,2$ ; ns; ANOVA vs dosis). Sin embargo la administración repetida de venlafaxina durante 3 o 7 días incrementa significativamente la expresión de *Ppar $\gamma$*  a todas las dosis estudiadas (13% y 53%;  $F=47,4$  y 78% y 348%;  $F=134,4$ ;  $p<0,001$ , respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$  de venlafaxina durante 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para la dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$  ( $F=7,9$   $p<0,01$  y  $F=900,6$   $p<0,001$ ; respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$  de venlafaxina, ANOVA vs tiempo, Tabla 25).



**Figura 64.-** Expresión de *Ppar $\gamma$*  en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de venlafaxina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Cnd1se* muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$ .  $p<$ ;  $p<$  y  $p<$  ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10  $\mu\text{M}$  venlafaxina \*, \* y \*  $p<0,05$   $p<0,05$  Dunnett post test entre las dosis de 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  vs el control en cada tiempo de tratamiento.  $p<$  ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y &  $p<0,05$  Student-Newman-Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

En la **corteza**, el incremento en la expresión de *Ppar $\gamma$*  fue mayor que en el hipocampo, y significativo incluso con 1 día de tratamiento (26% y 243%;  $F=88,8$   $p<0,001$ ; 171% y 436%;  $F=805,0$   $p<0,001$ ; y 83% y 603%;  $F=1206$   $p<0,001$ ; respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$  de venlafaxina a los 1, 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para la dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$  ( $F=77,8$   $p<0,001$  y  $F=581,3$   $p<0,001$ ; respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$  de venlafaxina, ANOVA vs tiempo, Tabla 25).

## 2.7.2.2.4.- RS 67333

El tratamiento repetido de las rodajas de cerebro con RS 67333, produce un descenso significativo de la expresión de *Ppar $\gamma$*  en el hipocampo y en la corteza (Figura 65, Tabla 25).

En el **hipocampo**, una dosis única de 1 o 10  $\mu\text{M}$  de RS 67333 no modifica los niveles de *Ppar $\gamma$*  ( $F=2,7$ ; ns; ANOVA vs dosis). Dosis repetidas producen un descenso significativo en el nivel de expresión del gen con tres (-17% y -31%;  $F=4,9$ ;  $p<0,05$ , respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$ , ANOVA vs dosis) y 7 días de tratamiento (-67% y -94%;  $F=37,9$ ;  $p<0,001$ , respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$ , ANOVA vs dosis). El efecto fue tiempo dependiente para las dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$  ( $F=17,1$ ;  $p<0,001$  y  $F=110,4$ ;  $p<0,001$ ; respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$ , ANOVA vs tiempo).

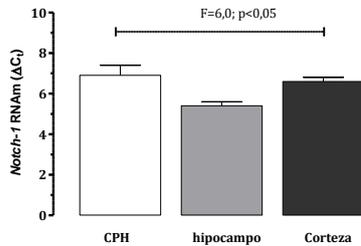
En la **corteza**, una dosis única de RS 67333 incrementa significativamente los niveles de *Ppar $\gamma$*  (24% y 38%; respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$ ,  $F=12,1$ ;  $p<0,01$ ; ANOVA vs dosis). Dosis repetidas producen un descenso significativo en el nivel de expresión del gen con tres (-28% y -541%;  $F=131,2$ ;  $p<0,001$ , respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$ , ANOVA vs dosis) y 7 días de tratamiento (-37% y -70%;  $F=204,4$ ;



## 2.8. Notch-1

### 2.8.1.- Expresión basal de Notch-1 en células progenitoras de hipocampo y en cerebro

**En condiciones basales**, en las CPH expresan niveles de *Notch-1* de  $\Delta C_t=6,9\pm 1,2$  con respecto al gen calibrador (GAPDH). En hipocampo la expresión basal de *Notch-1* fue mayor  $\Delta C_t=4,5\pm 0,6$  que en las CPH y similar a la corteza y  $\Delta C_t=6,6\pm 0,5$ . Estos datos muestran una expresión mayor de *Notch-1*, en hipocampo al observado en la corteza y los cultivos de CPH ( $F=6,0$ ;  $p<0,05$ ; ANOVA vs región, Figura 66).



**Figura 66.- Nivel de expresión basal de Notch-1** en cultivo de células progenitoras de hipocampo y en tejido de hipocampo y corteza de cultivos de rodajas de cerebro. CPH: cultivo de células progenitoras de hipocampo, F=ANOVA.

### 2.8.2.- Modulación de la expresión de Notch-1 por fármacos antidepresivos

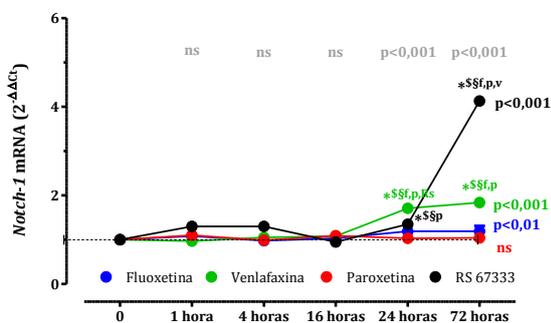
#### 2.8.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH)

La adición al medio de cultivo de  $1\mu\text{M}$  de fluoxetina o paroxetina no modifican de forma significativa el nivel de expresión de *Notch-1* ( $F=2,5$  y  $F=0,4$ ; ns; respectivamente para fluoxetina y paroxetina, ANOVA vs región, ver Figura 67 y Tabla 26)

Por el contrario  $1\mu\text{M}$  de RS 67333 y venlafaxina producen un incremento significativo en la expresión de *Notch-1* ( $F=14,8$ ;  $p<0,001$  y  $F=654,4$ ;  $p<0,001$ , respectivamente para venlafaxina y RS 67333, ANOVA vs dosis). El curso temporal del efecto de ambos fármacos sobre la expresión de *Notch-1* es similar, observándose un incremento en la expresión del gen a las 24 horas (71% y 35%;  $F=17,5$ ;  $p<0,001$ ; respectivamente para venlafaxina y RS 67333, ANOVA vs fármaco) y sobre todo a las 72 horas e (84% y 313%;  $F=799,8$ ;  $p<0,001$ ; respectivamente para venlafaxina y RS 67333, ANOVA vs fármaco). RS 67333 incrementa más la expresión de *Notch-1* que venlafaxina, tanto a las 24 como a las 72 horas, ver Figura 67 y Tabla 26).

#### Resumen de la expresión de Notch-1 en CPH

RS 67333 y venlafaxina incrementan la expresión de *Notch-1* en las CPH. El mayor incremento se observa tras 72 horas con RS 67333.



**Figura 67.- Curso temporal de la expresión de Notch-1** en células progenitoras de hipocampo en respuesta a  $1\mu\text{M}$  de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333. La expresión de *c-Jun* se muestra en valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .  $p<$ ;  $p<$ ;  $p<$  y  $p<$  ANOVA del efecto de cada fármaco vs el tiempo de tratamiento; \*, \*, \* y \*  $p<0,05$  Dunnett post test para cada fármaco vs el control.  $p<$  ANOVA del efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento; \$, \$ y \$  $p<0,05$  Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control para cada tiempo de tratamiento, \$, \$, \$ y \$  $p<0,05$  Student-Newman-Keuls post test entre los distintos fármacos, f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333 para cada tiempo de tratamiento.

**Tabla 26.- Curso temporal de la expresión de *Notch-1* en células progenitoras de hipocampo en respuesta 1 $\mu$ M de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina o RS 67333. La expresión de *c-jun* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$**

<b><i>Notch-1</i> células progenitoras de hipocampo</b>							F=	p<*
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas	72 horas			
Control	1,01 $\pm$ 0,14	1,01 $\pm$ 0,14	1,01 $\pm$ 0,15	1,01 $\pm$ 0,14	1,00 $\pm$ 0,04			
Fluoxetina	1,08 $\pm$ 0,05	0,98 $\pm$ 0,05	1,03 $\pm$ 0,08	1,19 $\pm$ 0,10	1,19 $\pm$ 0,12	2,5	ns	
Paroxetina	1,10 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,10	1,04 $\pm$ 0,02	0,4	ns	
Venlafaxina	0,97 $\pm$ 0,13	1,05 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,02	1,71 $\pm$ 0,17* $\$, \$f, p, Rs$	1,84 $\pm$ 0,10* $\$, \$f, p$	14,8	0,001	
RS 67333	0,93 $\pm$ 0,05	1,15 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,04	1,35 $\pm$ 0,08* $\$, \$p$	4,13 $\pm$ 0,12* $\$, \$f, p, v$	654,4	0,001	
F <sup>2</sup> ; p< <sup>5,5</sup>	1,8	ns	2,7	ns	2,8	ns	17,5	0,001
							799,8	0,001

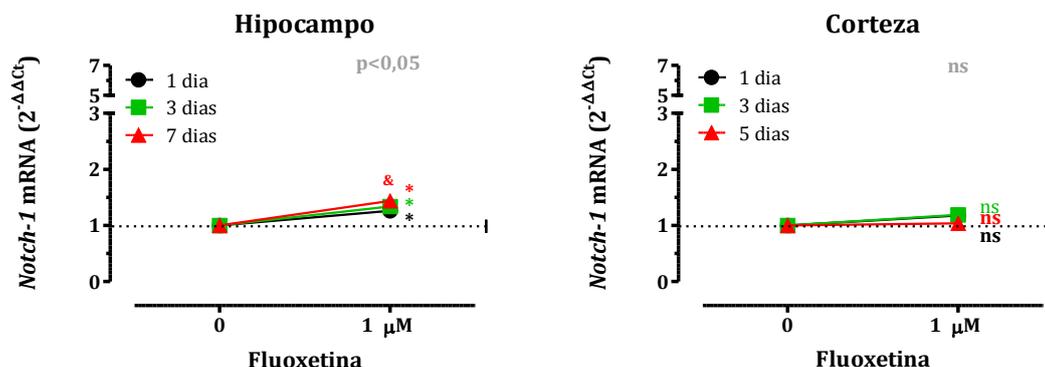
F=análisis de la varianza del efecto de cada fármaco a lo largo del tratamiento, & p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. F<sup>2</sup>: análisis de la varianza entre el efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento. \$ p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control en cada tiempo de tratamiento. §Student-Newman-Keuls post test entre los distintos fármacos (f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333) en cada tiempo de tratamiento.

## 2.8.2.2.- Cerebro

### 2.8.2.2.1.- Fluoxetina

El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1  $\mu$ M de fluoxetina incrementa de forma significativa, la expresión de *Notch-1* en hipocampo pero no en la corteza (Figura 69).

En el **hipocampo**, 1  $\mu$ M de fluoxetina incrementa de forma tiempo dependiente (F=9,3; p<0,01; ANOVA vs tiempo) la expresión de *Notch-1*. El incremento fue significativo para 1 (26%; t=2,7; p<0,05; t de



**Figura 68.- Expresión de *Notch-1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1 $\mu$ M de fluoxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Notch-1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . \*, \* y \* t de Student para 1, 3 y 7 días de tratamiento para la dosis de 1 $\mu$ M en cada tiempo de tratamiento p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para 1 $\mu$ M. &, & y & p<0.05 Student-Newman-Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.**

Student),

3 (34%; t=4,8; p<0,01; t de Student), y 7 días de exposición al fármaco (44%; t=7,1; p<0,01; t de Student, ver

**Tabla 27.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Notch-1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

En la **corteza**, el tratamiento con 1 µM de fluoxetina no modifican de forma significativa la expresión de *Notch-1* para ninguno de los tiempos estudiados (18%;  $t=1,5$ ; 19%;  $t=1,6$  y 4%;  $t=0,7$ ; ns; respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento,  $t$  de Student, ver

**Tabla 27.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Notch-1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

).

#### 2.8.2.2.2.- Paroxetina

Al igual que con fluoxetina, el tratamiento con de las rodajas de cerebro con 1 y 10 µM de paroxetina, produce un incremento dosis y tiempos dependiente en la expresión de *Notch-1* en el hipocampo pero no en la corteza (ver Figura 69).

En el hipocampo, la administración de paroxetina produce un incremento dosis dependiente y significativo tanto con una dosis única (24% y 61%;  $F=63,4$ ;  $p<0,001$  respectivamente para 1 y 10 µM, ANOVA vs dosis) como tras dosis múltiples (26% y 81%;  $F=63,4$ ; y 52% y 142,0%;  $p<0,001$  respectivamente para 1 y 10 µM tras 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para las dos dosis estudiadas ( $F=30,3$  y  $F=23,2$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA vs tiempo,

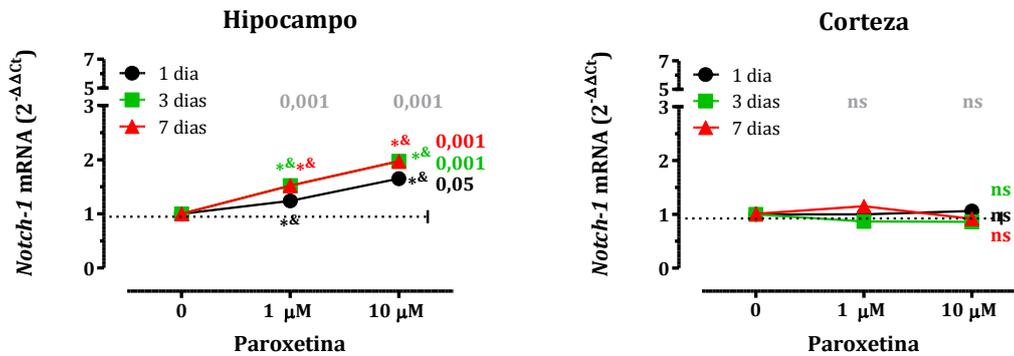
**Tabla 27.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Notch-1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

).

En la **corteza**, el tratamiento con 1 o 10 µM de paroxetina no modifican de forma significativa la expresión de *Notch-1* para ninguno de los tiempos estudiados (F=0,5; F=2,4 y F=3,4; ns; respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis, ver

**Tabla 27.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Notch-1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$**

).



**Figura 69.- Expresión de *Notch-1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de paroxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Notch-1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . p<; p< y p< ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \* p<0.05 p<0.05 Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento. p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y & p<0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.**

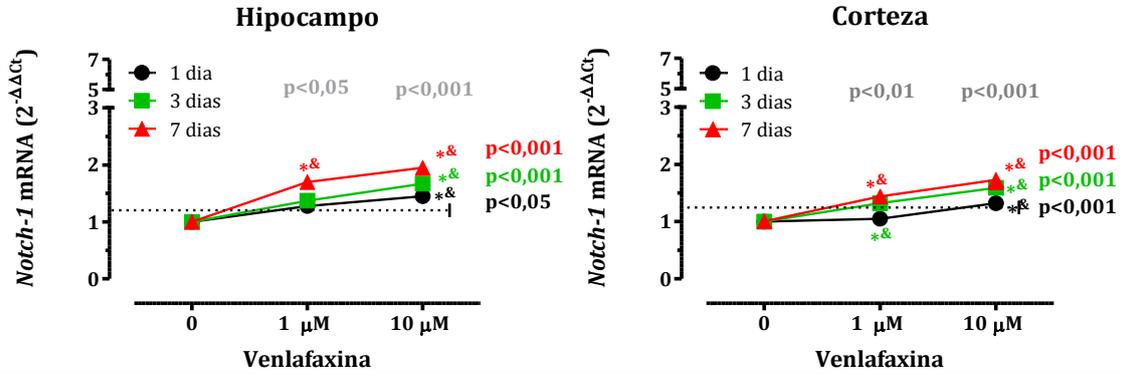
#### 2.8.2.2.3.- Venlafaxina

El tratamiento con venlafaxina modifica de forma significativa la expresión de *Notch-1* tanto en hipocampo como en corteza (Figura 70).

En el hipocampo, la administración de venlafaxina produce un incremento dosis dependiente y significativo tanto con una dosis única (28% y 45%; F=5,4; p<0,05 respectivamente para 1 y 10 µM, ANOVA vs dosis) como tras dosis múltiples (37% y 67%; F=253,8; y 70% y 95,0%; F=34,7; p<0,001 respectivamente para 1 y 10 µM tras 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para las dos dosis estudiadas (F=6,5; p<0,05 y F=124,3; p<0,001; ANOVA vs tiempo,

**Tabla 27.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Notch-1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$**

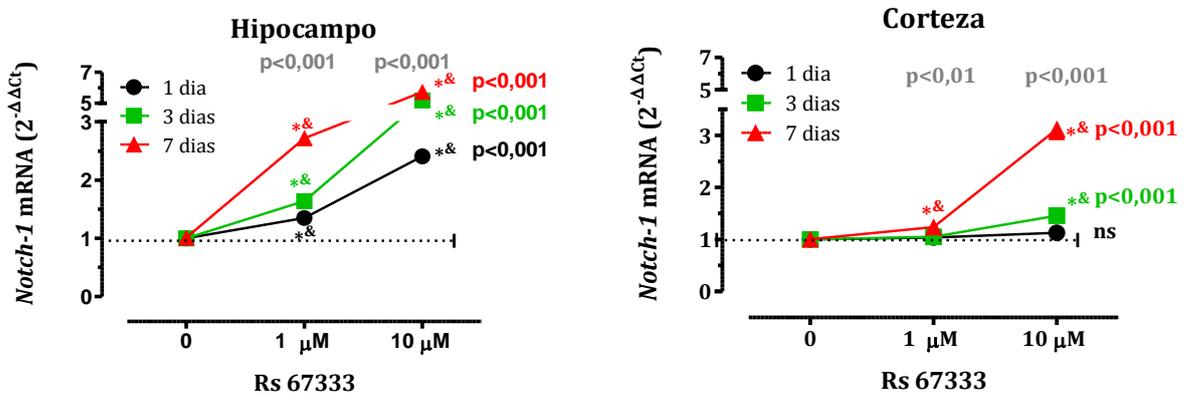
).



**Figura 70.- Expresión de *Notch-1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de venlafaxina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Notch-1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . p<; p< y p< ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \* p<0.05 p<0.05 Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento. p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis & & y & p<0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.**

## 2.8.2.2.4.- RS 67333

El tratamiento con RS 67333 modifica de forma significativa la expresión de Notch-1 tanto en hipocampo como en corteza (Figura 71).



**Figura 71.-** Expresión de *Notch-1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1 μM y 10 μM de RS 67333 tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Notch-1* se muestra en valores de 2<sup>-ΔΔCt</sup>. p<; p< y p< ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 μM venlafaxina \*, \* y \* p<0.05 p<0.05 Dunnett post test entre las dosis de 1 μM y 10 μM vs el control en cada tiempo de tratamiento. p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y & p<0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

En el **hipocampo**, la administración de RS 67333 produce un incremento dosis dependiente y significativo tanto con una dosis única (35% y 141%; F=37,9; p<0,001 respectivamente para 1 y 10 μM, ANOVA vs dosis) como tras dosis múltiples (64% y 418%; F=388,6; y 172% y 473%; F=775,6; p<0,001 respectivamente para 1 y 10 μM tras 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para las dos dosis estudiadas (F=125,8 y F=449,5; p<0,001; ANOVA vs tiempo,

**Tabla 27.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Notch-1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

).

En la **corteza**, el tratamiento con 1 o 10 µM de venlafaxina también produce un incremento dosis dependiente y significativo solo como dosis múltiples (0,5% y 46%; F=65,4; y 24% y 212%; F=102,7; p<0,001 respectivamente para 1 y 10 µM tras 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para las dos dosis estudiadas (F=8,8; p<0,01 y F=95,8; p<0,001; ANOVA vs tiempo,

**Tabla 27.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Notch-1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1 $\mu$ M de fluoxetina y 1 $\mu$ M y 10  $\mu$ M de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta C_t}$

).

#### Resumen de la expresión de *Notch-1*

En el hipocampo, el RS 67333 es el fármaco que más incrementa la expresión de *Notch-1*, En la corteza, la venlafaxina incrementan más la expresión de *Notch-1* a dosis bajas y tratamiento subagudo

## 2.9. Vegf

### 2.9.1.- Expresión basal de *Vegf* en células progenitoras de hipocampo y en cerebro

**En condiciones basales**, en las CPH expresan niveles de *Vegf* de  $\Delta C_t=11,1\pm 0,9$  con respecto al gen calibrador (GAPDH). En hipocampo la expresión basal de *Vegf* fue similar  $\Delta C_t=10,0\pm 1,1$  que en las CPH y a la corteza y  $\Delta C_t=10,6\pm 0,8$ . Estos datos muestran una expresión similar de *Notch-1*, en hipocampo al observado en la corteza y los cultivos de CPH (F=2,0; ns; ANOVA vs región, **Figura 72**).

**Tabla 27.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Notch-1* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de 2<sup>ΔΔCt</sup>**

Notch-1 hipocampo					Notch-1 hipocampo						
1 día					3 días						
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*		0	1 µM	10 µM	F=	p<*
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,09	1,26 ± 0,14*		2,7	0,05	Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,03	1,34 ± 0,12* <sup>5</sup>		4,8	0,01
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,09	1,24 ± 0,05*	1,65 ± 0,25* <sup>5&amp;</sup>	13,3	0,01	Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,03	1,26 ± 0,03* <sup>5&amp;</sup>	1,81 ± 0,15* <sup>5&amp;</sup>	63,4	0,001
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,09	1,28 ± 0,31	1,45 ± 0,03* <sup>5&amp;</sup>	5,4	0,05	Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,03	1,37 ± 0,03* <sup>5</sup>	1,67 ± 0,05* <sup>5&amp;</sup>	235,8	0,001
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,09	1,35 ± 0,06* <sup>5&amp;</sup>	2,41 ± 0,04* <sup>5&amp;p,v&amp;</sup>	37,9	0,001	RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,03	1,64 ± 0,03* <sup>5&amp;p,v&amp;</sup>	5,18 ± 0,34* <sup>5&amp;p,v&amp;</sup>	388,6	0,001
F''=; p< <sup>5,8</sup>	0	ns	2,1	ns	56,8	0,001	F''=; p< <sup>5,8</sup>	2,9	ns	44,7	0,001

Notch-1 hipocampo					Notch-1 hipocampo					
7 días					1 µM					
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*	F'	p< <sup>8</sup>	F'	p< <sup>8</sup>	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,09	1,44 ± 0,06* <sup>5&amp;</sup>		7,1	0,01	Fluoxetina	9,3	0,01		
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,09	1,52 ± 0,08* <sup>5&amp;</sup>	1,97 ± 0,02* <sup>5&amp;</sup>	142,0	0,001	Paroxetina	30,3	0,001	23,2	0,001
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,09	1,70 ± 0,22* <sup>5&amp;</sup>	1,95 ± 0,08* <sup>5&amp;</sup>	34,7	0,001	Venlafaxina	6,5	0,05	124,3	0,001
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,09	2,72 ± 0,20* <sup>5&amp;p,v&amp;</sup>	5,73 ± 0,10* <sup>5&amp;p,v&amp;</sup>	775,6	0,001	RS 67333	125,8	0,001	449,5	0,001
F''=; p< <sup>5,8</sup>	0,2	ns	57,3	0,001	2114	0,001				

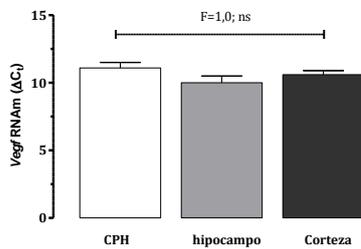
  

Notch-1 corteza					Notch-1 corteza						
1 día					3 días						
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*		0	1 µM	10 µM	F=	p<*
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,01 ± 0,06	1,18 ± 0,20		1,5	ns	Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,03	1,19 ± 0,20		1,6	ns
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,06	1,06 ± 0,13	0,5	ns	Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,03	0,87 ± 0,13	0,86 ± 0,05	2,4	ns
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,06	1,05 ± 0,03	1,32 ± 0,07* <sup>5&amp;p,rs&amp;</sup>	28,4	0,001	Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,03	1,32 ± 0,02* <sup>5&amp;p,rs&amp;</sup>	1,59 ± 0,11* <sup>5&amp;p,rs&amp;</sup>	48,8	0,001
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,06	1,04 ± 0,10	1,13 ± 0,03	2,8	ns	RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,03	1,05 ± 0,02	1,46 ± 0,02* <sup>5&amp;p,rs&amp;</sup>	65,4	0,001
F''=; p< <sup>5,8</sup>	0,07	ns	2,1	ns	8,8	0,01	F''=; p< <sup>5,8</sup>	0,01	ns	7,4	0,01

Notch-1 corteza					Notch-1 corteza					
7 días					1 µM					
	0	1 µM	10 µM	F=	p<*	F'	p< <sup>8</sup>	F'	p< <sup>8</sup>	
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,02	1,04 ± 0,10		0,7	ns	Fluoxetina	2,2	ns		
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,02	1,15 ± 0,12	0,92 ± 0,11	3,4	ns	Paroxetina	3,9	ns	2,6	ns
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,00 ± 0,02	1,44 ± 0,07* <sup>5&amp;p,rs&amp;</sup>	1,73 ± 0,08* <sup>5&amp;p,rs&amp;</sup>	99,7	0,001	Venlafaxina	15,1	0,01	46,1	0,001
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,02	1,24 ± 0,04* <sup>5&amp;p,v&amp;</sup>	3,12 ± 0,34* <sup>5&amp;p,v&amp;</sup>	102,7	0,001	RS 67333	8,8	0,01	95,8	0,001
F''=; p< <sup>5,8</sup>	0,01	ns	14,9	0,001	91,9	0,001				

F=análisis de la varianza para cada fármaco respecto a la dosis. \*<0.05 Student–Newman–Keuls post test para las distintas dosis en cada fármaco. F': análisis de la varianza para cada fármaco y dosis respecto al tiempo de tratamiento, &p<0.05 Student–Newman–Keuls post test para los distintos tiempos. F'': análisis de la varianza para cada dosis y tiempo respecto al fármaco, &p<0.05 Student–Newman–Keuls post test para los distintos fármacos.



**Figura 72.- Nivel de expresión basal de *Vegf* en cultivo de células progenitoras de hipocampo y en tejido de hipocampo y corteza de cultivos de rodajas de cerebro. CPH: cultivo de células progenitoras de hipocampo, F=ANOVA.**

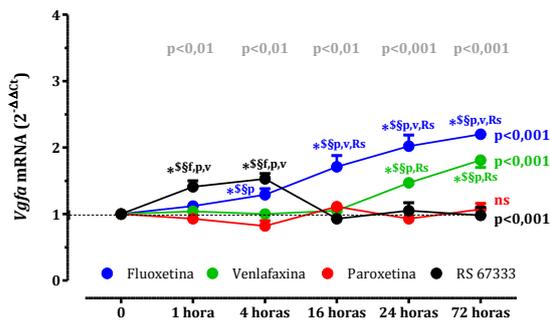
## 2.9.2.- Modulación de la expresión de *Vegf* por fármacos antidepresivos

### 2.9.2.1.- Células progenitoras de hipocampo (CPH)

La adición al medio de cultivo de 1µM de paroxetina genera disminución significativa en el nivel de expresión de *Vegf* (F=39.7 p<0.001) en el tratamiento de 1 hora, a partir de allí se incrementó progresivamente el nivel de expresión del gen hasta llegar a un aumento significativo a las 16 horas (F=42.0 p<0.001), luego disminuye hasta valores basales (Figura 73, Tabla 28).

La adición de fluoxetina 1µM al medio de cultivo ocasiona incremento observable a lo largo del curso temporal significativo a partir de las 4 horas de tratamiento (F=73.6 p<0.001). Con 1 µM de RS 67333 y venlafaxina se produce un incremento significativo en la expresión de *Vegf* (F=19.6 p<0.001, F=47.7 p<0.001, respectivamente para RS 67333 y venlafaxina). El curso temporal del incremento de la expresión de *Vegf* es diferente entre estos dos fármacos. RS 67333 muestra un incremento inicial en la expresión del gen a 1 hora de tratamiento, con una progresiva disminución en el nivel de expresión a lo largo del tratamiento, hasta llegar a valores basales los 3 días. Por otra parte venlafaxina, produce un incremento en la expresión de *Vegf*, con un primer aumento significativo a 1 día de tratamiento, que se acentúa a los 3 días de exposición al fármaco (Figura 73, Tabla 28).

El mayor incremento en la expresión de *Vegf* se observa, para todas las condiciones estudiadas, a 3 días de tratamiento con fluoxetina (Figura 73, Tabla 28).



**Figura 73.-** Curso temporal de la expresión de *Vegf* en células progenitoras de hipocampo en respuesta a 1μM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333. La expresión de *c-Jun* se muestra en valores de 2<sup>-ΔΔCt</sup>. p<; p<; p< y p< ANOVA del efecto de cada fármaco vs el tiempo de tratamiento; \*, \* y \* p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. p<ANOVA del efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento; \$, \$ y \$ p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control para cada tiempo de tratamiento, \$, \$, \$ y \$ p<0.05 Student-Newman-Keuls post test entre los distintos fármacos, f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333 para cada tiempo de tratamiento.

**Tabla 28.-** Curso temporal de la expresión de *Vegf* en células progenitoras de hipocampo en respuesta 1μM de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina o RS 67333. La expresión de *c-Jun* se muestra en valores de 2<sup>-ΔΔCt</sup>

Vegf células progenitoras de hipocampo										F=	p<*	
	1 hora		4 horas		16 horas		24 horas		72 horas			
Control	1,00	± 0,07	1,00	± 0,08	1,00	± 0,05	1,00	± 0,05	1,01	± 0,13		
Fluoxetina	1,12	± 0,10	1,29	± 0,18 <sup>\$p</sup>	1,71	± 0,34 <sup>*\$p,v,Rs</sup>	2,02	± 0,34 <sup>*\$p,v,Rs</sup>	2,20	± 0,08 <sup>*\$p,v,Rs</sup>	14,6	0,001
Paroxetina	0,93	± 0,05	0,82	± 0,17	1,11	± 0,06	0,93	± 0,04	1,07	± 0,18	2,0	ns
Venlafaxina	1,04	± 0,13	1,00	± 0,05	1,05	± 0,13	1,47	± 0,14 <sup>*\$p,Rs</sup>	1,81	± 0,21 <sup>*\$p,Rs</sup>	29,9	0,001
RS 67333	1,41	± 0,19 <sup>*\$f,p,v</sup>	1,53	± 0,16 <sup>*\$f,p,v</sup>	0,93	± 0,08	1,05	± 0,24	0,93	± 0,24	19,6	0,001
F' =; p< <sup>\$</sup>	7,4	0,01	12,5	0,01	10,1	0,01	15,7	0,001	33,5	0,001		

F=análisis de la varianza del efecto de cada fármaco a lo largo del tratamiento, & p<0.05 Dunnett post test para cada fármaco vs el control. F': análisis de la varianza entre el efecto de los distintos fármacos en cada tiempo de tratamiento. \$ p<0.05 Dunnett post test entre los distintos fármacos vs el control en cada tiempo de tratamiento. \$Student-Newman-Keuls post test entre los distintos fármacos (f=fluoxetina, p=paroxetina, v=venlafaxina y Rs=RS 67333) en cada tiempo de tratamiento.

**Resumen de la expresión de *Vegf* en CPH**

Venlafaxina y paroxetina incrementan la expresión de *Vegf* en las CPH. El mayor incremento se observa tras 1 hora con venlafaxina, Tabla 28.

**2.9.2.2.- Cerebro**

**2.9.2.2.1.- Fluoxetina**

El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 μM de fluoxetina no modifica la expresión de *Vegf* ni en el hipocampo ni en la corteza (Figura 74,

**Tabla 29.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Vegf* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

---

).

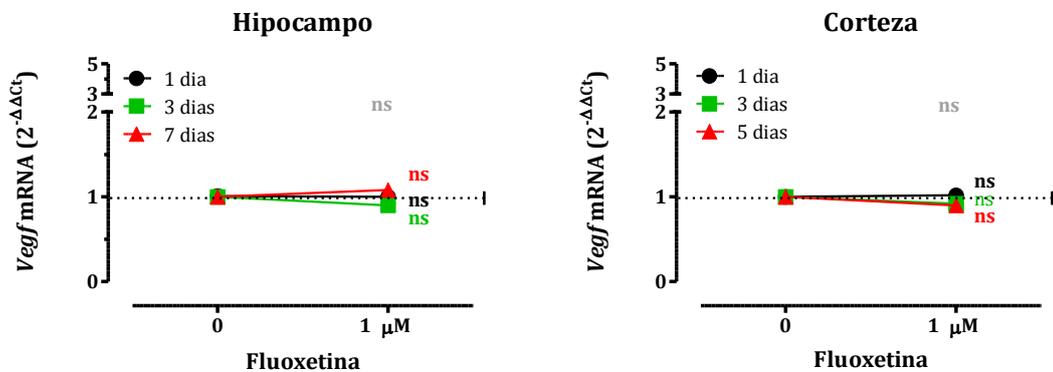
#### 2.9.2.2.2.- Paroxetina

El tratamiento con de las rodajas de cerebro con 1 y 10 µM de paroxetina, produce un incremento dosis y tiempos dependiente en la expresión de *Vegf* en el hipocampo pero no en la corteza (ver Figura 75).

En el hipocampo, la administración de paroxetina produce un incremento dosis dependiente y significativo tanto con una dosis única (24% y 61%;  $F=63,4$ ;  $p<0,001$  respectivamente para 1 y 10 µM, ANOVA vs dosis) como tras dosis múltiples (26% y 81%;  $F=63,4$ ; y 52% y 142,0%;  $p<0,001$  respectivamente para 1 y 10 µM tras 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para las dos dosis estudiadas ( $F=30,3$  y  $F=23,2$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA vs tiempo,

**Tabla 29.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Vegf* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1 $\mu$ M de fluoxetina y 1 $\mu$ M y 10  $\mu$ M de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Cnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$**

).

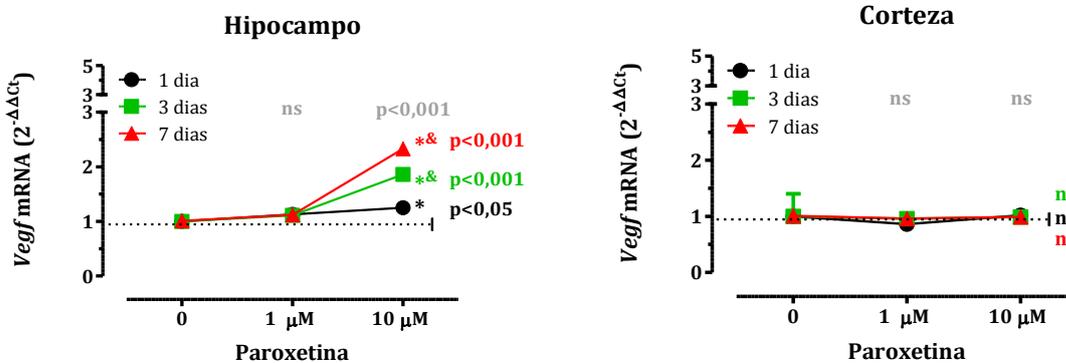


**Figura 74.- Expresión de *Vegf* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1 $\mu$ M de fluoxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Vegf* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . \*, \* y \* *t* de Student para 1, 3 y 7 días de tratamiento para la dosis de 1 $\mu$ M en cada tiempo de tratamiento  $p < ANOVA$  entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para 1 $\mu$ M. & & &  $p < 0.05$  Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.**

En la **corteza**, el tratamiento con 1 o 10  $\mu$ M de paroxetina no modifican de forma significativa la expresión de *Notch-1* para ninguno de los tiempos estudiados ( $F=0,5$ ;  $F=2,4$  y  $F=3,4$ ; ns; respectivamente para 1, 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis, ver

**Tabla 29.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Vegf* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1 $\mu$ M de fluoxetina y 1 $\mu$ M y 10  $\mu$ M de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$**

).



**Figura 75.- Expresión de *Vegf* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M de paroxetina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Vegf* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . p<; p< y p< ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10  $\mu$ M venlafaxina \*, \* y \* p<0.05 p<0.05 Dunnett post test entre las dosis de 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M vs el control en cada tiempo de tratamiento. p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis & & y & p<0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.**

#### 2.9.2.2.3.- Venlafaxina

El tratamiento de las rodajas de cerebro con venlafaxina modifica de forma significativa la expresión de *Vegf* tanto en hipocampo como en corteza (Figura 76).

En el **hipocampo**, la administración de venlafaxina produce un incremento dosis dependiente y significativo tanto con una dosis única (47% y 57%; F=59,8; p<0,001 respectivamente para 1 y 10  $\mu$ M, ANOVA vs dosis) como tras dosis múltiples (55% y 169%; F=8013; y 148% y 285,0%; F=62,2; p<0,001 respectivamente para 1 y 10  $\mu$ M tras 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para las dos dosis estudiadas (F=9,4; p<0,01 y F=43,1; p<0,001; ANOVA vs tiempo,

**Tabla 29.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Vegf* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1  $\mu$ M de fluoxetina y 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

---

).

**Tabla 29.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Vegf* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$**

<b>Vegf hipocampo 1 día</b>					F=		p<*	
	0	1 µM	10 µM					
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,02 ± 0,02	1,01 ± 0,05		0	ns			
Paroxetina <sup>p</sup>	1,02 ± 0,02	1,13 ± 0,02	1,25 ± 0,11*	9,2	0,05			
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,02 ± 0,02	1,47 ± 0,03 <sup>*5f,p,Rs</sup>	1,57 ± 0,12 <sup>*5p,Rs</sup>	59,8	0,001			
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,02 ± 0,02	1,13 ± 0,04*	1,25 ± 0,03*	41,3	0,001			
F''=; p< <sup>5,8</sup>	0,10	ns	39,6	0,001	21,8	0,001		

<b>Vegf hipocampo 3 días</b>					F=		p<*	
	0	1 µM	10 µM					
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,01 ± 0,04	0,90 ± 0,05		3,4	ns			
Paroxetina <sup>p</sup>	1,01 ± 0,04	1,11 ± 0,06	1,86 ± 0,18 <sup>*5&amp;</sup>	51,9	0,001			
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,01 ± 0,04	1,55 ± 0,11 <sup>*5f,p,Rs&amp;</sup>	2,69 ± 0,26 <sup>*5p&amp;</sup>	8016	0,001			
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,01 ± 0,04	1,27 ± 0,11 <sup>5f&amp;</sup>	4,03 ± 0,34 <sup>*5f&amp;v&amp;</sup>	194,9	0,001			
F''=; p< <sup>5,8</sup>	1,1	ns	25,1	0,001	88,7	0,001		

<b>Vegf hipocampo 7 días</b>					F=		p<*	
	0	1 µM	10 µM					
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,02 ± 0,09	1,08 ± 0,15		0,2	ns			
Paroxetina <sup>p</sup>	1,02 ± 0,09	1,12 ± 0,16	2,33 ± 0,19 <sup>*5&amp;</sup>	76,2	0,001			
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,02 ± 0,09	2,48 ± 0,54 <sup>*5f,p,Rs&amp;</sup>	3,85 ± 0,01 <sup>*5p,Rs&amp;</sup>	62,2	0,001			
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,02 ± 0,09	1,64 ± 0,23 <sup>*5f,p&amp;</sup>	4,63 ± 0,75 <sup>*5p&amp;</sup>	65,1	0,001			
F''=; p< <sup>5,8</sup>	0,02	ns	14,3	0,001	170,9	0,001		

<b>Vegf corteza 1 día</b>					F=		p<*	
	0	1 µM	10 µM					
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,02 ± 0,16	1,02 ± 0,14		1,0	ns			
Paroxetina <sup>p</sup>	1,02 ± 0,16	0,86 ± 0,06	1,02 ± 0,02	2,4	ns			
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,02 ± 0,16	1,30 ± 0,01 <sup>*5f,p</sup>	2,57 ± 0,23 <sup>*5p</sup>	78,3	0,001			
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,02 ± 0,16	1,58 ± 0,07 <sup>*5f,p,v</sup>	2,03 ± 0,29 <sup>*5p,v&amp;</sup>	20,6	0,01			
F''=; p< <sup>5,8</sup>	0,1	ns	22,9	0,001	44,1	0,001		

<b>Vegf corteza 3 días</b>					F=		p<*	
	0	1 µM	10 µM					
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,08	0,92 ± 0,05		0,1	ns			
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,08	0,96 ± 0,06	0,99 ± 0,07	0,5	ns			
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,01 ± 0,08	1,46 ± 0,09 <sup>*5f,p</sup>	3,01 ± 0,70 <sup>*5p</sup>	19,6	0,01			
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,08	1,80 ± 0,03 <sup>*5f,p,v&amp;</sup>	2,67 ± 0,27 <sup>*5p&amp;</sup>	77,7	0,001			
F''=; p< <sup>5,8</sup>	0,1	ns	103,8	0,001	23,2	0,001		

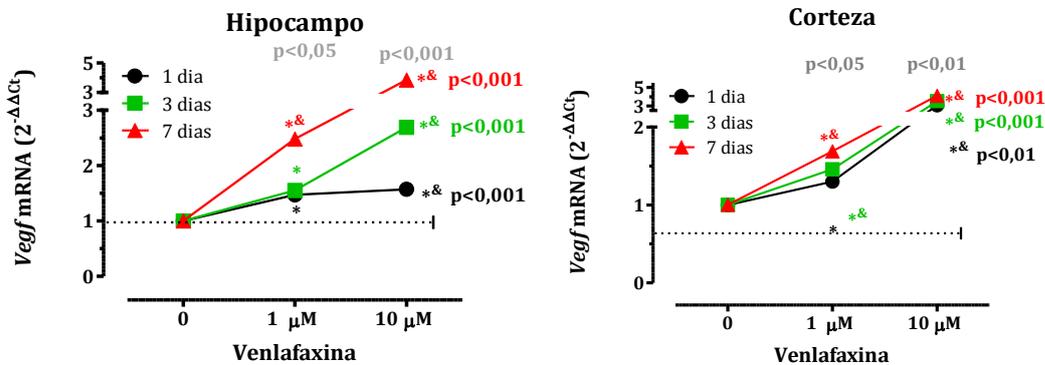
  

<b>Vegf corteza 7 días</b>					F=		p<*	
	0	1 µM	10 µM					
Fluoxetina <sup>f</sup>	1,00 ± 0,08	0,90 ± 0,14		0,3	ns			
Paroxetina <sup>p</sup>	1,00 ± 0,08	0,96 ± 0,06	0,99 ± 0,07	0,5	ns			
Venlafaxina <sup>v</sup>	1,01 ± 0,08	1,69 ± 0,19 <sup>*5f,p&amp;</sup>	3,60 ± 0,38 <sup>*5p&amp;</sup>	86,8	0,001			
RS 67333 <sup>rs</sup>	1,00 ± 0,08	2,56 ± 0,19 <sup>*5f,p,v&amp;</sup>	5,42 ± 0,22 <sup>*5p,v&amp;</sup>	495,5	0,001			
F''=; p< <sup>5,8</sup>	0,1	ns	75,2	0,001	250,3	0,001		

<b>Vegf hipocampo 1 µM 10 µM</b>				F'		p< <sup>5,8</sup>	
	1 µM	10 µM					
Fluoxetina	3,3	ns					
Paroxetina	0,5	ns	32,7	0,001			
Venlafaxina	9,3	0,05	40,4	0,001			
RS 67333	9,4	0,01	43,1	0,001			

F=análisis de la varianza para cada fármaco respecto a la dosis. \*<0.05 Student–Newman–Keuls post test para las distintas dosis en cada fármaco. F': análisis de la varianza para cada fármaco y dosis respecto al tiempo de tratamiento, &p<0.05 Student–Newman–Keuls post test para los distintos tiempos. F'': análisis de la varianza para cada dosis y tiempo respecto al fármaco, &p<0.05 Student–Newman–Keuls post test para los distintos fármacos.



**Figura 76.- Expresión de *Ccnd1* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de venlafaxina tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . p<; p< y p< ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \* p<0.05 p<0.05 Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento. p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis &, & y & p<0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.**

En la **corteza**, el tratamiento con 1 o 10 µM de venlafaxina también produce un incremento dosis dependiente y significativo tanto con una dosis única (30% y 157%; F=78,3; p<0,001 respectivamente para 1 y 10 µM, ANOVA vs dosis) como tras dosis múltiples (46% y 201%; F=19,6; y 69% y 260%; F=86,6; p<0,001 respectivamente para 1 y 10 µM tras 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para las dos dosis estudiadas (F=7,3; y F=8,6; p<0,01; ANOVA vs tiempo,

**Tabla 29.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Vegf* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1  $\mu$ M de fluoxetina y 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

---

).

## 2.9.2.2.4.- RS 67333

El tratamiento de las rodajas de cerebro con RS 67333 modifica de forma significativa la expresión de *Vegf* tanto en hipocampo como en corteza (Figura 77).

En el **hipocampo**, la administración de una dosis única venlafaxina no produce cambios significativos en la expresión de *Vegf* (4% y 13%;  $F=2,8$ ; ns respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$ , ANOVA vs dosis). Por el contrario, dosis repetidas producen un incremento dosis y tiempo dependiente en la expresión de *Vegf* (5% y 46%;  $F=65,4$ ; y 24% y 212%;  $F=102,7$ ;  $p<0,001$  respectivamente para 1 y 10  $\mu\text{M}$  tras 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para las dos dosis estudiadas ( $F=8,8$ ;  $p<0,01$  y  $F=95,8$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA vs tiempo,

**Tabla 29.- Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Vegf* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro** de rata en respuesta a 1  $\mu$ M de fluoxetina y 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

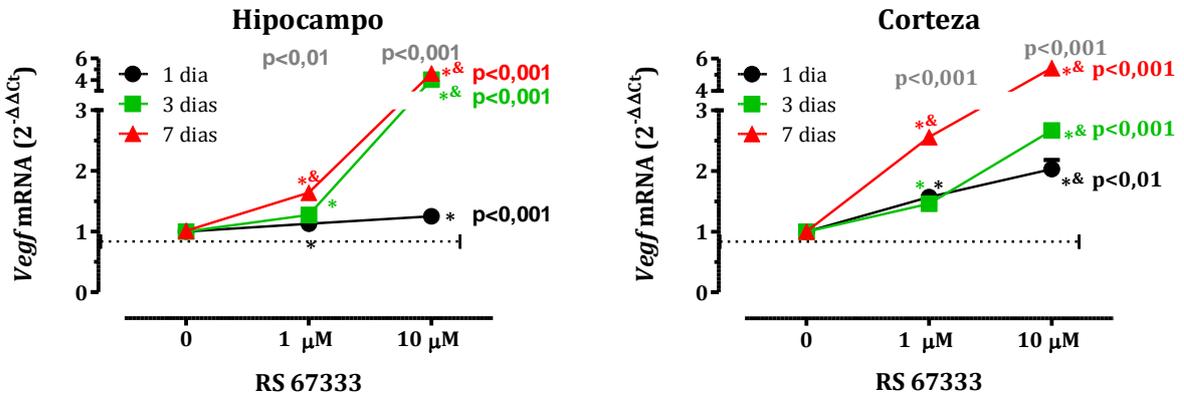
---

).

En la **corteza**, el tratamiento con 1 o 10  $\mu$ M de venlafaxina también produce un incremento dosis dependiente y significativo tanto con una dosis única (13% y 25%;  $F=41,3$ ;  $p<0,001$  respectivamente para 1 y 10  $\mu$ M, ANOVA vs dosis) como tras dosis múltiples (27% y 303%;  $F=194,9$ ; y 64% y 363%;  $F=65,1$ ;  $p<0,001$  respectivamente para 1 y 10  $\mu$ M tras 3 y 7 días de tratamiento, ANOVA vs dosis). El incremento fue tiempo dependiente para las dos dosis estudiadas ( $F=9,4$ ;  $p<0,01$  y  $F=43,1$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA vs tiempo,

**Tabla 29.-** Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Vegf* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

).



**Figura 77.-** Expresión de *Vegf* en el hipocampo (derecha) y la corteza (izquierda) en de cultivos de rodajas de cerebro en respuesta a 1µM y 10µM de RS 67333 tras 1 (negro), 3 (verde) y 7 días (rojo) de tratamiento. La expresión de *Vegf* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . p< ANOVA para 1, 3 y 7 días de tratamiento con 1 y 10 µM venlafaxina \*, \* y \* p<0.05 p<0.05 Dunnett post test entre las dosis de 1µM y 10µM vs el control en cada tiempo de tratamiento. p< ANOVA entre 1, 3 y 7 días de tratamiento para cada dosis & & y & p<0.05 Student–Newman–Keuls post-hoc entre los tiempos de tratamiento.

#### Resumen de la expresión de *Vegf*

En tejido RS 67333 es el fármaco que más incrementa *Vegf* en el hipocampo. En la corteza, dosis bajas y tratamiento agudo, la venlafaxina incrementa más la expresión de *Vegf* que el RS 67333,

**Tabla 29.-** Curso temporal y dosis-efecto sobre la expresión de *Vegf* en cultivos de rodaja de hipocampo y de corteza de cerebro de rata en respuesta a 1µM de fluoxetina y 1µM y 10 µM de paroxetina, venlafaxina o RS 67333 durante 1, 3 y 7 días. La expresión de *Ccnd1* se muestra en valores de  $2^{\Delta\Delta Ct}$

**Tabla 30.- Resumen del efecto del tratamiento con fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y Rs7633 en cultivos de células progenitoras de hipocampo sobre la expresión de *Axin-1*, *Axin-2*, *Ctnnb1*, *c-Myc*, *c-Jun*, *Ccnd1*, *Pparγ*, *Notch-1* y *Vgfa***

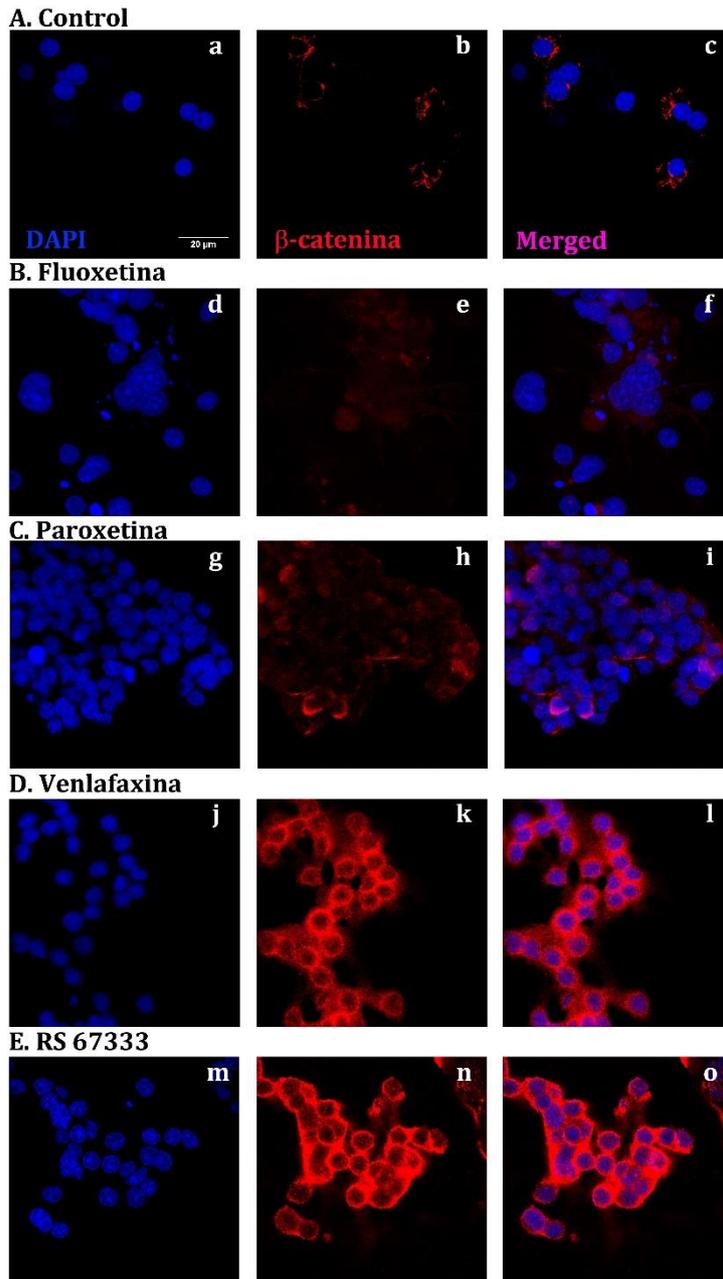
		<i>Axin-1</i>	<i>Axin-2</i>	<i>Ctnnb1</i>	<i>c-Myc</i>	<i>c-Jun</i>	<i>Ccnd1</i>	<i>Pparγ</i>	<i>Notch-1</i>	<i>Vgfa</i>
<b>Fluoxetina</b>	1 hora	~	~	~	↑	~	~	↑	~	~
	4 horas	↑	~	↑	↑↑	~	~	↑↑↑	~	~
	16 horas	↑↑	~	~	↑↑	~	↑	↑	~	↑
	24 horas	↑	~	~	↑↑	~	~	~	~	↑↑
	72 horas	~	~	~	↑↑↑	~	~	~	~	↑↑
<b>Paroxetina</b>	1 hora	~	~	~	↑↑↑	~	~	~	~	~
	4 horas	~	~	~	↑↑↑	~	~	~	~	~
	16 horas	~	~	~	↑↑↑	↑	~	↑↑↑↑	~	~
	24 horas	~	~	↑	↑↑↑	↑	~	~	~	~
	72 horas	~	~	↑	↑↑↑	~	~	~	~	~
<b>Venlafaxina</b>	1 hora	↑↑	↑↑	↑↑	~	↑	~	~	~	~
	4 horas	↑	↑	↑↑	↑↑	~	↑	↑↑↑↑	~	~
	16 horas	↑	↑	↑	~	~	↑	↑↑↑↑	~	~
	24 horas	~	~	↑	~	~	~	↑↑	↑	~
	72 horas	~	~	~	~	~	~	~	↑	~
<b>Rs 67333</b>	1 hora	↑	↑	↑↑	↑	~	~	↑↑	~	↑
	4 horas	↑	~	↑	↑↑	~	↑	↑↑	~	↑
	16 horas	↑↑	~	↑	↑	~	~	↑↑	~	~
	24 horas	~	~	~	~	~	~	↓↓	↑	~
	72 horas	~	~	~	~	~	~	↓↓	↑↑↑↑	~

Tabla 31.- Resumen del efecto del tratamiento con fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y Rs7633 en hipocampo y corteza de cultivos de rodajas de cerebro sobre la expresión de *Axin-1*, *Axin-2*, *Ctnnb1*, *c-Myc*, *c-Jun*, *Ccnd1*, *Pparγ*, *Notch-1* y *Vegf*

			<i>Axin-1</i>	<i>Axin-2</i>	<i>Ctnnb1</i>	<i>c-Myc</i>	<i>c-Jun</i>	<i>Ccnd1</i>	<i>Pparγ</i>	<i>Notch-1</i>	<i>Vegf</i>	
<b>FLUOXETINA</b>	hipocampo	1 día 1 μM	~	~	~	~	~	↑	↓	↑	~	
		3 días 1 μM	~	~	~	~	↑	↑	~	↑	~	
		7 días 1 μM	~	↑↑↑↑	~	↑↑↑	↑	↑↑	~	↑	~	
	Corteza	1 día 1 μM	~	~	~	~	~	~	~	~	~	
		3 días 1 μM	~	~	~	~	↑	~	~	~	~	
		7 días 1 μM	~	~	↑	↑↑↑	↑	↑↑	~	~	~	
<b>PAROXETINA</b>	hipocampo	1 día 1 μM	~	~	~	↑	~	~	~	~	~	
		1 día 10 μM	~	~	~	↑↑	~	~	↑	↑	↑	
		3 días 1 μM	~	↑	~	↑	↑	~	~	↑	~	
		3 días 10 μM	~	~	~	↑↑	↑	~	↑	↑↑	↑	
		7 días 1 μM	~	↑	~	↑	↑	~	~	↑	~	
		7 días 10 μM	~	~	~	↑↑	↑	~	↑	↑↑	↑↑	
	Corteza	1 día 1 μM	~	~	~	~	~	~	~	~	~	
		1 día 10 μM	~	~	~	↑	~	~	↑	~	~	
		3 días 1 μM	~	~	~	↑	~	~	↑	~	~	
		3 días 10 μM	~	~	~	↑	~	~	↑	~	~	
		7 días 1 μM	~	~	~	↑	~	~	↑	~	~	
		7 días 10 μM	~	~	~	↑↑	~	~	↑↑	~	~	
<b>VENLAFAXINA</b>	hipocampo	1 día 1 μM	~	~	~	↑	~	↑	~	↑	↑	
		1 día 10 μM	↑	~	~	↑	↑	↑	~	↑	↑	
		3 días 1 μM	~	↑	↑	↑	~	↑	~	↑	↑	
		3 días 10 μM	↑	~	↑↑↑↑	↑↑	↑	↑	↑	↑	↑↑	
		7 días 1 μM	↑	↑	↑↑↑	↑↑	↑	↑	~	↑	↑↑↑	
		7 días 10 μM	↑	~	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑↑↑	↑↑	↑↑↑↑	
	Corteza	1 día 1 μM	↓	~	~	~	~	↑	↑	↑	~	↑
		1 día 10 μM	~	↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑	↑↑
		3 días 1 μM	~	↑↑	~	↑	~	↑	↑↑	~	~	↑
		3 días 10 μM	~	↑	↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑↑↑↑	~	~	↑↑↑
		7 días 1 μM	~	↑↑	~	↑	↑	↑	↑↑	~	~	↑↑↑
		7 días 10 μM	↑	~	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑↑↑↑↑↑	~	~	↑↑↑↑↑
<b>RS 67333</b>	hipocampo	1 día 1 μM	~	~	~	↑	~	↑	~	↑	~	
		1 día 10 μM	↑	~	~	↑↑	↑	↑↑	~	↑↑	↑	
		3 días 1 μM	~	~	~	↑	~	↑	↓	↑	↑	
		3 días 10 μM	↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑	↑↑	↓↓↓	↑↑↑↑	↑↑↑↑	
		7 días 1 μM	~	~	~	↑	↑	↑↑	↓↓↓	↑↑↑	↑	
		7 días 10 μM	↑↑	↑	↑	↑↑↑↑	↑↑	↑↑	↓↓↓↓	↑↑↑↑	↑↑↑↑	
	Corteza	1 día 1 μM	~	~	~	~	~	↑	↑	~	~	↑
		1 día 10 μM	↑	~	~	↑↑	~	↑	↑	~	~	↑↑
		3 días 1 μM	~	~	~	↑	~	↑	↓	~	~	↑
		3 días 10 μM	↑↑	~	↑	↑↑	↑↑↑	↑	↓↓	↑	↑	↑↑
		7 días 1 μM	~	~	~	↑	~	↑	↓	↑	~	↑↑↑
		7 días 10 μM	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑	↓↓	↑↑↑	~	↑↑↑↑↑

### 3. Efecto de los fármacos antidepresivos sobre la expresión de la proteína $\beta$ -catenina en cultivos primarios de células progenitoras de hipocampo

Se ha determinado mediante inmunofluorescencia el nivel expresión proteína  $\beta$ -catenina en cultivos de células progenitoras de hipocampo sometidos a tratamiento con los antidepresivos fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y la molécula RS76333 durante 3 días de tratamiento, observándose incremento del nivel de expresión de  $\beta$ -catenina en las células tratadas con venlafaxina y RS67333 respecto a los antidepresivos clásicos, este incremento puede verse asociado a una respuesta rápida de venlafaxina y RS67333.,

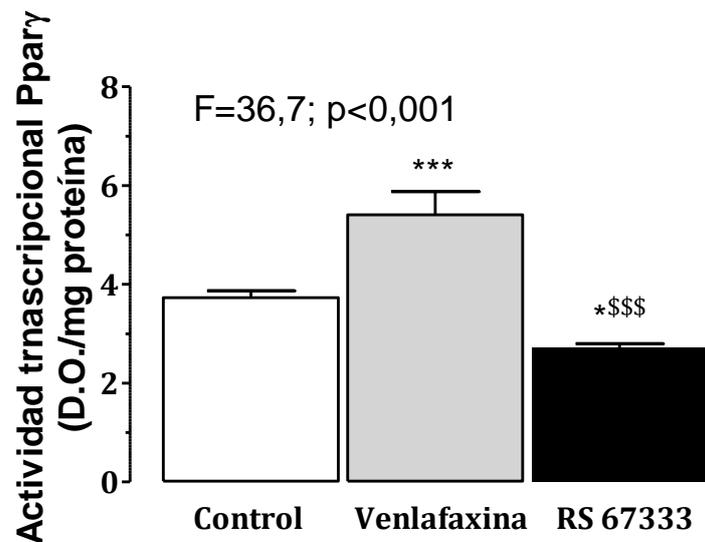


**Figura 78.-** Imagen representativa de la expresión de  $\beta$ -catenina en cultivos de células progenitoras de hipocampo sometidos a tratamiento con 1  $\mu$ M de fluoxetina (B) o 10 $\mu$ M de paroxetina (C), venlafaxina (D) o Rs76333 (E) durante 3 días, en A se muestra la expresión de  $\beta$ -catenina en las células sin tratamiento (control). Los núcleos aparecen marcados con DAPI (azul, a, d, g, j y m). La expresión de  $\beta$ -catenina en las células aparece marcadas en rojo (b, e, h, k y n). Doble marcaje de DAPI,  $\beta$ -catenina realizado con ImageJ (c, f, i, l y o). La barra de escala representa 20  $\mu$ m en todos los casos.

### 4. Modulación de la actividad PPAR $\gamma$ en extracto nuclear del hipocampo de rodajas de cerebro en cultivo.

Debido al inesperado descenso en la expresión del gen del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (*Ppar $\gamma$* ) en el hipocampo de las rodajas de cerebro en cultivo tras el tratamiento con

Rs76333 pero no con los otros antidepresivos, evaluamos la actividad transcripcional de Ppar $\gamma$  en extractos nucleares del hipocampo de rodajas de cerebro en cultivo tras el tratamiento durante 7 días con 10  $\mu$ M de venlafaxina, que mostró en los estudios de expresión génica un incremento significativo en la expresión del gen, y con 10  $\mu$ M de RS 76333 que mostró una disminución significativa en la expresión del gen. En la Figura 79 se muestran los resultados obtenidos sobre la actividad transcripcional de Ppar $\gamma$ . La actividad normalizada de Ppar $\gamma$  en los extractos nucleares de hipocampo de rodajas de cerebro no sometido a tratamiento fue  $3,73 \pm 0,25$ ; incrementando de forma significativa la actividad en los extractos nucleares de hipocampo sometido a tratamiento con venlafaxina ( $5,41 \pm 0,82$ ;  $p < 0,001$  Dunnett post test), de forma paralela a los cambios en la expresión génica. Por el contrario, el tratamiento con Rs76333 produce una disminución significativa en la actividad transcripcional de Ppar $\gamma$  ( $2,71 \pm 0,04$ ; Dunnett post test) de forma paralela a la disminución en la expresión génica.



**Figura 79- Actividad del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma: Ppar $\gamma$  en extractos nucleares de hipocampo de rodajas de cerebro en cultivo tras tratamiento con 10  $\mu$ M de venlafaxina o Rs76333 durante 7 días.** La actividad transcripcional del Ppar $\gamma$  se representan como  $M \pm EEM$  de la densidad óptica (D.O.) obtenida en el kit ELISA normalizado respecto a la concentración de proteínas en las muestras. F= ANOVA entre los distintos grupo, \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  vs el grupo control Dunnett post test. \$\$\$ $p < 0,001$  vs venlafaxina, Student-Newman-Keuls post test.

## Resumen general de la PARTE A: Estudios de expresión génica.

El efecto de fluoxetina, paroxetina, venlafaxina y RS 67333 sobre la proliferación de células progenitoras de hipocampo en cultivo se valoró mediante la cuatificación de BrdU en células expuestas a 1 $\mu$ M de fármaco a 1, 4, 16, 24 y 72 hs, observándose incremento de la incorporación de BrdU a la hora de tratamiento con todos los fármacos, siendo RS 67333 el que produce mayor incorporación de BrdU a las cuatro horas y un segundo pico de incorporación de BrdU a las 72hs. La proliferación celular en el hipocampo de las rodajas de cerebro en cultivo, se determinó mediante inmunofluorescencia con el marcador Ki67, expresado en células en fase de división; las células progenitoras son marcadas con Sox-2. Siete días de tratamiento con 10  $\mu$ M de venlafaxina o RS 67333 producen un claro incremento en el marcaje de ki67 respecto a las células sin tratamiento.

Mientras que el efecto de los fármacos antidepresivos, sobre la expresión de genes implicados en procesos de proliferación se evaluó, mediante la determinación del nivel de RNAm de cada uno de los genes seleccionados, en células progenitoras inmortalizadas de hipocampo (CPH) de rata y en el hipocampo y la corteza de cultivos de rodajas de cerebro de rata en respuesta al tratamiento con cada uno de los fármacos objeto del estudio.

Fluoxetina, venlafaxina y RS 67333 producen incremento significativo en la expresión de *Axin-1* en las CPH. En tejido cerebral, tanto venlafaxina como RS 67333 incrementan la expresión de *Axin-1*. El efecto del RS 67333 es más intenso y precoz. En *Axin-2* el mayor incremento se observa en las CPH a una hora de tratamiento con venlafaxina. Mientras que en cerebro todos los fármacos estudiados incrementan la expresión de *Axin-2*. En el hipocampo, el mayor incremento se observa con RS 67333 y fluoxetina, siendo más precoz el efecto del RS 67333. En la corteza, el mayor incremento en la expresión de *Axin-2* se observó con RS 67333, aunque es más tardío que en hipocampo.

Todos los fármacos incrementan la expresión de *Ctnnb1* en CPH. Mediante inmunofluorescencia en CPH se pudo observar un incremento de la expresión de  $\beta$ -catenina a los siete días de tratamiento con venlafaxina y RS 67333, confirmando lo observado en la expresión génica de *Ctnnb1*. La concentración alta de 10  $\mu$ M de venlafaxina y más de RS 67333 incrementan la expresión de *Ctnnb1* tanto en el hipocampo como en la corteza, aunque es más tardío en corteza.

La expresión de *c-Myc* se vio incrementada con todos los fármacos en CPH, hipocampo y corteza. El mayor incremento se observa a los tres días con fluoxetina en el caso de CPH y con RS 67333 en hipocampo como en corteza. Venlafaxina y paroxetina incrementan la expresión de *c-Jun* en las CPH. El mayor incremento se observa tras 1 hora con venlafaxina. El mayor incremento en la expresión de *c-Jun* en el cerebro, se observó con la administración repetida (3 y 7 dosis) de 10 $\mu$ M RS 67333 tanto en hipocampo como en corteza,

La fluoxetina es el fármaco que más incrementa la expresión de *Ccnd1* en CPH, mientras que en cerebro fluoxetina, venlafaxina y RS 67333 incrementan la expresión de *Ccnd1*, siendo RS 67333 el fármaco que más incrementa la expresión del gen.

La venlafaxina y Paroxetina inducen los niveles más altos de expresión de **Ppary** en CPH. RS 67333 y venlafaxina producen el incremento más rápido. Paroxetina y venlafaxina incrementan la expresión de **Ppary** en cerebro, el mayor efecto se observa los 7 días de tratamiento con venlafaxina tanto en hipocampo como en corteza. RS 67333 por el contrario disminuye la expresión de **Ppary**, tanto en hipocampo como en corteza. Debido a este inesperado descenso en la expresión del gen en hipocampo en cultivo tras el tratamiento con Rs76333 pero no observable con los otros antidepresivos, evaluamos la actividad transcripcional de **Ppary** en extractos nucleares del hipocampo de rodajas de cerebro en cultivo confirmándose que el tratamiento con Rs76333 produce una disminución significativa en la actividad transcripcional de **Ppary** de forma paralela a la disminución en la expresión génica.

RS 67333 y venlafaxina incrementan la expresión de **Notch-1** en las CPH. En el hipocampo, el RS 67333 es el fármaco que más incrementa la expresión de Notch-1, En la corteza, la venlafaxina incrementan más la expresión de **Notch-1** a dosis bajas y tratamiento subagudo

Venlafaxina y paroxetina incrementan la expresión de **Vegf** en las CPH. En tejido RS 67333 es el fármaco que más incrementa **Vegf** en el hipocampo. En la corteza, dosis bajas y tratamiento agudo, la venlafaxina incrementa más la expresión de **Vegf** que el RS 67333.

## PARTE B

### 5. Estudio de Genotipado

#### 5.1. Características de la población de estudio

El estudio de asociación entre SNPs de genes candidatos de la vía wnt/ $\beta$ -catenina y los trastornos depresivos o trastorno bipolar, se realizó en una población de 4107 sujetos que participaron en el estudio DEPREGEN, promovido dentro del CBERSAM, utilizando el banco de muestras de ADN del CIBERSAM. El estudio contó con la aprobación del comité de ética de Granada (promotores del estudio). Los sujetos incluidos aceptaron por escrito su participación en el mismo tras la información por el médico. Del total de los sujetos, 2834 (69%) fueron sujetos control y 1273 (31%) fueron pacientes diagnosticados por un psiquiatra de alguno tipo de trastorno depresivo o trastorno bipolar según criterios del DSM IV. Para el estudio de asociación se dividió a los pacientes en 5 categorías, **todos los pacientes** (TP), **pacientes con depresión** (TD), en este grupo de incluyen todos los pacientes diagnosticados de algún trastorno depresivo sin incluir el trastorno bipolar, trastornos depresiones leves (F32.0), moderadas (F32.1), y graves con o sin síntomas psicóticos (F32.2 y F32.3), trastorno depresivo no especificado (F32.9), trastorno depresivo mayor (F32.x y F33.x) y trastorno distímico (F34.1), **depresión mayor** (F32.x y F33.x) (DM), trastorno distímico (F34.1) (TDs) y el **trastorno bipolar** (F30.x; F31.0; F31.1; F31.2; F31.3; F31.6; F31.8; F31.9; F31.x; F34.0) (TB). Las características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 32. La proporción controles: pacientes fue de 2,2:1, en general el porcentaje de mujeres es mayor tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes, como reflejo de la mayor prevalencia de la enfermedad en la mujeres. En cuanto a la edad son más jóvenes los sujetos del grupo control que los sujetos del grupo de pacientes.

Tabla 32.- Características demográficas (edad y sexo) de los grupos de individuos incluidos en el estudio de genotipado

Grupos	Todos		Mujeres		Varones				
	N	edad	N	%	edad	N		%	edad
Controles	2834	47,3 $\pm$ 17,1	1619	57,2	47,2 $\pm$ 16,7	1215	42,8	47,3 $\pm$ 17,7	F=0,02 ns
Todos los Casos	1273	55,2 $\pm$ 14,6*	849	66,7	53,3 $\pm$ 15,3*	430	33,3	52,3 $\pm$ 16,2*	F=7,6 p<0.05
Depresión	787	52,9 $\pm$ 15,6*	543	68,9	54,7 $\pm$ 14,5*	244	31,1	56,1 $\pm$ 14,8*	F=5,1 p<0.05
Depresión Mayor	605	56,9 $\pm$ 14,9*\$	439	72,6	56,4 $\pm$ 14,5*	166	27,4	58,3 $\pm$ 15,1*	F=1,0; ns
Trastorno Bipolar	486	52,9 $\pm$ 13,9*	306	63,0	50,7 $\pm$ 15,9	180	37,0	46,9 $\pm$ 16,4	F=10,61 p<0.05
Distimias	59	50,1 $\pm$ 13,2	43	72,9	51,7 $\pm$ 14,1	16	27,1	48,6 $\pm$ 10,2	F=0,4; ns
		F=68,6; p<0,001			F=38,8; p<0,001			F=23,7; p<0,001	

#### 5.2. Genes candidatos y SNP seleccionados

Las enfermedades psiquiátricas desde el punto de vista genético, son enfermedades complejas que no muestran herencia mendeliana atribuible a un único locus. Frente a las enfermedades monogénicas, las enfermedades complejas están causadas por la acción de múltiples loci, cada uno con un pequeño efecto, además estos loci pueden interactuar entre ellos y a su vez interactuar con factores ambientales. El objetivo de los estudios de asociación es identificar esos loci y caracterizar las complejas relaciones que se establecen entre ellos. En este estudio tratamos de detectar una susceptibilidad a la depresión mediante la identificación de alelos comunes en la población (SNPs de predisposición) en una serie de genes candidatos de la vía wnt- $\beta$ -catenina implicada en procesos de proliferación y plasticidad neuronal. En este estudio caso-control con individuos no relacionados. Se identifica un set de casos diagnosticados según unos criterios especificados (ver métodos) y una muestra independiente de individuos no afectados de la misma población. Se comparan las frecuencias genotípicas y/o alélicas en ambos grupos para identificar variantes asociadas con la enfermedad objeto de estudio. Dos de los principales inconvenientes de este tipo de estudios son 1) la dificultad para encontrar variantes raras y 2) la posibilidad de falsos positivos por problemas de estratificación en la población (población está dividida en diferentes estratos y existen probabilidades distintas de ser seleccionado como caso o control según el estrato).

Para cada SNP hay tres posibles genotipos, y podemos evaluar diferentes modelos genéticos bajo los que contemplar esos genotipos. En el presente estudio se han valorado los modelos codominante, dominante y recesivo.

Para cada uno de los genes candidatos, se ha realizado una selección de SNP mediante datos bibliométricos en los que se han demostrado una asociación de las variantes génicas con una respuesta a fármacos antidepresivos o que presentaron asociación directa con patología psiquiátrica. La gran mayoría de las asociaciones han sido replicadas en otros estudios y algunos de los SNPs seleccionados tienen efectos funcionales estudiados en profundidad. En la Tabla 33 se detallan las variantes incluidas en el estudio, sus identificadores de la base de datos SNP del NCBI (National Center for Biotechnology Information) su locus, los alelos de cada SNP, el alelo ancestral y las frecuencias genotípicas en europeos en HapMap.

**Tabla 33.-** Relación de SNP incluidos en el estudio

GEN	Locus	dbSNPs	Alelos	Alelo Ancestral	HapMap-CEU	NºGenBank
<i>AXIN1</i>	16p13.3	rs214250	C/T	C	0,60:0,35:0,05	Z99754
<i>AXIN2</i>	17q23-q24	rs7210356	A/G	G	0,00:0,32:0,68	NT_010783
		rs3923086	G/T	T	0,30:0,45:0,25	NT_010783
<i>AKT1</i>	14q32.33	rs1130214	G/T	G	0,52:0,40:0,08	NT_026437.11
		rs1130233	A/G	G	0,04:0,31:0,65	NT_026437.11
		/rs2498799				
<i>APC</i>	5q21-q22	rs3730358				
		rs454886	C/T	T	0,11:0,50:0,39	NC_000005.5
		rs17290456	C/T	T	0,12:0,88:0,00	NC_000005.8
<i>CTNNA1</i>	3p21	rs13167522	C/T	T	0,06:0,07:0,87	NT_034772
		rs3864004	A/G	A	0,27:0,52:0,21	NT_034772
		rs4135385	A/G	A	0,48:0,47:0,05	NT_022517.17
<i>DAAM2</i>	6p21.2	rs4533622	A/C	A	0,17:0,48:0,35	NT_022517
		rs2140090	G/T	G	0,23:0,50:0,27	NT_022517
		rs3915129	A/C	C	0,23:0,50:0,27	NT_022517
		rs6776881	A/G	A	0,25:0,55:0,20	NT_037565
		rs3774369	A/G	A	0,22:0,58:0,20	NT_022517
		rs13075993	A/G	G	0,24:0,52:0,24	NT_022517
		rs6937133	A/G	A	0,58:0,36:0,06	NT_007592
<i>DKK4</i>	8p11.2-p11.1	rs3004067	C/T	C	0,36:0,48:0,16	NT_007592
		rs2073665	C/T	T	0,01:0,12:0,87	NT_008251
<i>FZD3</i>	8p21	rs352203	C/T	T	0,18:0,46:0,36	NT_023666
<i>GSK3β</i>	3q13.3	rs12630592	G/T	T	0,44:0,46:0,10	NT_005612
		rs6438552	A/G	G	0,43:0,48:0,09	NT_005612.14
<i>WNT2B</i>	1p13.2	rs3790606	C/G	G	0,10:0,42:0,48	NT_021931.1
<i>WNT3</i>	17q21	rs199494	A/G	A	0,33:0,46:0,21	NT_010783
<i>ZBED3</i>	5q13.3	rs2914143	A/G	G	0,05:0,25:0,70	NT_006713

### 5.3 Estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas y asociación con la enfermedad para cada SNP

Mediante la utilización de software SNPStats, para cada SNP, antes de realizar el estudio de asociación, comprobamos las frecuencias alélicas y el equilibrio de Hardy-Weimberg (HWE) mediante un ajuste de  $\chi^2$ . La hipótesis nula ( $H_0$ ) es que el SNP cumple con el HWE, por lo que necesitamos obtener p-valores mayores a 0,05.

Una vez analizadas las frecuencias alélicas, evaluamos la asociación entre los genotipos de un SNP y la variable respuesta (en nuestro caso grupo de pacientes). Dado que en nuestro estudio de

asociación poblacional la variable respuesta es categórica (binaria: casos y controles) evaluamos la asociación entre el SNP y la enfermedad mediante la tabla de contingencia 3x2. Para testar la hipótesis nula de no asociación entre genotipos y la variable respuesta, llevamos a cabo un test de  $\chi^2$  con 2 grados de libertad.

Como modelos de asociación valoramos el modelo *codominante* o de 2 grados de libertad que tiene en cuenta la tabla completa de los tres genotipos, el modelo *dominante* y el modelo *recesivo*. Básicamente el modelo *codominante* asume que puede haber un riesgo distinto de los individuos heterocigotos y homocigotos variantes respecto a los homocigotos normales. El modelo *dominante* que asume que basta con tener un alelo variante para conferir riesgo o el modelo *recesivo* en el cual es necesario tener las 2 copias del alelo variante para presentar la enfermedad. Así pues, para llevar a cabo el análisis de asociación bajo esos modelos, basta con reorganizar la tabla de contingencia 3x2 en una tabla 2x2 y un test de  $\chi^2$  (con 1 grado de libertad)

En el estudio de asociación se excluyó el grupo de distimias debido al bajo número de casos en algunos de los subgrupos. El SNP rs3730358 no pudo determinarse debido a un problema metodológico.

### 5.3.1 AKT1

#### 5.3.1.1 Distribución alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg de los SNP rs1130214 y rs1130233 en AKT1

Las frecuencias alélicas de los SNPs rs1130214 y rs1130233 de AKT1 se muestran en la Tabla 34. Las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de todos los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes con trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM),

**Tabla 34.- Frecuencias alélicas de los SNP de AKT1 rs1130214 y rs1130233 incluidos en el estudio, en el conjunto de la muestra y en mujeres y varones**

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TB N (%)	TDs N (%)
<b>AKT1</b>						
<b>rs1130214</b>						
G todos	4256 (73)	1946 (72)	815 (69)	838 (70)	706 (73)	90 (78)
G mujeres	2496 (73)	1322 (71)	577 (70)	610 (70)	433 (71)	66 (77)
G varones	1746 (72)	619 (72)	238 (67)	228 (69)	273 (76)	24 (80)
T todos	1590 (27)	766 (28)	365 (31)	360 (30)	260 (27)	26 (22)
T mujeres	912 (27)	530 (29)	247 (29)	258 (30)	175 (29)	20 (23)
T varones	676 (28)	235 (28)	118 (33)	102 (31)	85 (24)	6 (20)
<b>rs1130233</b>						
A todos	1442 (25)	700 (26)	291 (25)	320 (27)	253 (26)	27 (24)
A mujeres	848 (25)	476 (26)	204 (25)	232 (27)	166 (28)	16 (19)
A varones	591 (24)	222 (26)	87 (24)	88 (27)	87 (24)	11 (37)
G todos	4390 (75)	1998 (74)	891 (75)	876 (73)	705 (74)	87 (76)
G mujeres	2554 (75)	1364 (74)	622 (75)	634 (73)	436 (72)	68 (81)
G varones	1823 (76)	630 (74)	269 (76)	242 (73)	269 (76)	19 (63)

trastorno bipolar (TB) y distimias (TDs) tanto para el conjunto de la población:  $\chi^2 = 5,6$ ; ns para el rs1130214 y  $\chi^2 = 4,0$ ; ns para el rs1130233, como para el subgrupo de mujeres:  $\chi^2 = 6,9$ ; ns para el rs1130214 y  $\chi^2 = 4,9$ ; ns para el rs1130233 y el subgrupo de varones:  $\chi^2 = 10,3$ ; ns para el rs1130214 y  $\chi^2 = 3,6$ ; ns para el rs1130233. La población control cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg  $p=0,58$  para el SNP rs1130214 y  $p=0,10$  para el SNP rs1130233;

### 5.3.1.2 Distribución genotípica los SNPs rs1130214 y rs1130233 en AKT1 en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

En la Tabla 35 se muestran las frecuencias genotípicas para los SPNs de *AKT1* rs1130214 y rs1130233 en el grupo control, en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) en el conjunto de la población y en mujeres y hombres por separado.

**Tabla 35. Frecuencias genotípicas de los SNP de *AKT1* rs1130214 y rs1130233 y estudio de asociación en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

<b>AKT1 rs1130214</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	GG	1537 (52,7%)	688 (50,7%)	1,00		436 (49,9%)	1,00		290 (48,4%)	1,00		252 (52,2%)	1,00	
	GT	1168 (40,1%)	570 (42%)	1,09 (0,95-1,25)	0,45	368 (42,1%)	1,11 (0,95-1,30)	0,34	258 (43,1%)	1,17 (0,97-1,41)	0,14	202 (41,8%)	1,05 (0,86-1,29)	0,54
	TT	210 (7,2%)	98 (7,2%)	1,04 (0,81-1,35)		69 (7,9%)	1,16 (0,86-1,55)		51 (8,5%)	1,29 (0,92-1,79)		29 (6%)	0,84 (0,56-1,27)	
D	GG vs (GT+TT)	1378 (47,3%)	668 (49,3%)	1,08 (0,95-1,23)	0,23	437 (50,1%)	1,12 (0,96-1,30)	0,15	309 (51,6%)	1,19 (1,00-1,42)	0,54	231 (47,8%)	1,02 (0,84-1,24)	0,82
R	(GG+GT) vs TT	210 (7,2%)	98 (7,2%)	1,00 (0,78-1,29)	0,98	69 (7,9%)	1,11 (0,83-1,47)	0,49	51 (8,5%)	1,20 (0,87-1,65)	0,27	29 (6%)	0,82 (0,55-1,23)	0,33
<b>MUJERES</b>														
CD	GG	901 (52,9%)	465 (50,2%)	1,00		313 (50,3%)	1,00		212 (48,9%)	1,00		152 (50%)	1,00	
	GT	694 (40,7%)	392 (42,3%)	1,09 (0,93-1,29)	0,34	263 (42,3%)	1,09 (0,90-1,32)	0,47	186 (42,9%)	1,14 (0,91-1,42)	0,20	129 (42,4%)	1,10 (0,85-1,42)	0,57
	TT	109 (6,4%)	69 (7,5%)	1,23 (0,89-1,69)		46 (7,4%)	1,21 (0,84-1,75)		36 (8,3%)	1,40 (0,94-2,11)		23 (7,6%)	1,25 (0,77-2,02)	
D	GG vs (GT+TT)	803 (47,1%)	461 (49,8%)	1,11 (0,95-1,31)	0,19	309 (49,7%)	1,11 (0,92-1,33)	0,28	222 (51,1%)	1,17 (0,95-1,45)	0,13	152 (50%)	1,12 (0,88-1,43)	0,36
R	(GG+GT) vs TT	109 (6,4%)	69 (7,5%)	1,18 (0,86-1,61)	0,31	46 (7,4%)	1,17 (0,82-1,67)	0,4	36 (8,3%)	1,32 (0,89-1,96)	0,17	23 (7,6%)	1,20 (0,75-1,91)	0,46
<b>VARONES</b>														
CD	GG	636 (52,5%)	221 (51,8%)	1,00		121 (48,8%)	1,00		78 (47,3%)	1,00		100 (55,9%)	1,00	
	GT	474 (39,1%)	177 (41,5%)	1,07 (0,85-1,35)	0,49	104 (41,9%)	1,15 (0,86-1,54)	0,56	72 (43,6%)	1,24 (0,88-1,74)	0,45	73 (40,8%)	0,98 (0,71-1,35)	0,04
	TT	101 (8,3%)	29 (6,8%)	0,83 (0,53-1,28)		23 (9,3%)	1,20 (0,73-1,96)		15 (9,1%)	1,21 (0,67-2,19)		6 (3,4%)	0,38 (0,16-0,88)	
D	GG vs (GT+TT)	575 (47,5%)	206 (48,2%)	1,03 (0,83-1,29)	0,79	127 (51,2%)	1,16 (0,88-1,53)	0,28	87 (52,7%)	1,23 (0,89-1,71)	0,21	79 (44,1%)	0,87 (0,64-1,20)	0,4
R	(GG+GT) vs TT	101 (8,3%)	29 (6,8%)	0,80 (0,52-1,23)	0,3	23 (9,3%)	1,12 (0,70-1,81)	0,63	15 (9,1%)	1,10 (0,62-1,94)	0,75	6 (3,4%)	0,38 (0,16-0,88)	0,01
<b>rs1130233</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	TDG	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	GG	1665 (57,3%)	734 (54,4%)	1,00		481 (55,3%)	1,00		324 (54,2%)	1,00		253 (52,8%)	1,00	
	AG	1047 (36%)	530 (39,8%)	1,15 (1,00-1,32)	0,12	331 (38%)	1,09 (0,93-1,28)	0,54	228 (38,1%)	1,12 (0,93-1,35)	0,35	199 (41,5%)	1,25 (1,02-1,53)	0,06
	AA	196 (6,7%)	85 (6,3%)	0,98 (0,75-1,29)		58 (6,7%)	1,02 (0,75-1,40)		46 (7,7%)	1,21 (0,86-1,70)		27 (5,6%)	0,91 (0,59-1,38)	
D	GG vs (AG+AA)	1243 (42,7%)	615 (45,6%)	1,12 (0,99-1,28)	0,08	389 (44,7%)	1,08 (0,93-1,26)	0,30	274 (45,8%)	1,13 (0,95-1,35)	0,17	226 (47,2%)	1,20 (0,99-1,45)	0,07
R	(GG+AG) vs AA	196 (6,7%)	85 (6,3%)	0,93 (0,72-1,21)	0,59	58 (6,7%)	0,99 (0,73-1,34)	0,94	46 (7,7%)	1,15 (0,83-1,61)	0,41	27 (5,6%)	0,83 (0,55-1,25)	0,36
<b>MUJERES</b>														
CD	GG	972 (57,1%)	499 (54,2%)	1,00		344 (55,6%)	1,00		229 (52,9%)	1,00		155 (51,5%)	1,00	
	AG	610 (35,9%)	366 (39,8%)	1,17 (0,99-1,38)	0,12	240 (38,8%)	1,11 (0,92-1,35)	0,29	176 (40,6%)	1,22 (0,98-1,53)	0,19	126 (41,9%)	1,30 (1,00-1,67)	0,14
	AA	119 (7%)	55 (6%)	0,90 (0,64-1,26)		35 (5,7%)	0,83 (0,56-1,24)		28 (6,5%)	1,00 (0,65-1,54)		20 (6,6%)	1,05 (0,64-1,74)	
D	GG vs (AG+AA)	729 (42,9%)	421 (45,8%)	1,12 (0,96-1,32)	0,15	275 (44,4%)	1,07 (0,89-1,28)	0,50	204 (47,1%)	1,19 (0,96-1,47)	0,11	146 (48,5%)	1,26 (0,98-1,61)	0,07
R	(GG+AG) vs AA	119 (7%)	55 (6%)	0,85 (0,61-1,18)	0,31	35 (5,7%)	0,80 (0,54-1,18)	0,24	28 (6,5%)	0,92 (0,60-1,41)	0,7	20 (6,6%)	0,95 (0,58-1,55)	0,82
<b>VARONES</b>														
CD	GG	693 (57,4%)	234 (54,9%)	1,00		136 (54,8%)	1,00		95 (57,6%)	1,00		98 (55,1%)	1,00	
	AG	437 (36,2%)	162 (38%)	1,10 (0,87-1,39)	0,66	89 (35,9%)	1,04 (0,77-1,39)	0,28	52 (31,5%)	0,87 (0,61-1,24)	0,10	73 (41%)	1,18 (0,85-1,64)	0,24
	AA	77 (6,4%)	30 (7%)	1,15 (0,74-1,80)		23 (9,3%)	1,52 (0,92-2,51)		18 (10,9%)	1,71 (0,98-2,97)		7 (3,9%)	0,64 (0,29-1,43)	
D	GG vs (AG+AA)	514 (42,6%)	192 (45,1%)	1,11 (0,89-1,38)	0,37	112 (45,2%)	1,11 (0,84-1,46)	0,46	70 (42,4%)	0,99 (0,71-1,38)	0,97	80 (44,9%)	1,10 (0,80-1,51)	0,55
R	(GG+AG) vs AA	77 (6,4%)	30 (7%)	1,11 (0,72-1,72)	0,64	23 (9,3%)	1,50 (0,92-2,44)	0,11	18 (10,9%)	1,80 (1,05-3,09)	0,04	7 (3,9%)	0,60 (0,27-1,32)	0,18

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo. TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

En el conjunto de pacientes y en el conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, no observamos asociación con los SNPs rs1130214 y rs1130233 de *AKT1*, en ninguno de los modelos estudiados (codominante, dominante y recesivo) ni para el subgrupo de mujeres o varones. En pacientes diagnosticados de depresión mayor (DM) encontramos un incremento significativo del riesgo de enfermedad en el modelo recesivo en varones con genotipo TT del SNP **rs1130233** (OR=1,80; IC95% = 1,05-3,09; p=0,04). Los varones portadores del alelo T del marcador **rs1130214** muestran un claro efecto protector al trastorno bipolar, (OR=0,38; IC95% 0,16-0,88; p=0,04) tanto en el modelo codominante como en el recesivo, sin embargo el bajo número de casos en este subgrupo de pacientes (n=6) obliga a considerar este resultado con reservas. Por el contrario, el marcador **rs1130233** presenta una tendencia a incrementar el riesgo de trastorno bipolar en los individuos heterocigóticos GT del conjunto de la población (modelo codominante OR=1,25; IC95% 1,02-1,53; p=0,06) sobre todo en mujeres (modelo dominante OR=1,30; IC95% 1,00-1,67; p=0,14), aunque no llegó a ser estadísticamente significativo.

### 5.3.2 APC

#### 5.3.2.1 Distribución alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg de los SNPs rs454886, rs13167522 y rs17290456 en APC

Las frecuencias alélicas de los SNPs rs454886, rs13167522 y rs17290456 en APC se muestran en la Tabla 36. Las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y distímias (TDs) tanto para el conjunto de la población:  $\chi^2 = 3,1$ ; ns para el rs454886;  $\chi^2 = 2,51$ ; ns para el rs13167522 y  $\chi^2 = 3,0$ ; ns para el rs1130233, como para el subgrupo de mujeres:  $\chi^2 = 3,1$ ; ns para el rs454886;  $\chi^2 = 0,6$ ; ns para el rs13167522 y  $\chi^2 = 3,1$ ; ns para el rs1130233 y el subgrupo de varones:  $\chi^2 = 3,0$ ; ns para el rs454886;  $\chi^2 = 4,0$ ; ns para el rs13167522 y  $\chi^2 = 1,5$ ; ns para el rs1130233. La población control cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg p=0,58 para los SNPs rs454886 p=0,8; rs13167522, p=0,4 y rs17290456 p=0,8.

**Tabla 36.- Frecuencias alélicas de los SNP en APC rs454886, rs13167522 y rs17290456** incluidos en el estudio en el conjunto de la muestra y en mujeres y varones.

APC /SNPs	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	MD N (%)	TB N (%)	TDs N (%)
<b>rs454886</b>						
<b>T todos</b>	3981 (68)	1808 (68)	1148 (67)	790 (67)	660 (69)	73 (64)
<b>T mujeres</b>	2310 (68)	1248 (68)	825 (67)	581 (67)	423 (71)	52 (63)
<b>T varones</b>	1671 (68)	556 (66)	319 (65)	209 (65)	237 (67)	21 (66)
<b>C todos</b>	1893 (32)	870 (32)	576 (33)	394 (33)	294 (31)	41 (36)
<b>C mujeres</b>	1108 (32)	580 (32)	405 (33)	281 (33)	175 (29)	30 (37)
<b>C varones</b>	785 (32)	288 (34)	169 (35)	113 (35)	119 (33)	11 (34)
<b>rs13167522</b>						
<b>T todos</b>	5361 (91)	2453 (91)	1590 (92)	1089 (92)	863 (90)	106 (91)
<b>T mujeres</b>	3119 (91)	1671 (91)	1128 (91)	789 (92)	543 (90)	76 (90)
<b>T varones</b>	2242 (91)	776 (92)	456 (93)	300 (93)	320 (90)	30 (94)
<b>C todos</b>	527 (9)	231 (9)	140 (8)	97 (8)	91 (10)	10 (9)
<b>C mujeres</b>	303 (9)	163 (9)	106 (9)	73 (8)	57 (10)	8 (10)
<b>C varones</b>	224 (9)	68 (8)	34 (7)	24 (7)	34 (10)	2 (6)
<b>rs17290456</b>						
<b>T todos</b>	5471 (93)	2513 (93)	1632 (93)	1119 (93)	881 (92)	110 (93)
<b>T mujeres</b>	3171 (92)	1709 (92)	1159 (93)	813 (93)	550 (91)	79 (92)
<b>T varones</b>	2300 (93)	798 (93)	467 (94)	306 (93)	331 (92)	31 (97)
<b>C todos</b>	437 (7)	199 (7)	118 (7)	83 (7)	81 (8)	8 (7)
<b>C mujeres</b>	261 (8)	141 (8)	87 (7)	59 (7)	54 (9)	7 (8)
<b>C varones</b>	176 (7)	58 (7)	31 (6)	24 (7)	27 (8)	1 (3)

GC: grupo control. TP; todos los pacientes; TD: todos los pacientes diagnosticados de trastorno depresivo; TB: trastorno bipolar; TDs: distimias. N: número de casos; (%) porcentaje de pacientes.

### 5.3.2.2 Distribución genotípica de los SNPs rs454886, rs13167522 y rs17290456 en APC en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

**Tabla 37. Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los SNP en APC rs454886, rs13167522 y rs17290456 en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

<b>APC rs454886</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	TT	1346 (45,8%)	609 (45,5%)	1,00		384 (44,5%)	1,00		267 (45,1%)	1,00		225 (47,2%)	1,00	
	CT	1289 (43,9%)	590 (44,1%)	1,01 (0,88-1,16)	<b>0,97</b>	380 (44,1%)	1,03 (0,88-1,21)	<b>0,61</b>	256 (43,2%)	1,00 (0,83-1,21)	<b>0,62</b>	210 (44%)	0,97 (0,80-1,19)	<b>0,58</b>
	CC	302 (10,3%)	140 (10,5%)	1,02 (0,82-1,28)		98 (11,4%)	1,14 (0,88-1,47)		69 (11,7%)	1,15 (0,86-1,54)		42 (8,8%)	0,83 (0,58-1,18)	
D	TT vs (CT+CC)	1591 (54,2%)	730 (54,5%)	1,01 (0,89-1,15)	<b>0,83</b>	478 (55,5%)	1,05 (0,90-1,23)	<b>0,51</b>	325 (54,9%)	1,03 (0,86-1,23)	<b>0,75</b>	252 (52,8%)	0,95 (0,78-1,15)	<b>0,59</b>
R	(TT+CT) vs CC	302 (10,3%)	140 (10,5%)	1,02 (0,82-1,26)	<b>0,86</b>	98 (11,4%)	1,12 (0,88-1,43)	<b>0,36</b>	69 (11,7%)	1,15 (0,87-1,52)	<b>0,33</b>	42 (8,8%)	0,84 (0,60-1,18)	<b>0,31</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	TT	772 (45,2%)	427 (46,7%)	1,00		278 (45,2%)	1,00		196 (45,5%)	1,00		149 (49,8%)	1,00	
	CT	766 (44,8%)	394 (43,1%)	0,93 (0,78-1,10)	<b>0,7</b>	269 (43,7%)	0,98 (0,80-1,19)	<b>0,74</b>	189 (43,9%)	0,97 (0,78-1,22)	<b>0,89</b>	125 (41,8%)	0,85 (0,65-1,09)	<b>0,29</b>
	CC	171 (10%)	93 (10,2%)	0,98 (0,74-1,30)		68 (11,1%)	1,10 (0,81-1,51)		46 (10,7%)	1,06 (0,74-1,52)		25 (8,4%)	0,76 (0,48-1,19)	
D	TT vs (CT+CC)	937 (54,8%)	487 (53,3%)	0,94 (0,80-1,10)	<b>0,45</b>	337 (54,8%)	1,00 (0,83-1,20)	<b>0,99</b>	235 (54,5%)	0,99 (0,80-1,22)	<b>0,91</b>	150 (50,2%)	0,83 (0,65-1,06)	<b>0,14</b>
R	(TT+CT) vs CC	171 (10%)	93 (10,2%)	1,02 (0,78-1,33)	<b>0,89</b>	68 (11,1%)	1,12 (0,83-1,51)	<b>0,46</b>	46 (10,7%)	1,07 (0,76-1,52)	<b>0,68</b>	25 (8,4%)	0,82 (0,53-1,27)	<b>0,37</b>
<b>VARONES</b>														
CD	TT	574 (46,7%)	181 (42,9%)	1,00		105 (43%)	1,00		71 (44,1%)	1,00		76 (42,7%)	1,00	
	CT	523 (42,6%)	194 (46%)	1,18 (0,93-1,49)	<b>0,38</b>	109 (44,7%)	1,14 (0,85-1,53)	<b>0,52</b>	67 (41,6%)	1,04 (0,73-1,48)	<b>0,41</b>	85 (47,8%)	1,23 (0,88-1,71)	<b>0,43</b>
	CC	131 (10,7%)	47 (11,1%)	1,14 (0,78-1,65)		30 (12,3%)	1,25 (0,80-1,96)		23 (14,3%)	1,42 (0,85-2,36)		17 (9,6%)	0,98 (0,56-1,71)	
D	TT vs (CT+CC)	654 (53,3%)	241 (57,1%)	1,17 (0,94-1,46)	<b>0,17</b>	139 (57%)	1,16 (0,88-1,53)	<b>0,29</b>	90 (55,9%)	1,11 (0,80-1,55)	<b>0,53</b>	102 (57,3%)	1,18 (0,86-1,62)	<b>0,31</b>
R	(TT+CT) vs CC	131 (10,7%)	47 (11,1%)	1,05 (0,74-1,49)	<b>0,79</b>	30 (12,3%)	1,17 (0,77-1,79)	<b>0,46</b>	23 (14,3%)	1,40 (0,87-2,25)	<b>0,18</b>	17 (9,6%)	0,88 (0,52-1,50)	<b>0,65</b>
<b>rs13167522</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	TDG	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	TT	2436 (82,7%)	1118 (83,3%)	1,00		730 (84,4%)	1,00		500 (84,3%)	1,00		388 (81,3%)	1,00	
	CT	489 (16,6%)	217 (16,2%)	0,97 (0,81-1,15)	<b>0,83</b>	130 (15%)	0,89 (0,72-1,09)	<b>0,52</b>	89 (15%)	0,89 (0,69-1,13)	<b>0,62</b>	87 (18,2%)	1,12 (0,87-1,44)	<b>0,57</b>
	CC	19 (0,6%)	7 (0,5%)	0,80 (0,34-1,92)		5 (0,6%)	0,88 (0,33-2,36)		4 (0,7%)	1,03 (0,35-3,03)		2 (0,4%)	0,66 (0,15-2,85)	
D	TT vs (CT+CC)	508 (17,3%)	224 (16,7%)	0,96 (0,81-1,14)	<b>0,65</b>	135 (15,6%)	0,89 (0,72-1,09)	<b>0,25</b>	93 (15,7%)	0,89 (0,70-1,14)	<b>0,35</b>	89 (18,7%)	1,10 (0,86-1,41)	<b>0,46</b>
R	(TT+CT) vs CC	19 (0,6%)	7 (0,5%)	0,81 (0,34-1,92)	<b>0,62</b>	5 (0,6%)	0,90 (0,33-2,40)	<b>0,82</b>	4 (0,7%)	1,05 (0,35-3,08)	<b>0,94</b>	2 (0,4%)	0,65 (0,15-2,79)	<b>0,54</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	TT	1419 (82,9%)	756 (82,4%)	1,00		513 (83,1%)	1,00		359 (83,3%)	1,00		243 (81,3%)	1,00	
	CT	281 (16,4%)	159 (17,3%)	1,06 (0,86-1,31)	<b>0,25</b>	102 (16,5%)	1,00 (0,78-1,29)	<b>0,63</b>	71 (16,5%)	1,00 (0,75-1,33)	<b>0,53</b>	57 (19%)	1,18 (0,86-1,62)	<b>0,09</b>
	CC	11 (0,6%)	2 (0,2%)	0,34 (0,08-1,54)		2 (0,3%)	0,50 (0,11-2,28)		1 (0,2%)	0,36 (0,05-2,79)		0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	
D	TT vs (CT+CC)	292 (17,1%)	161 (17,6%)	1,03 (0,84-1,28)	<b>0,75</b>	104 (16,9%)	0,99 (0,77-1,26)	<b>0,91</b>	72 (16,7%)	0,97 (0,73-1,29)	<b>0,86</b>	57 (19%)	1,14 (0,83-1,56)	<b>0,42</b>
R	(TT+CT) vs CC	11 (0,6%)	2 (0,2%)	0,34 (0,07-1,53)	<b>0,11</b>	2 (0,3%)	0,50 (0,11-2,27)	<b>0,34</b>	1 (0,2%)	0,36 (0,05-2,79)	<b>0,26</b>	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	<b>0,05</b>
<b>VARONES</b>														
CD	TT	1017 (82,5%)	359 (85,1%)	1		214 (87,3%)	1		141 (87%)	1		145 (81,9%)	1	
	CT	208 (16,9%)	58 (13,7%)	0,79 (0,58-1,08)	<b>0,19</b>	28 (11,4%)	0,64 (0,42-0,97)	<b>0,06</b>	18 (11,1%)	0,62 (0,37-1,04)	<b>0,06</b>	30 (16,9%)	1,01 (0,66-1,54)	<b>0,8</b>
	CC	8 (0,6%)	5 (1,2%)	1,77 (0,58-5,45)		3 (1,2%)	1,78 (0,47-6,77)		3 (1,8%)	2,70 (0,71-10,31)		2 (1,1%)	1,75 (0,37-8,34)	
D	TT vs (CT+CC)	216 (17,5%)	63 (14,9%)	0,83 (0,61-1,12)	<b>0,22</b>	31 (12,7%)	0,68 (0,46-1,02)	<b>0,55</b>	21 (13%)	0,70 (0,43-1,13)	<b>0,13</b>	32 (18,1%)	1,04 (0,69-1,57)	<b>0,86</b>
R	(TT+CT) vs CC	8 (0,6%)	5 (1,2%)	1,84 (0,60-5,64)	<b>0,3</b>	3 (1,2%)	1,90 (0,50-7,21)	<b>0,37</b>	3 (1,8%)	2,89 (0,76-11,00)	<b>0,15</b>	2 (1,1%)	1,75 (0,37-8,31)	<b>0,51</b>

Tabla 26 (continuación)

<b>rs17290456</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	TDG	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	TT	2534 (85,8%)	1162 (85,7%)	1,00		761 (87%)	1,00		521 (86,7%)	1,00		401 (83,4%)	1,00	
	CT	403 (13,6%)	189 (13,9%)	1,02 (0,85-1,23)	<b>0,64</b>	110 (12,6%)	0,91 (0,73-1,14)	<b>0,64</b>	77 (12,8%)	0,93 (0,72-1,21)	<b>0,84</b>	79 (16,4%)	1,24 (0,95-1,61)	<b>0,15</b>
	CC	17 (0,6%)	5 (0,4%)	0,64 (0,24-1,74)		4 (0,5%)	0,78 (0,26-2,34)		3 (0,5%)	0,86 (0,25-2,94)		1 (0,2%)	<b>0,37 (0,05-2,80)</b>	
D	TT vs (CT+CC)	420 (14,2%)	194 (14,3%)	1,01 (0,84-1,21)	<b>0,94</b>	114 (13%)	0,90 (0,72-1,13)	<b>0,37</b>	80 (13,3%)	0,93 (0,72-1,20)	<b>0,56</b>	80 (16,6%)	1,20 (0,93-1,56)	<b>0,17</b>
R	(TT+CT) vs CC	17 (0,6%)	5 (0,4%)	0,64 (0,24-1,74)	<b>0,36</b>	4 (0,5%)	0,79 (0,27-2,36)	<b>0,67</b>	3 (0,5%)	0,87 (0,25-2,97)	<b>0,82</b>	1 (0,2%)	<b>0,36 (0,05-2,71)</b>	<b>0,25</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	TT	1465 (85,4%)	786 (85%)	1,00		538 (86,4%)	1,00		378 (86,7%)	1,00		248 (82,1%)	1,00	
	CT	241 (14%)	137 (14,8%)	1,06 (0,84-1,33)	<b>0,32</b>	83 (13,3%)	0,94 (0,72-1,23)	<b>0,64</b>	57 (13,1%)	0,92 (0,67-1,25)	<b>0,51</b>	54 (17,9%)	<b>1,32 (0,96-1,83)</b>	<b>0,05</b>
	CC	10 (0,6%)	2 (0,2%)	0,37 (0,08-1,71)		2 (0,3%)	0,54 (0,12-2,49)		1 (0,2%)	0,39 (0,05-3,04)		0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	
D	TT vs (CT+CC)	251 (14,6%)	139 (15%)	1,03 (0,82-1,29)	<b>0,78</b>	85 (13,6%)	0,92 (0,71-1,20)	<b>0,55</b>	58 (13,3%)	0,90 (0,66-1,22)	<b>0,48</b>	54 (17,9%)	1,27 (0,92-1,76)	<b>0,15</b>
R	(TT+CT) vs CC	10 (0,6%)	2 (0,2%)	0,37 (0,08-1,69)	<b>0,16</b>	2 (0,3%)	0,55 (0,12-2,51)	<b>0,41</b>	1 (0,2%)	0,39 (0,05-3,07)	<b>0,31</b>	0 (0%)	<b>0,00 (0,00-NA)</b>	<b>0,07</b>
<b>VARONES</b>														
CD	TT	1069 (86,3%)	373 (87,2%)	1,00		220 (88,3%)	1,00		143 (86,7%)	1,00		153 (85,5%)	1,00	
	CT	162 (13,1%)	52 (12,2%)	0,92 (0,66-1,28)	<b>0,84</b>	27 (10,8%)	0,81 (0,53-1,25)	<b>0,57</b>	20 (12,1%)	0,92 (0,56-1,52)	<b>0,64</b>	25 (14%)	1,08 (0,68-1,70)	<b>0,95</b>
	CC	7 (0,6%)	3 (0,7%)	1,23 (0,32-4,77)		2 (0,8%)	1,39 (0,29-6,73)		2 (1,2%)	2,14 (0,44-10,38)		1 (0,6%)	1,00 (0,12-8,17)	
D	TT vs (CT+CC)	169 (13,7%)	55 (12,8%)	0,93 (0,67-1,29)	<b>0,67</b>	29 (11,7%)	0,83 (0,55-1,27)	<b>0,39</b>	22 (13,3%)	0,97 (0,60-1,57)	<b>0,91</b>	26 (14,5%)	1,07 (0,69-1,68)	<b>0,75</b>
R	(TT+CT) vs CC	7 (0,6%)	3 (0,7%)	1,24 (0,32-4,82)	<b>0,76</b>	2 (0,8%)	1,42 (0,29-6,89)	<b>0,67</b>	2 (1,2%)	2,16 (0,44-10,48)	<b>0,38</b>	1 (0,6%)	0,99 (0,12-8,08)	<b>0,99</b>

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo, TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

En la Tabla 37. **Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los SNP en APC rs454886, rs13167522 y rs17290456** en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones se muestran las frecuencias genotípicas para los SNPs rs454886, rs13167522 y rs1729456 en el gen APC en el grupo control, en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes diagnosticados de trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM) o trastorno bipolar (TB) para el conjunto de la población y en mujeres y hombres por separado.

En el conjunto de la población de pacientes y en el conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, depresión mayor o trastorno bipolar no observamos asociación con el SNP **rs454886** en APC, en ninguno de los modelos estudiados (codominante, dominante y recesivo) ni para el subgrupo de mujeres o varones.

En el caso del SNP **rs13167522** no observamos asociación con ninguna de las patologías para el conjunto de la población. En el grupo de mujeres hay una disminución clara del genotipo CC en todas las patologías, pero no alcanza la significación estadística. En el grupo de los varones, observamos una tendencia a un incremento del riesgo del genotipo homocigótico recesivo CC en el modelo codominante para el conjunto de los varones (OR= 1,77; IC95% = 0,58-5,45; p=0,19), los varones diagnosticados de algún tipo de depresión (OR= 1,78; IC95% = 0,42-6,77; p=0,06), o de depresión mayor tanto en el modelo codominante (OR= 2,70; IC95% = 0,717-10,31; p=0,06) como recesivo (OR= 2,89; IC95% = 0,76-11,00; p=0,15).

Finalmente, en el marcador **rs17290456** (Tabla 37. **Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los SNP en APC rs454886, rs13167522 y rs17290456** en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones) no observamos asociación con ninguna de las patologías en el conjunto de la población, En el subgrupo de varones, encontramos un incremento de riesgo de trastorno bipolar en varones con genotipo CT en el modelo codominante (OR=1,32; p=0,05).

### 5.3.3 AXIN1

Las frecuencias alélicas del SNP rs214250 de *AXIN1* se muestran en la Tabla 38.- **Frecuencias alélicas del SNP rs214250 de *AXIN1*** en los distintos grupos de estudio y en mujeres y varones. Las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y distímias (TDs) y tanto para el conjunto de la población como para las mujeres y los varones. La población control cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg  $p=0,23$  para este SNP.

**Tabla 38.- Frecuencias alélicas del SNP rs214250 de *AXIN1* en los distintos grupos de estudio y en mujeres y varones.**

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TDs N (%)	TB N (%)
<b>AXIN1</b>						
<b>rs214250</b>						
C todos	4595 (79)	2125 (78)	1368 (78)	956(80)	79 (71)	757 (79)
C mujeres	2704 (79)	1456 (79)	969 (78)	689 (79)	59 (72)	487 (80)
C varones	1891 (78)	665 (78)	395 (80)	267 (80)	20 (67)	270 (75)
T todos	1237 (21)	585 (22)	378 (22)	246 (20)	33 (29)	207 (21)
T mujeres	702 (21)	394 (21)	275 (22)	181 (21)	23 (28)	119 (20)
T varones	535 (22)	189 (22)	101 (20)	65 (20)	10 (33)	88 (25)

#### 5.3.3.2 Distribución genotípica del SNP rs214250 en *AXIN1* en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

**Tabla 39.- Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos del SNP rs214250 en *Axin-1*** en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar

<b>AXIN1 rs214250</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	TB	OR (95% CI)	p
CD	CC	1800 (61,7%)	835 (61,6%)	1.00		538 (61,6%)	1.00		382 (63,6%)	1.00		297 (61,6%)	1.00	
	CT	995 (34,1%)	455 (33,6%)	1,03 (0,87-1,22)	<b>0,62</b>	292 (33,5%)	0,98 (0,83-1,15)	<b>0,61</b>	192 (31,9%)	0,91 (0,75-1,10)	<b>0,57</b>	163 (33,8%)	0,99 (0,81-1,22)	<b>0,92</b>
	TT	121 (4,2%)	65 (4,8%)	1,13 (0,75-1,68)		43 (4,9%)	1,19 (0,83-1,71)		27 (4,5%)	1,05 (0,68-1,62)		22 (4,6%)	1,10 (0,69-1,76)	
D	CC vs (CT+TT)	1116 (38,3%)	520 (38,4%)	1,00 (0,88-1,15)	<b>0,95</b>	335 (38,4%)	1,00 (0,86-1,17)	<b>0,96</b>	219 (36,4%)	0,92 (0,77-1,11)	<b>0,40</b>	185 (38,4%)	1,00 (0,82-1,22)	<b>0,96</b>
R	(CC+CT) vs TT	121 (4,2%)	65 (4,8%)	1,16 (0,85-1,58)	<b>0,34</b>	43 (4,9%)	1,20 (0,84-1,71)	<b>0,33</b>	27 (4,5%)	1,09 (0,71-1,66)	<b>0,71</b>	22 (4,6%)	1,10 (0,69-1,76)	<b>0,68</b>
<b>MUJERES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	PD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	TB	OR (95% CI)	p
CD	CC	1069 (62,8%)	572 (61,8%)	1.00		377 (60,6%)	1.00		126 (44,7%)	1.00		195 (64,4%)	1.00	
	CT	566 (33,2%)	312 (33,7%)	0,99 (0,86-1,13)	<b>0,82</b>	215 (34,6%)	1,08 (0,89-1,31)	<b>0,52</b>	132 (46,8%)	1,38 (1,07-1,78)	<b>0,83</b>	97 (32%)	0,94 (0,72-1,22)	<b>0,86</b>
	TT	68 (4,4%)	41 (4,4%)	1,16 (0,85-1,58)		30 (4,8%)	1,25 (0,80-1,95)		24 (8,5%)	1,40 (0,88-2,21)		11 (3,6%)	0,89 (0,46-1,71)	
D	CC vs (CT+TT)	634 (37,2%)	353 (38,2%)	1,04 (0,88-1,23)	<b>0,64</b>	245 (39,4%)	1,10 (0,91-1,32)	<b>0,34</b>	161 (37%)	0,99 (0,80-1,23)	<b>0,93</b>	108 (35,6%)	0,93 (0,72-1,20)	<b>0,60</b>
R	(CC+CT) vs TT	68 (4,4%)	41 (4,4%)	1,12 (0,75-1,66)	<b>0,59</b>	30 (4,8%)	1,22 (0,78-1,89)	<b>0,38</b>	20 (4,6%)	1,16 (0,70-1,93)	<b>0,58</b>	11 (3,6%)	0,91 (0,47-1,73)	<b>0,76</b>
<b>VARONES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	PD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	TB	OR (95% CI)	p
CD	CC	731 (60,3%)	262 (61,4%)	1.00		160 (64,5%)	1.00		108 (65,1%)	1.00		102 (57%)	1.00	
	CT	429 (35,4%)	141 (33%)	0,92 (0,72-1,16)	<b>0,45</b>	75 (30,2%)	0,80 (0,59-1,08)	<b>0,28</b>	51 (30,7%)	0,80 (0,56-1,15)	<b>0,48</b>	66 (36,9%)	1,10 (0,79-1,54)	<b>0,51</b>
	TT	53 (4,4%)	24 (5,6%)	1,26 (0,76-2,09)		13 (5,2%)	1,12 (0,60-2,10)		7 (4,2%)	0,89 (0,40-2,02)		11 (6,2%)	1,49 (0,75-2,94)	
D	CC vs (CT+TT)	482 (39,7%)	165 (38,6%)	0,96 (0,76-1,20)	<b>0,69</b>	88 (35,5%)	0,83 (0,63-1,11)	<b>0,21</b>	58 (34,9%)	0,81 (0,58-1,14)	<b>0,23</b>	77 (43%)	1,14 (0,83-1,57)	<b>0,40</b>
R	(CC+CT) vs TT	53 (4,4%)	24 (5,6%)	1,30 (0,79-2,14)	<b>0,30</b>	13 (5,2%)	1,21 (0,65-2,26)	<b>0,55</b>	7 (4,2%)	0,96 (0,43-2,16)	<b>0,93</b>	11 (6,2%)	1,43 (0,73-2,80)	<b>0,31</b>

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo. TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo **rs214250** de *AXIN1*, se pueden observar en la Tabla 39, en el conjunto de la población y en mujeres y hombres por separado para el grupo

control, en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes diagnosticados de trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM) o trastorno bipolar (TB).

Para el conjunto de la población, los pacientes diagnosticados de depresión, depresión mayor o trastorno bipolar, no observamos ninguna asociación significativa en el SNPs **rs214250** de *AXIN1*.

### 5.3.4 AXIN2

#### 5.3.4.1 Distribución alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP rs3923086 y rs7210356 en AXIN2

Las frecuencias alélicas de los SNPs seleccionados de *AXIN2*, rs3923086 y rs7210356, se muestran en la Tabla 26. Para los SNPs, las frecuencias alélicas se muestran en la Tabla 40. Las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y distímias (TDs) tanto para el conjunto de la población:  $\chi^2 = 5,6$ ; ns para el rs3923086 y  $\chi^2 = 2,4$ ; ns para el rs7210356, como para el subgrupo de mujeres:  $\chi^2 = 7,2$ ; ns para el rs3923086 y  $\chi^2 = 3,1$ ; ns para el rs7210356 y el subgrupo de varones:  $\chi^2 = 7,8$ ; ns para el rs3923086 y  $\chi^2 = 1,1$ ; ns para el rs7210356. La población control cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg para los SNPs rs3923086  $p=0,46$  y rs7210356  $p=0,50$ .

**Tabla 40.- Frecuencias alélicas de los SNP en AXIN2, rs3923086 y rs7210356** incluidos en el estudio en el conjunto de la muestra y en mujeres y varones.

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TB N (%)	TDs N (%)
<b>AXIN2</b>						
<b>rs3923086</b>						
T todos	3160 (54)	1396 (52)	907 (53)	640(54)	489 (51)	53 (47)
T mujeres	1832 (54)	972 (53)	668 (54)	482 (54)	304 (50)	37 (45)
T varones	1328 (54)	423 (50)	238 (49)	158 (49)	185 (50)	16 (53)
G todos	2728 (46)	1286 (48)	817 (47)	544 (46)	469 (49)	59 (53)
G mujeres	1588 (46)	860 (47)	562 (46)	378 (44)	298 (50)	45 (55)
G varones	1140 (46)	421 (50)	250 (51)	166 (51)	171 (48)	14 (47)
<b>rs7210356</b>						
G todos	5300 (90)	2439 (90)	1582 (90)	1085(90)	857 (89)	103 (87)
G mujeres	3072 (90)	1666 (90)	1128 (90)	792 (91)	538 (89)	74 (86)
G varones	2228 (90)	767 (90)	448 (90)	293 (89)	319 (89)	29 (91)
A todos	602 (10)	273 (10)	168 (10)	115 (10)	105 (11)	15 (13)
A mujeres	352 (10)	186 (10)	120 (10)	80 (9)	66 (11)	12 (14)
A varones	250 (10)	87 (10)	48 (10)	35 (11)	39 (11)	3 (9)

GC: grupo control. TP; todos los pacientes; TD: todos los pacientes diagnosticados de trastorno depresivo; TB: trastorno bipolar; TDs: distímias. N: número de casos; (%) porcentaje de pacientes.

#### 5.3.4.2 Distribución genotípica del SNP rs3923086 y rs7210356 en AXIN2 en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

Las frecuencias genotípicas para los polimorfismos de *AXIN2* seleccionados, SNPs rs3923086 y rs7210356, se pueden observar en la Tabla 41, en el conjunto de la población y en mujeres y hombres por separado para el grupo control, en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes diagnosticados de trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM) o trastorno bipolar (TB).

Para el conjunto de la población, los pacientes diagnosticados de depresión mayor o trastorno bipolar, no observamos ninguna asociación significativa en los dos SNPs estudiados en *Axin-2* **rs3923086** y **rs7210356**. En el caso del conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, observamos un incremento significativo de riesgo en el alelo recesivo G del SNP **rs3923086** para los varones en el modelo codominante (OR = 1,49 (1,02-2,18); p=0,08) pero sobre todo en el modelo recesivo (OR= 1,40 (1,02-1,91); p0,04), este incremento del riesgo no se observa en los pacientes diagnosticados con depresión mayor ni para el SNP **rs7210356**.

**Tabla 41.- Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos de los SNP en AXIN2 rs3923086 y rs7210356** en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones

<b>AXIN2 rs3923086</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	TT	838 (28,5%)	365 (27,2%)	1,00		240 (27,8%)	1,00		171 (28,9%)	1,00		125 (26,1%)	1,00	
	GT	1484 (50,4%)	666 (49,7%)	1,03 (0,88-1,20)	0,32	427 (49,5%)	1,00 (0,84-1,20)	0,64	298 (50,3%)	0,98 (0,80-1,21)	0,97	239 (49,9%)	1,08 (0,86-1,36)	0,3
	GG	622 (21,1%)	310 (23,1%)	1,14 (0,95-1,37)		195 (22,6%)	1,09 (0,88-1,36)		123 (20,8%)	0,97 (0,75-1,25)		115 (24%)	1,24 (0,94-1,63)	
D	TT vs (GT+GG)	2106 (71,5%)	976 (72,8%)	1,06 (0,92-1,23)	0,4	622 (72,2%)	1,03 (0,87-1,22)	0,72	421 (71,1%)	0,98 (0,81-1,19)	0,84	354 (73,9%)	1,13 (0,91-1,40)	0,28
R	(TT+GT) vs GG	622 (21,1%)	310 (23,1%)	1,12 (0,96-1,31)	0,14	195 (22,6%)	1,09 (0,91-1,31)	0,35	123 (20,8%)	0,98 (0,79-1,22)	0,85	115 (24%)	1,18 (0,94-1,48)	0,16
<b>MUJERES</b>														
CD	TT	481 (28,1%)	255 (27,2%)	1,00		179 (29,1%)	1,00		131 (30,5%)	1,00		76 (25,2%)	1,00	
	GT	870 (50,9%)	462 (50,4%)	1,00 (0,83-1,21)	0,91	310 (50,4%)	0,96 (0,77-1,19)	0,89	220 (51,2%)	0,93 (0,73-1,18)	0,4	152 (50,5%)	1,11 (0,82-1,49)	0,36
	GG	359 (21%)	199 (21,7%)	1,05 (0,83-1,32)		126 (20,5%)	0,94 (0,72-1,23)		79 (18,4%)	0,81 (0,59-1,10)		73 (24,2%)	1,29 (0,91-1,82)	
D	TT vs (GT+GG)	1229 (71,9%)	661 (72,2%)	1,01 (0,85-1,21)	0,87	436 (70,9%)	0,95 (0,78-1,17)	0,65	299 (69,5%)	0,89 (0,71-1,13)	0,34	225 (74,8%)	1,16 (0,88-1,53)	0,30
R	(TT+GT) vs GG	359 (21%)	199 (21,7%)	1,04 (0,86-1,27)	0,66	126 (20,5%)	0,97 (0,77-1,22)	0,79	79 (18,4%)	0,85 (0,65-1,11)	0,22	73 (24,2%)	1,20 (0,90-1,61)	0,21
<b>VARONES</b>														
CD	TT	357 (28,9%)	110 (26,1%)	1,00		61 (25%)	1,00		40 (24,7%)	1,00		143 (79,9%)	1,00	
	GT	614 (49,8%)	203 (48,1%)	1,07 (0,82-1,40)	0,14	116 (47,5%)	1,11 (0,79-1,55)	0,08	78 (48,1%)	1,13 (0,76-1,70)	0,21	33 (18,4%)	1,02 (0,68-1,53)	0,72
	GG	263 (21,3%)	109 (25,8%)	1,35 (0,99-1,83)		67 (27,5%)	<b>1,49 (1,02-2,18)</b>		44 (27,2%)	1,49 (0,95-2,36)		3 (1,7%)	1,75 (0,49-6,28)	
D	TT vs (GT+GG)	877 (71,1%)	312 (73,9%)	1,15 (0,90-1,48)	0,26	183 (75%)	1,22 (0,89-1,67)	0,21	122 (75,3%)	1,24 (0,85-1,81)	0,25	36 (20,1%)	1,06 (0,72-1,57)	0,78
R	(TT+GT) vs GG	263 (21,3%)	109 (25,8%)	1,29 (0,99-1,66)	0,06	67 (27,5%)	<b>1,40 (1,02-1,91)</b>	<b>0,04</b>	44 (27,2%)	1,38 (0,95-2,00)	0,1	176 (98,3%)	1,00	0,42
<b>rs7210356</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	TDG	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	GG	2383 (80,8%)	1097 (80,9%)	1,00		713 (81,5%)	1,00		490 (81,7%)	1,00		384 (79,8%)	1,00	
	AG	534 (18,1%)	245 (18,1%)	1,00 (0,84-1,18)	0,94	156 (17,8%)	0,98 (0,80-1,19)	0,45	105 (17,5%)	0,96 (0,76-1,20)	0,72	89 (18,5%)	1,03 (0,81-1,33)	0,64
	AA	34 (1,1%)	14 (1%)	0,89 (0,48-1,67)		6 (0,7%)	0,59 (0,25-1,41)		5 (0,8%)	0,72 (0,28-1,84)		8 (1,7%)	1,46 (0,67-3,18)	
D	GG vs (AG+AA)	568 (19,2%)	259 (19,1%)	0,99 (0,84-1,17)	0,91	162 (18,5%)	0,95 (0,79-1,16)	0,63	110 (18,3%)	0,94 (0,75-1,18)	0,6	97 (20,2%)	1,06 (0,83-1,35)	0,64
R	(GG+AG) vs AA	34 (1,1%)	14 (1%)	0,90 (0,48-1,67)	0,73	6 (0,7%)	0,59 (0,25-1,42)	0,21	5 (0,8%)	0,72 (0,28-1,85)	0,48	8 (1,7%)	1,45 (0,67-3,15)	0,37
<b>MUJERES</b>														
CD	GG	1382 (80,7%)	750 (81%)	1,00		509 (81,6%)	1,00		360 (82,6%)	1,00		241 (79,8%)	1,00	
	AG	308 (18%)	166 (17,9%)	0,99 (0,81-1,22)	0,9	110 (17,6%)	0,97 (0,76-1,23)	0,58	72 (16,5%)	0,90 (0,68-1,19)	0,61	56 (18,5%)	1,04 (0,76-1,43)	0,85
	AA	22 (1,3%)	10 (1,1%)	0,84 (0,39-1,78)		5 (0,8%)	0,62 (0,23-1,64)		4 (0,9%)	0,70 (0,24-2,04)		5 (1,7%)	1,30 (0,49-3,47)	
D	GG vs (AG+AA)	330 (19,3%)	176 (19%)	0,98 (0,80-1,20)	0,87	115 (18,4%)	0,95 (0,75-1,20)	0,64	76 (17,4%)	0,88 (0,67-1,16)	0,38	61 (20,2%)	1,06 (0,78-1,44)	0,71
R	(GG+AG) vs AA	22 (1,3%)	10 (1,1%)	0,84 (0,40-1,78)	0,64	5 (0,8%)	0,62 (0,23-1,65)	0,31	4 (0,9%)	0,71 (0,24-2,07)	0,52	5 (1,7%)	1,29 (0,49-3,44)	0,62
<b>VARONES</b>														
CD	GG	1001 (80,8%)	344 (80,6%)	1,00		201 (81%)	1,00		130 (79,3%)	1,00		143 (79,9%)	1,00	
	AG	226 (18,2%)	79 (18,5%)	1,02 (0,77-1,35)	0,99	46 (18,6%)	1,01 (0,71-1,44)	0,63	33 (20,1%)	1,12 (0,75-1,69)	0,76	33 (18,4%)	1,02 (0,68-1,53)	0,72
	AA	12 (1%)	4 (0,9%)	0,97 (0,31-3,03)		1 (0,4%)	0,42 (0,05-3,20)		1 (0,6%)	0,64 (0,08-4,97)		3 (1,7%)	1,75 (0,49-6,28)	
D	GG vs (AG+AA)	238 (19,2%)	83 (19,4%)	1,01 (0,77-1,34)	0,92	47 (18,9%)	0,98 (0,69-1,39)	0,92	34 (20,7%)	1,10 (0,74-1,65)	0,65	36 (20,1%)	1,06 (0,72-1,57)	0,78
R	(GG+AG) vs AA	12 (1%)	4 (0,9%)	0,97 (0,31-3,01)	0,95	1 (0,4%)	0,41 (0,05-3,19)	0,34	1 (0,6%)	0,63 (0,08-4,85)	0,63	3 (1,7%)	1,74 (0,49-6,24)	0,42

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo. TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

## 5.3.5 CTNNB1

**5.3.5.1 Distribución alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP rs2140090, rs3774369, rs3864004, rs3915129, rs4135385, rs4533622, rs6776881 y rs13075993 en CTNNB1**

Las frecuencias alélicas de los SNPs seleccionados para *CTNNB1* se muestran en la tabla 28. Las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y distímias (TDs) tanto para el conjunto de la población: para rs2140090  $\chi^2 = 2,6$ ; ns; rs3774369  $\chi^2 = 4,3$ ; ns; rs3864004  $\chi^2 = 2,8$ ; ns; rs3915129  $\chi^2 = 2,7$ ; ns; rs4135385  $\chi^2 = 6,0$ ; ns; rs4533622  $\chi^2 = 3,1$ ; ns; rs6776881  $\chi^2 = 2,3$ ; ns; y rs13075993  $\chi^2 = 2,1$ ; ns.

**Tabla 42.- Frecuencias alélicas de los SNP en CTNNB1: rs2140090, rs3774369,rs3864004, rs3915129, rs4135385, rs4533622, rs6776881 y rs13075993 incluidos en el estudio en el conjunto de la muestra y en mujeres y varones**

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TDs N (%)	TB N (%)
<b>CTNNB1</b>						
<b>rs2140090</b>						
G todos	3380 (58)	1547 (58)	1003 (59)	698 (60)	69 (59)	544 (57)
G mujeres	1929 (57)	1033 (57)	695 (57)	486 (57)	52 (62)	338 (56)
G varones	1451(59)	510 (61)	304 (63)	212 (67)	17 (53)	206 (58)
T todos	2490 (42)	1119 (42)	707 (41)	472 (40)	47 (41)	412 (43)
T mujeres	1481 (43)	789 (43)	527 (43)	366 (43)	32 (38)	262 (44)
T varones	1009 (41)	328 (39)	178 (37)	106 (33)	15 (47)	150 (42)
<b>rs3774369</b>						
A todos	3508 (60)	1618 (60)	1050 (61)	724 (61)	72 (63)	568 (59)
A mujeres	2008 (59)	1086 (59)	730 (59)	506 (59)	54 (66)	356 (60)
A varones	1500 (61)	528 (63)	316 (65)	218 (68)	18 (56)	212 (59)
G todos	2366 (40)	1141 (40)	672 (39)	456 (39)	42 (37)	388 (41)
G mujeres	1404 (41)	742 (41)	500 (41)	354 (41)	28 (34)	242 (40)
G varones	962 (39)	316 (37)	170 (35)	102 (32)	14 (44)	146 (41)
<b>rs3864004</b>						
G todos	3388 (58)	1554 (58)	1007 (59)	702 (60)	68 (60)	547 857)
G mujeres	1936 (57)	1035 (57)	695 (57)	487 (57)	51 (62)	340 (56)
G varones	1452 (59)	515 (61)	308 (63)	215 (67)	17 (53)	207 (58)
A todos	2488 (42)	1118 (42)	707 (41)	470 (40)	46 (40)	411 (43)
A mujeres	1428 (43)	787 (43)	525 (43)	363 (43)	31 (38)	262 (44)
A varones	1006 (41)	329 (39)	180 (37)	107 (33)	15 (47)	149 (42)
<b>rs3915129</b>						
A todos	3351 (58)	1576 (58)	1029 (59)	714 (59)	70 (60)	547 (57)
A mujeres	1927 (57)	1048 (56)	707 (57)	494 (57)	53 (62)	341 (56)
A varones	1424 (59)	524 (61)	318 (64)	220 (67)	17 (57)	206 (58)
C todos	2473 (42)	1140 (42)	723 (41)	488 (41)	46 (40)	417 (43)
C mujeres	1477 (43)	808 (44)	543 (43)	378 (43)	33 (38)	265 (44)
C varones	996 (41)	330 (39)	178 (36)	110 (33)	13 (43)	150 (42)

Se observa la misma situación para el subgrupo de mujeres: rs2140090  $\chi^2 = 1,0$ ; ns; rs3774369  $\chi^2 = 1,8$ ; ns; rs3864004  $\chi^2 = 1,3$ ; ns; rs3915129  $\chi^2 = 1,0$ ; ns; rs4135385  $\chi^2 = 2,3$ ; ns; rs4533622  $\chi^2 = 1,2$ ; ns; rs6776881  $\chi^2 = 1,0$ ; ns; y rs13075993  $\chi^2 = 11,1$ ; ns. Y para el subgrupo de

varones: rs2140090  $\chi^2 = 10,4$ ; ns; rs3774369  $\chi^2 = 9,9$ ; ns; rs3864004  $\chi^2 = 10,4$ ; ns; rs3915129  $\chi^2 = 12,2$ ; ns; rs4135385  $\chi^2 = 4,9$ ; ns; rs4533622  $\chi^2 = 10,2$ ; ns; rs6776881  $\chi^2 = 11,7$ ; ns; y rs13075993  $\chi^2 = 11,0$ ; ns.

La población control cumple de Hardy-Weinberg para rs3774369  $p=0,1$  y rs4135385  $p=0,33$ ; mientras que se rechaza la H0 para los siguientes locus: rs2140090  $p=0,02$ ; rs3915129  $p=0,03$ ; rs4533622  $p=0,02$ ; rs6776881  $p=0,02$ ; y rs13075993  $p=0,04$ .

Tabla 42.- (continuación)

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TDs N (%)	TB N (%)
<b>rs4135385</b>						
A todos	4501 (77)	2050 (76)	1334 (77)	897 (76)	97 (84)	716 (75)
A mujeres	2608 (77)	1406 (76)	952 (77)	654 (76)	69 (82)	454 (75)
A varones	1893 (77)	641 (76)	379 (77)	243 (75)	28 (88)	262 (74)
G todos	1369 (23)	640 (24)	398 (23)	291 (24)	19 (16)	242 (25)
G mujeres	800 (23)	432 (24)	284 (23)	210 (24)	15 (18)	148 (25)
G varones	569 (23)	205 (24)	111 (23)	81 (25)	4 (12)	94 (26)
<b>rs4533622</b>						
C todos	3374 (57)	1552 (58)	1013 (59)	707 (60)	69 (59)	539 (57)
C mujeres	1924 (56)	1036 (57)	701 (57)	492 (57)	52 (62)	335 (56)
C varones	1450 (59)	512 (61)	308 (63)	215 (66)	17 (53)	204 (57)
A todos	2502 (43)	1128 (42)	715 (41)	479 (40)	47 (41)	413 (43)
A mujeres	1488 (44)	792 (43)	531 (43)	370 (43)	32 (38)	261 (44)
A varones	1014 (41)	334 (39)	182 (37)	109 (34)	15 (47)	152 (43)
<b>rs6776881</b>						
G todos	3374 (58)	1579 (58)	1030 (59)	716 (59)	70 (60)	549 (57)
G mujeres	1942 (57)	1049 (56)	707 (57)	495 (57)	53 (62)	342 (56)
G varones	1432 (59)	526 (61)	319 (64)	221 (67)	17 (57)	207 (58)
A todos	2474 (42)	1141 (42)	724 (41)	490 (41)	46 (40)	417 (43)
A mujeres	1478 (43)	809 (44)	543 (43)	379 (43)	33 (38)	266 (44)
A varones	996 (41)	330 (39)	179 (36)	111 (33)	13 (43)	151 (42)
<b>rs13075993</b>						
G todos	3454 (60)	1629 (60)	1060 (61)	729 (61)	73 (63)	569 (59)
G mujeres	1192 (59)	1088 (59)	732 (59)	505 (58)	56 (65)	356 (59)
G varones	1462 (61)	537 (63)	324 (66)	224 (68)	17 (57)	213 (59)
A todos	2330 (40)	1077 (40)	682 (39)	465 (39)	43 (37)	395 (41)
A mujeres	1392 (41)	760 (41)	510 (41)	361 (42)	30 (35)	250 (41)
A varones	938 (39)	315 (37)	170 (34)	104 (32)	13 (43)	145 (41)

### 5.3.5.2 Distribución genotípica SNP rs2140090, rs3774369, rs3864004, rs3915129, rs4135385, rs4533622, rs6776881 y rs13075993 en CTNNB1 en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

Para el conjunto de la población, y el subgrupo de mujeres, no observamos asociación significativa entre los SNP rs2140090, rs3864004, rs3915129, rs4135385, rs4533622, rs6776881 y rs13075993 en CTNNB1 (Tabla 43a, b, c y d) y los pacientes diagnosticados de depresión, depresión mayor o trastorno bipolar, para ninguno de los modelos estudiados.

**Tabla 43a.- Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos de los SNP en CTNNB1 rs2140090, rs3774369 en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

<b>CTNNB1 rs2140090</b>													
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>													
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)
CD	GG	1004 (34,2%)	452 (33,9%)	1,00		297 (34,7%)	1,00		215 (36,8%)	1,00		155 (32,4%)	1,00
	GT	1372 (46,8%)	643 (48,2%)	1,04 (0,90-1,20)	<b>0,56</b>	409 (47,8%)	1,01 (0,85-1,19)	<b>0,56</b>	268 (45,8%)	0,91 (0,75-1,11)	<b>0,43</b>	234 (49%)	1,10 (0,89-1,37)
	TT	559 (19,1%)	238 (17,9%)	0,95 (0,78-1,14)		149 (17,4%)	0,90 (0,72-1,13)		102 (17,4%)	0,85 (0,66-1,10)		89 (18,6%)	1,03 (0,78-1,37)
D	GG vs (GT+TT)	1931 (65,8%)	881 (66,1%)	1,01 (0,88-1,16)	<b>0,85</b>	558 (65,3%)	0,98 (0,83-1,15)	<b>0,77</b>	370 (63,2%)	0,89 (0,74-1,08)	<b>0,24</b>	323 (67,6%)	1,08 (0,88-1,33)
R	(GG+GT) vs TT	559 (19,1%)	238 (17,9%)	0,92 (0,78-1,09)	<b>0,35</b>	149 (17,4%)	0,90 (0,73-1,09)	<b>0,28</b>	102 (17,4%)	0,90 (0,71-1,13)	<b>0,36</b>	89 (18,6%)	0,97 (0,76-1,25)
<b>MUJERES</b>													
CD	GG	570 (33,4%)	293 (32,2%)	1,00		194 (31,8%)	1,00		140 (32,9%)	1,00		99 (33%)	1,00
	GT	789 (46,3%)	447 (49,1%)	1,10 (0,92-1,32)	<b>0,37</b>	307 (50,2%)	1,14 (0,93-1,41)	<b>0,21</b>	206 (48,4%)	1,06 (0,84-1,35)	<b>0,69</b>	140 (46,7%)	1,02 (0,77-1,35)
	TT	346 (20,3%)	171 (18,8%)	0,96 (0,76-1,21)		110 (18%)	0,93 (0,71-1,22)		80 (18,8%)	0,94 (0,69-1,28)		61 (20,3%)	1,02 (0,72-1,43)
D	GG vs (GT+TT)	1135 (66,6%)	618 (67,8%)	1,06 (0,89-1,26)	<b>0,51</b>	417 (68,2%)	1,08 (0,89-1,32)	<b>0,45</b>	286 (67,1%)	1,03 (0,82-1,29)	<b>0,82</b>	201 (67,6%)	1,02 (0,79-1,32)
R	(GG+GT) vs TT	346 (20,3%)	171 (18,8%)	0,91 (0,74-1,11)	<b>0,35</b>	110 (18%)	0,86 (0,68-1,09)	<b>0,22</b>	80 (18,8%)	0,91 (0,69-1,19)	<b>0,48</b>	61 (20,3%)	1,00 (0,74-1,36)
<b>VARONES</b>													
CD	GG	434 (35,3%)	158 (37,7%)	1,00		102 (42,3%)	1,00		75 (47,2%)	1,00		56 (31,5%)	1,00
	GT	583 (47,4%)	194 (46,3%)	0,91 (0,72-1,17)	<b>0,63</b>	100 (41,5%)	<b>0,73 (0,54-0,99)</b>	<b>0,11</b>	62 (39%)	<b>0,62 (0,43-0,88)</b>	<b>0,015</b>	94 (52,8%)	1,25 (0,88-1,78)
	TT	213 (17,3%)	67 (16%)	0,86 (0,62-1,20)		39 (16,2%)	0,78 (0,52-1,17)		22 (13,8%)	<b>0,60 (0,36-0,99)</b>		28 (15,7%)	1,02 (0,63-1,65)
D	GG vs (GT+TT)	796 (64,7%)	261 (62,3%)	0,90 (0,72-1,13)	<b>0,37</b>	139 (57,7%)	<b>0,74 (0,56-0,98)</b>	<b>0,039</b>	84 (52,8%)	<b>0,61 (0,44-0,85)</b>	<b>0,0039</b>	122 (68,5%)	1,19 (0,85-1,66)
R	(GG+GT) vs TT	213 (17,3%)	67 (16%)	0,91 (0,67-1,23)	<b>0,53</b>	39 (16,2%)	0,92 (0,63-1,34)	<b>0,67</b>	22 (13,8%)	0,77 (0,48-1,23)	<b>0,26</b>	28 (15,7%)	0,89 (0,58-1,37)
<b>rs3774369</b>													
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>													
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	TDG	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)
CD	AA	1069 (36,4%)	485 (36,2%)	1,00		317 (36,8%)	1,00		225 (38,1%)	1,00		168 (35,1%)	1,00
	AG	1370 (46,6%)	648 (48,4%)	1,04 (0,90-1,20)	<b>0,37</b>	416 (48,3%)	1,02 (0,87-1,21)	<b>0,33</b>	274 (46,4%)	0,95 (0,78-1,15)	<b>0,57</b>	232 (48,5%)	1,08 (0,87-1,33)
	GG	498 (17%)	206 (15,4%)	0,91 (0,75-1,11)		128 (14,9%)	0,87 (0,69-1,09)		91 (15,4%)	0,87 (0,67-1,13)		78 (16,3%)	1,00 (0,75-1,33)
D	AA vs (AG+GG)	1868 (63,6%)	854 (63,8%)	1,01 (0,88-1,15)	<b>0,91</b>	544 (63,2%)	0,98 (0,84-1,15)	<b>0,82</b>	365 (61,9%)	0,93 (0,77-1,11)	<b>0,43</b>	310 (64,8%)	1,06 (0,86-1,29)
R	(AA+AG) vs GG	498 (17%)	206 (15,4%)	0,89 (0,75-1,06)	<b>0,20</b>	128 (14,9%)	0,86 (0,69-1,06)	<b>0,14</b>	91 (15,4%)	0,89 (0,70-1,14)	<b>0,36</b>	78 (16,3%)	0,96 (0,74-1,24)
<b>MUJERES</b>													
CD	AA	608 (35,6%)	315 (34,5%)	1,00		206 (33,5%)	1,00		145 (33,7%)	1,00		109 (36,5%)	1,00
	AG	792 (46,4%)	456 (49,9%)	1,11 (0,93-1,33)	<b>0,17</b>	318 (51,7%)	<b>1,19 (0,97-1,45)</b>	<b>0,05</b>	216 (50,2%)	1,14 (0,90-1,45)	<b>0,35</b>	138 (46,1%)	0,97 (0,74-1,28)
	GG	306 (17,9%)	143 (15,7%)	0,90 (0,71-1,15)		91 (14,8%)	<b>0,88 (0,66-1,16)</b>		69 (16,1%)	0,95 (0,69-1,30)		52 (17,4%)	0,95 (0,66-1,36)
D	AA vs (AG+GG)	1098 (64,4%)	599 (65,5%)	1,05 (0,89-1,25)	<b>0,55</b>	409 (66,5%)	1,10 (0,91-1,34)	<b>0,34</b>	285 (66,3%)	1,09 (0,87-1,36)	<b>0,46</b>	190 (63,5%)	0,97 (0,75-1,25)
R	(AA+AG) vs GG	306 (17,9%)	143 (15,7%)	0,85 (0,68-1,05)	<b>0,14</b>	91 (14,8%)	<b>0,79 (0,62-1,02)</b>	<b>0,07</b>	69 (16,1%)	0,87 (0,66-1,16)	<b>0,35</b>	52 (17,4%)	0,96 (0,70-1,33)
<b>VARONES</b>													
CD	AA	461 (37,5%)	169 (40%)	1,00		110 (45,3%)	1,00		80 (50%)	1,00		59 (33%)	1,00
	AG	578 (47%)	190 (45%)	0,90 (0,70-1,14)	<b>0,64</b>	96 (39,5%)	<b>0,70 (0,52-0,94)</b>	<b>0,05</b>	58 (36,2%)	<b>0,58 (0,40-0,83)</b>	<b>0,01</b>	94 (52,5%)	1,27 (0,90-1,80)
	GG	192 (15,6%)	63 (14,9%)	0,90 (0,64-1,25)		37 (15,2%)	<b>0,81 (0,54-1,22)</b>		22 (13,8%)	0,66 (0,40-1,09)		26 (14,5%)	1,06 (0,65-1,73)
D	AA vs (AG+GG)	770 (62,5%)	253 (60%)	0,90 (0,71-1,12)	<b>0,34</b>	133 (54,7%)	<b>0,72 (0,55-0,96)</b>	<b>0,02</b>	80 (50%)	<b>0,60 (0,43-0,83)</b>	<b>0,01</b>	120 (67%)	1,22 (0,87-1,70)
R	(AA+AG) vs GG	192 (15,6%)	63 (14,9%)	0,95 (0,70-1,29)	<b>0,74</b>	37 (15,2%)	0,97 (0,66-1,42)	<b>0,88</b>	22 (13,8%)	0,86 (0,54-1,39)	<b>0,54</b>	26 (14,5%)	0,92 (0,59-1,43)

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo, TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

En varones con diagnóstico de Trastorno Depresivo se observa un genotipo protector en los pacientes heterocigóticos de los SNPs: **rs 2140090** GT (significativo en el modelo dominante OR=0,743; IC95%0,56-0,98; p=0,04); **rs3774369** AG (modelo dominante OR=0,72; IC95%0,52-0,96; p=0,02); **rs3864004** AG (modelo dominante OR=0,75; IC95% 0,57-0,99; p=0,05); **rs3915129** AC (modelo dominante OR=0,71; IC95% 0,54-0,93; p=0,02); **rs6776881** AG (modelo dominante

OR=0,72; IC95% 0,55-0,95; p=0,02) y rs13075993 AG (modelo dominante OR=0,72; IC95% 0,55-0,95; p=0,02).

**Tabla 43 b.- Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos de los SNP en CTNNB1 rs3864004, rs3915129, en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

<b>CTNNB1 rs3864004</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	GG	1008 (34,3%)	456 (34,1%)	1,00		299 (34,9%)	1,00		217 (37%)	1,00		157 (32,8%)	1,00	
	AG	1372 (46,7%)	642 (48%)	1,03 (0,89-1,20)	<b>0,79</b>	409 (47,7%)	1,00 (0,85-1,19)	<b>0,56</b>	268 (45,7%)	0,91 (0,75-1,10)	<b>0,38</b>	233 (48,6%)	1,09 (0,88-1,36)	<b>0,72</b>
	AA	558 (19%) (17,8%)	238 (17,8%)	0,94 (0,78-1,14)		149 (17,4%)	0,90 (0,72-1,12)		101 (17,2%)	0,84 (0,65-1,09)		89 (18,6%)	1,02 (0,77-1,35)	
D	GG vs (AG+AA)	1930 (65,7%)	880 (65,9%)	1,01 (0,88-1,16)	<b>0,91</b>	558 (65,1%)	0,97 (0,83-1,14)	<b>0,75</b>	369 (63%)	0,89 (0,74-1,07)	<b>0,21</b>	322 (67,2%)	1,07 (0,87-1,32)	<b>0,51</b>
R	(GG+AG) vs AA	558 (19%) (20,2%)	238 (17,8%)	0,92 (0,78-1,09)	<b>0,36</b>	149 (17,4%)	0,90 (0,74-1,10)	<b>0,28</b>	101 (17,2%)	0,89 (0,70-1,12)	<b>0,32</b>	89 (18,6%)	0,97 (0,76-1,25)	<b>0,83</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	GG	573 (33,5%)	295 (32,4%)	1,00		195 (32%)	1,00		141 (33,2%)	1,00		100 (33,2%)	1,00	
	AG	790 (46,2%)	445 (48,9%)	1,09 (0,91-1,31)	<b>0,42</b>	305 (50%)	1,13 (0,92-1,40)	<b>0,24</b>	205 (48,2%)	1,05 (0,83-1,34)	<b>0,68</b>	140 (46,5%)	1,02 (0,77-1,34)	<b>0,99</b>
	AA	346 (20,2%)	171 (18,6%)	0,96 (0,76-1,21)		110 (18%)	0,93 (0,71-1,22)		79 (18,6%)	0,93 (0,68-1,26)		61 (20,3%)	1,01 (0,72-1,43)	
D	GG vs (AG+AA)	1136 (66,5%)	616 (67,6%)	1,05 (0,89-1,25)	<b>0,55</b>	415 (68%)	1,07 (0,88-1,31)	<b>0,48</b>	284 (66,8%)	1,02 (0,81-1,27)	<b>0,89</b>	201 (66,8%)	1,01 (0,78-1,31)	<b>0,92</b>
R	(GG+AG) vs AA	346 (20,2%)	171 (18,8%)	0,91 (0,74-1,12)	<b>0,36</b>	110 (18%)	0,87 (0,68-1,10)	<b>0,23</b>	79 (18,6%)	0,90 (0,69-1,18)	<b>0,44</b>	61 (20,3%)	1,00 (0,74-1,36)	<b>0,99</b>
<b>VARONES</b>														
CD	GG	435 (35,4%)	160 (37,9%)	1,00		103 (42,2%)	1,00		76 (47,2%)	1,00		57 (32%)	1,00	
	AG	582 (47,4%)	195 (46,2%)	0,91 (0,71-1,16)	<b>0,61</b>	102 (41,8%)	0,74 (0,55-1,00)	<b>0,13</b>	63 (39,1%)	0,62 (0,43-0,88)	<b>0,01</b>	93 (52,2%)	1,22 (0,86-1,73)	<b>0,47</b>
	AA	212 (17,2%)	67 (15,9%)	0,86 (0,62-1,19)		39 (16%)	0,78 (0,52-1,16)		22 (13,7%)	0,59 (0,36-0,98)		28 (15,7%)	1,01 (0,62-1,63)	
D	GG vs (AG+AA)	794 (64,6%)	262 (62,1%)	0,90 (0,71-1,13)	<b>0,35</b>	141 (57,8%)	0,75 (0,57-0,99)	<b>0,04</b>	85 (52,8%)	0,61 (0,44-0,85)	<b>0,00</b>	121 (68%)	1,16 (0,83-1,63)	<b>0,38</b>
R	(GG+AG) vs AA	212 (17,2%)	67 (15,9%)	0,91 (0,67-1,22)	<b>0,51</b>	39 (16%)	0,91 (0,63-1,33)	<b>0,63</b>	22 (13,7%)	0,76 (0,47-1,22)	<b>0,24</b>	28 (15,7%)	0,90 (0,58-1,38)	<b>0,61</b>
<b>rs3915129</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	TDG	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	AA	993 (34,1%)	457 (33,6%)	1,00		302 (34,5%)	1,00		217 (36,1%)	1,00		155 (32,2%)	1,00	
	AC	1365 (46,9%)	662 (48,8%)	1,05 (0,91-1,22)	<b>0,42</b>	425 (48,5%)	1,02 (0,86-1,21)	<b>0,38</b>	280 (46,6%)	0,94 (0,77-1,14)	<b>0,5</b>	237 (49,2%)	1,11 (0,89-1,38)	<b>0,62</b>
	CC	554 (19%) (17,6%)	239 (17,6%)	0,94 (0,78-1,13)		149 (17%)	0,88 (0,71-1,10)		104 (17,3%)	0,86 (0,67-1,11)		90 (18,7%)	1,04 (0,79-1,38)	
D	AA vs (AC+CC)	1919 (65,9%)	901 (66,3%)	1,02 (0,89-1,17)	<b>0,77</b>	574 (65,5%)	0,98 (0,84-1,15)	<b>0,84</b>	384 (63,9%)	0,92 (0,76-1,10)	<b>0,35</b>	327 (67,8%)	1,09 (0,89-1,34)	<b>0,4</b>
R	(AA+AC) vs CC	554 (19%) (17,6%)	239 (17,6%)	0,91 (0,77-1,07)	<b>0,26</b>	149 (17%)	0,87 (0,71-1,06)	<b>0,18</b>	104 (17,3%)	0,89 (0,71-1,12)	<b>0,32</b>	90 (18,7%)	0,98 (0,76-1,25)	<b>0,85</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	AA	570 (33,5%)	294 (31,7%)	1,00		194 (31%)	1,00		140 (32,1%)	1,00		100 (33%)	1,00	
	AC	787 (46,2%)	460 (49,6%)	1,13 (0,94-1,36)	<b>0,26</b>	319 (51%)	1,19 (0,97-1,47)	<b>0,11</b>	214 (49,1%)	1,11 (0,87-1,41)	<b>0,56</b>	141 (46,5%)	1,02 (0,77-1,35)	<b>0,99</b>
	CC	345 (20,3%)	174 (18,8%)	0,98 (0,78-1,23)		112 (17,9%)	0,95 (0,73-1,25)		82 (18,8%)	0,97 (0,71-1,31)		62 (20,5%)	1,02 (0,73-1,44)	
D	AA vs (AC+CC)	1132 (66,5%)	634 (68,3%)	1,09 (0,92-1,29)	<b>0,34</b>	431 (69%)	1,12 (0,92-1,36)	<b>0,26</b>	296 (67,9%)	1,06 (0,85-1,33)	<b>0,58</b>	203 (67%)	1,02 (0,79-1,33)	<b>0,87</b>
R	(AA+AC) vs CC	345 (20,3%)	174 (18,8%)	0,91 (0,74-1,11)	<b>0,35</b>	112 (17,9%)	0,86 (0,68-1,09)	<b>0,20</b>	82 (18,8%)	0,91 (0,70-1,19)	<b>0,49</b>	62 (20,5%)	1,01 (0,75-1,37)	<b>0,94</b>
<b>VARONES</b>														
CD	AA	423 (35%) (37,9%)	162 (37,9%)	1,00		107 (43,1%)	1,00		77 (46,7%)	1,00		55 (30,7%)	1,00	
	AC	578 (47,8%)	200 (46,8%)	0,90 (0,71-1,15)	<b>0,44</b>	104 (41,9%)	0,71 (0,53-0,96)	<b>0,05</b>	66 (40%)	0,63 (0,44-0,89)	<b>0,01</b>	96 (53,6%)	1,28 (0,90-1,82)	<b>0,34</b>
	CC	209 (17,3%)	65 (15,2%)	0,81 (0,58-1,13)		37 (14,9%)	0,70 (0,46-1,05)		22 (13,3%)	0,58 (0,35-0,96)		28 (15,6%)	1,03 (0,63-1,67)	
D	AA vs (AC+CC)	787 (65%) (62,1%)	265 (62,1%)	0,88 (0,70-1,10)	<b>0,27</b>	141 (56,9%)	0,71 (0,54-0,93)	<b>0,01</b>	88 (53,3%)	0,61 (0,44-0,85)	<b>0,00</b>	124 (69,3%)	1,21 (0,86-1,70)	<b>0,26</b>
R	(AA+AC) vs CC	209 (17,3%)	65 (15,2%)	0,86 (0,64-1,16)	<b>0,33</b>	37 (14,9%)	0,84 (0,57-1,23)	<b>0,36</b>	22 (13,3%)	0,74 (0,46-1,18)	<b>0,19</b>	28 (15,6%)	0,89 (0,58-1,37)	<b>0,58</b>

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo, TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

**Tabla 43 c.- Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos de los SNP en CTNNB1 rs4135385, rs4533622, en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

<b>CTNNB1 rs4135385</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	AA	1735 (59,1%)	780 (58%)	1,00		511 (59%)	1,00		339 (57,1%)	1,00		269 (56,2%)	1,00	
	AG	1031 (35,1%)	490 (36,4%)	1,06 (0,92-1,21)	<b>0,71</b>	312 (36%)	1,03 (0,88-1,21)	<b>0,63</b>	219 (36,9%)	1,09 (0,90-1,31)	<b>0,65</b>	178 (37,2%)	1,11 (0,91-1,37)	<b>0,43</b>
	GG	169 (5,8%)	75 (5,6%)	0,99 (0,74-1,31)		43 (5%)	0,86 (0,61-1,22)		36 (6,1%)	1,09 (0,75-1,59)		32 (6,7%)	1,22 (0,82-1,82)	
D	AA vs (AG+GG)	1200 (40,9%)	565 (42%)	1,05 (0,92-1,19)	<b>0,49</b>	355 (41%)	1,00 (0,86-1,17)	<b>0,96</b>	255 (42,9%)	1,09 (0,91-1,30)	<b>0,36</b>	210 (43,8%)	1,13 (0,93-1,37)	<b>0,22</b>
R	(AA+AG) vs GG	169 (5,8%)	75 (5,6%)	0,97 (0,73-1,28)	<b>0,81</b>	43 (5%)	0,86 (0,61-1,21)	<b>0,37</b>	36 (6,1%)	1,06 (0,73-1,53)	<b>0,77</b>	32 (6,7%)	1,17 (0,79-1,73)	<b>0,43</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	AA	1003 (58,9%)	536 (58,3%)	1,00		363 (58,7%)	1,00		246 (56,9%)	1,00		173 (57,5%)	1,00	
	AG	602 (35,3%)	334 (36,3%)	1,04 (0,88-1,23)	<b>0,80</b>	226 (36,6%)	1,04 (0,85-1,26)	<b>0,53</b>	162 (37,5%)	1,10 (0,88-1,37)	<b>0,700</b>	108 (35,9%)	1,04 (0,80-1,35)	<b>0,82</b>
	GG	99 (5,8%)	49 (5,3%)	0,93 (0,65-1,32)		29 (4,7%)	0,81 (0,53-1,25)		24 (5,6%)	0,99 (0,62-1,58)		20 (6,6%)	1,17 (0,71-1,94)	
D	AA vs (AG+GG)	701 (41,1%)	383 (41,7%)	1,02 (0,87-1,20)	<b>0,79</b>	255 (41,3%)	1,01 (0,83-1,21)	<b>0,96</b>	186 (43,1%)	1,08 (0,87-1,34)	<b>0,47</b>	128 (42,5%)	1,06 (0,83-1,36)	<b>0,65</b>
R	(AA+AG) vs GG	99 (5,8%)	49 (5,3%)	0,91 (0,64-1,30)	<b>0,61</b>	29 (4,7%)	0,80 (0,52-1,22)	<b>0,23</b>	24 (5,6%)	0,95 (0,60-1,51)	<b>0,84</b>	20 (6,6%)	1,15 (0,70-1,90)	<b>0,58</b>
<b>VARONES</b>														
CD	AA	732 (59,5%)	244 (57,7%)	1,00		148 (60,4%)	1,00		93 (57,4%)	1,00		96 (53,9%)	1,00	
	AG	429 (34,9%)	153 (36,2%)	1,07 (0,85-1,35)	<b>0,80</b>	83 (33,9%)	0,96 (0,71-1,28)	<b>0,96</b>	57 (35,2%)	1,05 (0,74-1,48)	<b>0,68</b>	70 (39,3%)	1,24 (0,89-1,73)	<b>0,37</b>
	GG	70 (5,7%)	26 (6,2%)	1,11 (0,69-1,79)		14 (5,7%)	0,99 (0,54-1,80)		12 (7,4%)	1,35 (0,70-2,58)		12 (6,7%)	1,31 (0,68-2,50)	
D	AA vs (AG+GG)	499 (40,5%)	179 (42,3%)	1,08 (0,86-1,35)	<b>0,52</b>	97 (39,6%)	0,96 (0,73-1,27)	<b>0,78</b>	69 (42,6%)	1,09 (0,78-1,52)	<b>0,62</b>	82 (46,1%)	1,25 (0,91-1,72)	<b>0,16</b>
R	(AA+AG) vs GG	70 (5,7%)	26 (6,2%)	1,09 (0,68-1,73)	<b>0,73</b>	14 (5,7%)	1,01 (0,56-1,82)	<b>0,99</b>	12 (7,4%)	1,33 (0,70-2,51)	<b>0,40</b>	12 (6,7%)	1,20 (0,64-2,26)	<b>0,58</b>
<b>rs4533622</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	TDG	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	CC	1000 (34%)	449 (33,5%)	1,00		297 (34,4%)	1,00		215 (36,3%)	1,00		152 (31,9%)	1,00	
	AC	1374 (46,8%)	654 (48,8%)	1,06 (0,92-1,23)	<b>0,37</b>	419 (48,5%)	1,03 (0,87-1,22)	<b>0,37</b>	277 (46,7%)	0,94 (0,77-1,14)	<b>0,38</b>	235 (49,4%)	1,13 (0,90-1,40)	<b>0,55</b>
	AA	564 (19,2%)	237 (17,7%)	0,94 (0,78-1,13)		148 (17,1%)	0,88 (0,71-1,10)		101 (17%)	0,83 (0,64-1,08)		89 (18,7%)	1,04 (0,78-1,38)	
D	CC vs (AC+AA)	1938 (66%)	891 (66,5%)	1,02 (0,89-1,17)	<b>0,73</b>	567 (65,6%)	0,99 (0,84-1,16)	<b>0,85</b>	378 (63,7%)	0,91 (0,75-1,09)	<b>0,30</b>	324 (68,1%)	1,10 (0,89-1,35)	<b>0,37</b>
R	(CC+AC) vs AA	564 (19,2%)	237 (17,7%)	0,90 (0,76-1,07)	<b>0,24</b>	148 (17,1%)	0,87 (0,71-1,06)	<b>0,17</b>	101 (17%)	0,86 (0,68-1,09)	<b>0,21</b>	89 (18,7%)	0,97 (0,76-1,24)	<b>0,80</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	CC	567 (33,2%)	292 (31,9%)	1,00		194 (31,5%)	1,00		140 (32,5%)	1,00		98 (32,9%)	1,00	
	AC	790 (46,3%)	452 (49,5%)	1,11 (0,93-1,33)	<b>0,27</b>	313 (50,8%)	1,16 (0,94-1,43)	<b>0,13</b>	212 (49,2%)	1,09 (0,86-1,38)	<b>0,48</b>	139 (46,6%)	1,02 (0,77-1,35)	<b>0,99</b>
	AA	349 (20,5%)	170 (18,6%)	0,95 (0,75-1,19)		109 (17,7%)	0,91 (0,70-1,20)		79 (18,3%)	0,92 (0,67-1,25)		61 (20,5%)	1,01 (0,72-1,43)	
D	CC vs (AC+AA)	1139 (66,8%)	622 (68%)	1,06 (0,89-1,26)	<b>0,50</b>	422 (68,5%)	1,08 (0,89-1,32)	<b>0,43</b>	291 (67,5%)	1,03 (0,83-1,30)	<b>0,77</b>	200 (67,1%)	1,02 (0,78-1,32)	<b>0,91</b>
R	(CC+AC) vs AA	349 (20,5%)	170 (18,6%)	0,89 (0,72-1,09)	<b>0,25</b>	109 (17,7%)	0,84 (0,66-1,06)	<b>0,14</b>	79 (18,3%)	0,87 (0,67-1,14)	<b>0,32</b>	61 (20,5%)	1,00 (0,74-1,36)	<b>1,00</b>
<b>VARONES</b>														
CD	CC	433 (35,1%)	156 (36,9%)	1,00		102 (41,6%)	1,00		75 (46,3%)	1,00		54 (30,3%)	1,00	
	AC	584 (47,4%)	200 (47,3%)	0,95 (0,75-1,21)	<b>0,69</b>	104 (42,5%)	0,76 (0,56-1,02)	<b>0,16</b>	65 (40,1%)	<b>0,64 (0,45-0,92)</b>	<b>0,02</b>	96 (53,9%)	1,32 (0,92-1,88)	<b>0,26</b>
	AA	215 (17,4%)	67 (15,8%)	0,86 (0,62-1,20)		39 (15,9%)	0,77 (0,51-1,15)		22 (13,6%)	<b>0,59 (0,36-0,98)</b>		28 (15,7%)	1,04 (0,64-1,70)	
D	CC vs (AC+AA)	799 (64,8%)	267 (63,1%)	0,93 (0,74-1,17)	<b>0,52</b>	143 (58,4%)	<b>0,76 (0,57-1,00)</b>	<b>0,05</b>	87 (53,7%)	<b>0,63 (0,45-0,87)</b>	<b>0,00</b>	124 (69,7%)	1,24 (0,89-1,75)	<b>0,20</b>
R	(CC+AC) vs AA	215 (17,4%)	67 (15,8%)	0,89 (0,66-1,20)	<b>0,44</b>	39 (15,9%)	0,90 (0,62-1,30)	<b>0,56</b>	22 (13,6%)	0,74 (0,46-1,19)	<b>0,21</b>	28 (15,7%)	0,88 (0,57-1,36)	<b>0,57</b>

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo, TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

**Tabla 43 d.- Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos de los SNP en CTNNB1 rs6776881 y rs13075993 en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

<b>CTNNB1 rs6776881</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	GG	1003 (34,3%)	458 (33,7%)	1,00		302 (34,4%)	1,00		217 (36%)	1,00		156 (32,3%)	1,00	
	AG	1368 (46,8%)	663 (48,8%)	1,06 (0,92-1,23)	<b>0,41</b>	426 (48,6%)	1,03 (0,87-1,22)	<b>0,4</b>	282 (46,8%)	0,95 (0,78-1,16)	<b>0,56</b>	237 (49,1%)	1,11 (0,90-1,39)	<b>0,62</b>
	AA	553 (18,9%)	239 (17,6%)	0,95 (0,78-1,14)		149 (17%)	0,89 (0,72-1,12)		104 (17,2%)	0,87 (0,67-1,12)		90 (18,6%)	1,05 (0,79-1,38)	
D	GG vs (AG+AA)	1921 (65,7%)	902 (66,3%)	1,03 (0,90-1,18)	<b>0,69</b>	575 (65,6%)	0,99 (0,85-1,17)	<b>0,94</b>	386 (64%)	0,93 (0,77-1,12)	<b>0,43</b>	327 (67,7%)	1,09 (0,89-1,34)	<b>0,39</b>
R	(GG+AG) vs AA	553 (18,9%)	239 (17,6%)	0,91 (0,77-1,08)	<b>0,29</b>	149 (17%)	0,88 (0,72-1,07)	<b>0,19</b>	104 (17,2%)	0,89 (0,71-1,13)	<b>0,34</b>	90 (18,6%)	0,98 (0,77-1,26)	<b>0,88</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	GG	576 (33,7%)	294 (31,6%)	1,00		194 (31%)	1,00		140 (32%)	1,00		100 (32,9%)	1,00	
	AG	790 (46,2%)	461 (49,6%)	1,14 (0,95-1,37)	<b>0,24</b>	319 (51%)	1,20 (0,97-1,48)	<b>0,11</b>	215 (49,2%)	1,12 (0,88-1,42)	<b>0,53</b>	142 (46,7%)	1,04 (0,78-1,37)	<b>0,96</b>
	AA	344 (20,1%)	174 (18,7%)	0,99 (0,79-1,25)		112 (17,9%)	0,97 (0,74-1,26)		82 (18,8%)	0,98 (0,72-1,33)		62 (20,4%)	1,04 (0,74-1,46)	
D	GG vs (AG+AA)	1134 (66,3%)	635 (68,3%)	1,10 (0,92-1,30)	<b>0,29</b>	431 (69%)	1,13 (0,93-1,37)	<b>0,23</b>	297 (68%)	1,08 (0,86-1,35)	<b>0,51</b>	204 (67,1%)	1,04 (0,80-1,34)	<b>0,79</b>
R	(GG+AG) vs AA	344 (20,1%)	174 (18,7%)	0,92 (0,75-1,12)	<b>0,39</b>	112 (17,9%)	0,87 (0,68-1,10)	<b>0,23</b>	82 (18,8%)	0,92 (0,70-1,20)	<b>0,52</b>	62 (20,4%)	1,02 (0,75-1,38)	<b>0,91</b>
<b>VARONES</b>														
CD	GG	427 (35,2%)	163 (38,1%)	1,00		107 (43%)	1,00		77 (46,4%)	1,00		56 (31,3%)	1,00	
	AG	578 (47,6%)	200 (46,7%)	0,91 (0,71-1,15)	<b>0,45</b>	105 (42,2%)	<b>0,72 (0,54-0,98)</b>	<b>0,07</b>	67 (40,4%)	<b>0,64 (0,45-0,91)</b>	<b>0,02</b>	95 (53,1%)	1,25 (0,88-1,78)	<b>0,39</b>
	AA	209 (17,2%)	65 (15,2%)	0,81 (0,58-1,14)		37 (14,9%)	0,71 (0,47-1,06)		22 (13,2%)	<b>0,58 (0,35-0,96)</b>		28 (15,6%)	1,02 (0,63-1,66)	
D	GG vs (AG+AA)	787 (64,8%)	265 (61,9%)	0,88 (0,70-1,11)	<b>0,28</b>	142 (57%)	<b>0,72 (0,55-0,95)</b>	<b>0,016</b>	89 (53,6%)	<b>0,63 (0,45-0,87)</b>	<b>0,005</b>	123 (68,7%)	1,19 (0,85-1,67)	<b>0,3</b>
R	(GG+AG) vs AA	209 (17,2%)	65 (15,2%)	0,86 (0,64-1,17)	<b>0,33</b>	37 (14,9%)	0,84 (0,57-1,23)	<b>0,36</b>	22 (13,2%)	0,73 (0,46-1,18)	<b>0,19</b>	28 (15,6%)	0,89 (0,58-1,37)	<b>0,6</b>
<b>rs13075993</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	TDG	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	GG	1057 (36,5%)	486 (35,9%)	1,00		319 (36,6%)	1,00		226 (37,9%)	1,00		167 (34,6%)	1,00	
	AG	1340 (46,3%)	657 (48,6%)	1,07 (0,92-1,23)	<b>0,29</b>	422 (48,5%)	1,04 (0,88-1,23)	<b>0,27</b>	277 (46,4%)	0,97 (0,80-1,17)	<b>0,67</b>	235 (48,8%)	1,11 (0,90-1,38)	<b>0,61</b>
	AA	495 (17,1%)	210 (15,5%)	0,92 (0,76-1,12)		130 (14,9%)	0,87 (0,69-1,10)		94 (15,8%)	0,89 (0,68-1,16)		80 (16,6%)	1,02 (0,77-1,36)	
D	GG vs (AG+AA)	1835 (63,5%)	867 (64,1%)	1,03 (0,90-1,18)	<b>0,69</b>	552 (63,4%)	1,00 (0,85-1,17)	<b>0,97</b>	371 (62,1%)	0,95 (0,79-1,13)	<b>0,55</b>	315 (65,3%)	1,09 (0,89-1,33)	<b>0,42</b>
R	(GG+AG) vs AA	495 (17,1%)	210 (15,5%)	0,89 (0,75-1,06)	<b>0,19</b>	130 (14,9%)	0,85 (0,69-1,05)	<b>0,12</b>	94 (15,8%)	0,90 (0,71-1,15)	<b>0,41</b>	80 (16,6%)	0,96 (0,74-1,25)	<b>0,78</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	GG	607 (35,9%)	313 (33,9%)	1,00		206 (33,2%)	1,00		145 (33,5%)	1,00		107 (35,3%)	1,00	
	AG	778 (46%)	462 (50%)	1,15 (0,96-1,38)	<b>0,13</b>	320 (51,5%)	1,21 (0,99-1,49)	<b>0,049</b>	215 (49,6%)	1,16 (0,91-1,46)	<b>0,39</b>	142 (46,9%)	1,04 (0,79-1,36)	<b>0,96</b>
	AA	307 (18,1%)	149 (16,1%)	0,94 (0,74-1,19)		95 (15,3%)	0,91 (0,69-1,21)		73 (16,9%)	1,00 (0,73-1,36)		54 (17,8%)	1,00 (0,70-1,42)	
D	GG vs (AG+AA)	1085 (64,1%)	611 (66,1%)	1,09 (0,92-1,29)	<b>0,31</b>	415 (66,8%)	1,13 (0,93-1,37)	<b>0,23</b>	288 (66,5%)	1,11 (0,89-1,39)	<b>0,35</b>	196 (64,7%)	1,02 (0,79-1,32)	<b>0,85</b>
R	(GG+AG) vs AA	307 (18,1%)	149 (16,1%)	0,87 (0,70-1,07)	<b>0,19</b>	95 (15,3%)	0,81 (0,63-1,05)	<b>0,11</b>	73 (16,9%)	0,91 (0,69-1,21)	<b>0,53</b>	54 (17,8%)	0,98 (0,71-1,35)	<b>0,89</b>
<b>VARONES</b>														
CD	AA	450 (37,5%)	172 (40,4%)	1,00		112 (45,3%)	1,00		81 (49,4%)	1,00		60 (33,5%)	1,00	
	AG	562 (46,8%)	193 (45,3%)	0,90 (0,71-1,14)	<b>0,55</b>	100 (40,5%)	<b>0,71 (0,53-0,96)</b>	<b>0,07</b>	62 (37,8%)	<b>0,61 (0,43-0,87)</b>	<b>0,015</b>	93 (52%)	1,24 (0,88-1,76)	<b>0,44</b>
	GG	188 (15,7%)	61 (14,3%)	0,85 (0,61-1,19)		35 (14,2%)	0,75 (0,49-1,13)		21 (12,8%)	0,62 (0,37-1,03)		26 (14,5%)	1,04 (0,64-1,69)	
D	GG vs (AG+AA)	750 (62,5%)	254 (59,6%)	0,89 (0,71-1,11)	<b>0,3</b>	135 (54,7%)	<b>0,72 (0,55-0,95)</b>	<b>0,023</b>	83 (50,6%)	<b>0,61 (0,44-0,85)</b>	<b>0,0037</b>	119 (66,5%)	1,19 (0,85-1,66)	<b>0,3</b>
R	(GG+AG) vs AA	188 (15,7%)	61 (14,3%)	0,90 (0,66-1,23)	<b>0,5</b>	35 (14,2%)	0,89 (0,60-1,31)	<b>0,55</b>	21 (12,8%)	0,79 (0,49-1,28)	<b>0,33</b>	26 (14,5%)	0,91 (0,59-1,43)	<b>0,69</b>

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo, TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

Este efecto protector en varones, se ve acentuado significativamente en la población de hombres con diagnóstico de depresión mayor para los siguientes marcadores: **rs 2140090** alelo T (significativo en el modelo codominante OR= 0,60; IC95% 0,36-0,99; p=0,02 y dominante OR= 0,61; IC95% 0,44-0,85; p=0,001); **rs3774369** alelo G (modelo codominante OR=0,58; IC95% 0,40-0,83; p=0,01 y modelo dominante OR=0,60; IC95% 0,43-0,83; p=0,001); **rs3864004** alelo A (modelo codominante OR=0,62; IC95% 0,36-0,98; p=0,02 y modelo dominante OR=0,61; IC95% 0,44-0,85; p=0,001); **rs3915129** alelo C (modelo codominante OR=0,58; IC95% 0,35-0,96; p=0,01 y modelo dominante OR=0,61; IC95% 0,44-0,85; p=0,001); **rs4533622** alelo A (modelo codominante OR=0,59; IC95% 0,36-0,98; p=0,02 y modelo dominante OR=0,631; IC95% 0,45-0,87; p=0,01); **rs6776881** alelo A (modelo codominante OR=0,58; IC95% 0,35-0,96; p=0,02 y modelo dominante

OR=0,63; IC95% 0,45-0,87; p=0,01) y **rs13075993** alelo G (modelo codominante OR=0,61; IC95% 0,42-0,87; p=0,02 y modelo dominante OR=0,61; IC95% 0,44-0,85; p=0,001). No se observó asociación significativa para el conjunto de varones en el **rs4135385**.

Para el subgrupo de las mujeres solo encontramos una tendencia al incremento de riesgo de depresión con el alelo dominante A del **rs3774369** en el modelo codominante OR=1,19; IC95% 0,97-1,45; p=0,05, por el contrario el alelo recesivo G tiene un efecto protector en el modelo codominante OR=0,88; IC95% 0,66-1,16; p=0,05; como recesivo OR=0,79; IC95% 0,62-1,02; p=0,07

### 5.3.6 DAAM2

#### 5.3.6.1 Distribución alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP rs 3004067 y rs 6937133 en DAAM2

Los SNPs rs3004067 y rs 6937133 pertenecientes al gen *DAAM2* presentan las frecuencias alélicas que se muestran en la Tabla 44. Las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y distímias (TDs) tanto para el conjunto de la población:  $\chi^2 = 1,9$ ; ns para el rs3004067 y  $\chi^2 = 1,1$ ; ns para el rs6937133, como para el subgrupo de mujeres:  $\chi^2 = 3,1$ ; ns para el rs3004067 y  $\chi^2 = 1,9$ ; ns para el rs6937133 y el subgrupo de varones:  $\chi^2 = 1,9$ ; ns para el rs3004067 y  $\chi^2 = 2,9$ ; ns para el rs6937133. La población control cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg p=0,71 para rs3004067 y p=0,59 para rs6937133

**Tabla 44.-** Frecuencias alélicas de los SNP de *DAAM2* rs3004067 y rs13075993 incluidos en el estudio. en el conjunto de la nuestra y en mujeres y varones

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TDs N (%)	TB N (%)
<b>DAAM2</b>						
<b>rs3004067</b>						
C todos	3733 (63)	1687 (63)	1098 (63)	747 (63)	71 (61)	589 (61)
C mujeres	2198 (64)	1151 (63)	779 (63)	540 (62)	50 (60)	372 (62)
C varones	1535 (62)	531 (63)	314 (64)	207 (64)	21 (66)	217 (61)
T todos	2155 (37)	1005 (37)	634 (37)	441 (37)	45 (39)	371 (39)
T mujeres	1226 (36)	689 (37)	459 (37)	326 (38)	34 (40)	230 (38)
T varones	929 (38)	315 (37)	174 (36)	115 (36)	11 (34)	141 (39)
<b>rs6937133</b>						
A todos	4641 (79)	2148 (79)	1389 (79)	950 (79)	93 (79)	759 (79)
A mujeres	2720 (79)	1482 (80)	994 (80)	699 (80)	65 (76)	488 (81)
A varones	1921 (78)	662 (78)	391 (79)	251 (77)	28 (88)	271 (76)
G todos	1261 (21)	562 (21)	361 (21)	250 (21)	25 (21)	201 (21)
G mujeres	708 (21)	370 (20)	254 (20)	173 (20)	21 (24)	116 (19)
G varones	553 (22)	190 (22)	105 (21)	77 (23)	4 (12)	85 (24)

#### 5.3.6.2 Distribución genotípica del SNP rs3004067 y rs6937133 en DAAM2 en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

Las frecuencias genotípicas para los SNPs rs3004067 y rs6937133 de *DAAM2* se presentan en la Tabla 45 tanto para el grupo control, como para el conjunto de los pacientes (TP) y los distintos subgrupos de pacientes diagnosticados de trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM) o trastorno bipolar (TB) para el conjunto de la población y en mujeres y hombres por separado.

En el conjunto de la población de pacientes y en el conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, depresión mayor o trastorno bipolar no observamos asociación con los

SNPs seleccionados de DAAM2, en ninguno de los modelos estudiados (codominante, dominante y recesivo) ni para el subgrupo de mujeres o varones.

**Tabla 45 Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos de los SNP en DAAM2 rs3004067 y rs6937133 en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

<b>DAAM2 rs3004067</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	CC	1188 (40,4%)	521 (38,7%)	1,00		347 (40,1%)	1,00		233 (39,2%)	1,00		174 (36,2%)	1,00	<b>0.2</b>
	CT	1357 (46,1%)	645 (47,9%)	1,08 (0,94-1,25)	<b>0.52</b>	404 (46,6%)	1,02 (0,87-1,20)	<b>0.95</b>	281 (47,3%)	1,06 (0,87-1,28)	<b>0.85</b>	241 (50,2%)	1,21 (0,98-1,50)	
	TT	399 (13,6%)	180 (13,4%)	1,03 (0,84-1,26)		115 (13,3%)	0,99 (0,78-1,25)		80 (13,5%)	1,02 (0,77-1,35)		65 (13,5%)	1,11 (0,82-1,51)	
D	CC vs (CT+TT)	1756 (59,6%)	825 (61,3%)	1,07 (0,94-1,22)	<b>0.31</b>	519 (59,9%)	1,01 (0,87-1,18)	<b>0.88</b>	361 (60,8%)	1,05 (0,88-1,26)	<b>0.61</b>	306 (63,8%)	1,19 (0,97-1,45)	<b>0.08</b>
R	(CC+CT) vs TT	399 (13,6%)	180 (13,4%)	0,98 (0,81-1,19)	<b>0.87</b>	115 (13,3%)	0,98 (0,78-1,22)	<b>0.84</b>	80 (13,5%)	0,99 (0,77-1,29)	<b>0.96</b>	65 (13,5%)	1,00 (0,75-1,32)	<b>0.99</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	CC	702 (41%)	349 (37,9%)	1,00		240 (38,8%)	1,00		167 (38,6%)	1,00		109 (36,2%)	1,00	<b>0.26</b>
	CT	794 (46,4%)	453 (49,2%)	1,15 (0,97-1,36)	<b>0.29</b>	299 (48,3%)	1,10 (0,90-1,34)	<b>0.62</b>	206 (47,6%)	1,09 (0,87-1,37)	<b>0.60</b>	154 (51,2%)	1,25 (0,96-1,63)	
	TT	216 (12,6%)	118 (12,8%)	1,10 (0,85-1,42)		80 (12,9%)	1,08 (0,81-1,46)		60 (13,9%)	1,17 (0,84-1,63)		38 (12,6%)	1,13 (0,76-1,69)	
D	CC vs (CT+TT)	1010 (59%)	571 (61,2%)	1,14 (0,96-1,34)	<b>0.12</b>	379 (61,2%)	1,10 (0,91-1,32)	<b>0.33</b>	266 (61,4%)	1,11 (0,89-1,37)	<b>0.36</b>	192 (63,8%)	1,22 (0,95-1,58)	<b>0.12</b>
R	(CC+CT) vs TT	216 (12,6%)	118 (12,8%)	1,02 (0,80-1,30)	<b>0.88</b>	80 (12,9%)	1,03 (0,78-1,35)	<b>0.84</b>	60 (13,9%)	1,11 (0,82-1,52)	<b>0.49</b>	38 (12,6%)	1,00 (0,69-1,45)	<b>1.00</b>
<b>VARONES</b>														
CD	TT	486 (39,5%)	170 (40,2%)	1,00		105 (43%)	1,00		66 (41%)	1,00		65 (36,3%)	1,00	<b>0.71</b>
	CT	563 (45,7%)	191 (45,1%)	0,97 (0,76-1,23)	<b>0.96</b>	104 (42,6%)	0,86 (0,64-1,15)	<b>0.57</b>	75 (46,6%)	0,98 (0,69-1,40)	<b>0.70</b>	87 (48,6%)	1,16 (0,82-1,63)	
	CC	183 (14,8%)	62 (14,7%)	0,97 (0,69-1,36)		35 (14,3%)	0,89 (0,58-1,35)		20 (12,4%)	0,80 (0,47-1,36)		27 (15,1%)	1,10 (0,68-1,78)	
D	CC vs (CT+TT)	746 (60,5%)	253 (59,8%)	0,97 (0,77-1,21)	<b>0.79</b>	139 (57%)	0,86 (0,65-1,14)	<b>0.30</b>	95 (59%)	0,94 (0,67-1,31)	<b>0.71</b>	114 (63,7%)	1,14 (0,83-1,58)	<b>0.42</b>
R	(CC+CT) vs TT	183 (14,8%)	62 (14,7%)	0,98 (0,72-1,34)	<b>0.92</b>	35 (14,3%)	0,96 (0,65-1,42)	<b>0.84</b>	20 (12,4%)	0,81 (0,50-1,33)	<b>0.4</b>	27 (15,1%)	1,02 (0,66-1,58)	<b>0.94</b>
<b>rs6937133</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	TDG	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	AA	486 (39,5%)	170 (40,2%)	1,00		105 (43%)	1,00		66 (41%)	1,00		65 (36,3%)	1,00	<b>0.71</b>
	AG	563 (45,7%)	191 (45,1%)	0,97 (0,76-1,23)	<b>0.96</b>	104 (42,6%)	0,86 (0,64-1,15)	<b>0.57</b>	75 (46,6%)	0,98 (0,69-1,40)	<b>0.70</b>	87 (48,6%)	1,16 (0,82-1,63)	
	GG	183 (14,8%)	62 (14,7%)	0,97 (0,69-1,36)		35 (14,3%)	0,89 (0,58-1,35)		20 (12,4%)	0,80 (0,47-1,36)		27 (15,1%)	1,10 (0,68-1,78)	
D	AA vs (AG+GG)	746 (60,5%)	253 (59,8%)	0,97 (0,77-1,21)	<b>0.79</b>	139 (57%)	0,86 (0,65-1,14)	<b>0.30</b>	95 (59%)	0,94 (0,67-1,31)	<b>0.71</b>	114 (63,7%)	1,14 (0,83-1,58)	<b>0.42</b>
R	(AA+AG) vs GG	183 (14,8%)	62 (14,7%)	0,98 (0,72-1,34)	<b>0.92</b>	35 (14,3%)	0,96 (0,65-1,42)	<b>0.84</b>	20 (12,4%)	0,81 (0,50-1,33)	<b>0.4</b>	27 (15,1%)	1,02 (0,66-1,58)	<b>0.94</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	AA	1073 (62,6%)	590 (63,7%)	1,00		395 (63,3%)	1,00		278 (63,8%)	1,00		195 (64,6%)	1,00	<b>0.65</b>
	AG	574 (33,5%)	302 (32,6%)	0,96 (0,81-1,14)	<b>0.84</b>	204 (32,7%)	0,97 (0,79-1,18)	<b>0.94</b>	143 (32,8%)	0,96 (0,77-1,21)	<b>0.85</b>	98 (32,5%)	0,94 (0,72-1,22)	
	GG	67 (3,9%)	34 (3,7%)	0,92 (0,60-1,41)		25 (4%)	1,01 (0,63-1,63)		15 (3,4%)	0,86 (0,49-1,54)		9 (3%)	0,74 (0,36-1,51)	
D	AA vs (AG+GG)	641 (37,4%)	336 (36,3%)	0,95 (0,81-1,13)	<b>0.57</b>	229 (36,7%)	0,97 (0,80-1,17)	<b>0.76</b>	158 (36,2%)	0,95 (0,76-1,18)	<b>0.65</b>	107 (35,4%)	0,92 (0,71-1,19)	<b>0.51</b>
R	(AA+AG) vs GG	67 (3,9%)	34 (3,7%)	0,94 (0,62-1,43)	<b>0.76</b>	25 (4%)	1,03 (0,64-1,64)	<b>0.91</b>	15 (3,4%)	0,88 (0,50-1,55)	<b>0.64</b>	9 (3%)	0,76 (0,37-1,53)	<b>0.42</b>
<b>VARONES</b>														
CD	AA	758 (61,3%)	254 (59,6%)	1,00		152 (61,3%)	1,00		94 (57,3%)	1,00		102 (57,3%)	1,00	<b>0.42</b>
	AG	405 (32,7%)	154 (36,1%)	1,13 (0,90-1,43)	<b>0.21</b>	87 (35,1%)	1,07 (0,80-1,43)	<b>0.27</b>	63 (38,4%)	1,25 (0,89-1,76)	<b>0.28</b>	67 (37,6%)	1,23 (0,88-1,71)	
	GG	74 (6%)	18 (4,2%)	0,73 (0,43-1,24)		9 (3,6%)	0,61 (0,30-1,24)		7 (4,3%)	0,76 (0,34-1,70)		9 (5,1%)	0,90 (0,44-1,86)	
D	AA vs (AG+GG)	479 (38,7%)	172 (40,4%)	1,07 (0,86-1,34)	<b>0.55</b>	96 (38,7%)	1,00 (0,76-1,32)	<b>1.00</b>	70 (42,7%)	1,18 (0,85-1,64)	<b>0.33</b>	76 (42,7%)	1,18 (0,86-1,62)	<b>0.31</b>
R	(AA+AG) vs GG	74 (6%)	18 (4,2%)	0,69 (0,41-1,17)	<b>0.16</b>	9 (3,6%)	0,59 (0,29-1,20)	<b>0.12</b>	7 (4,3%)	0,70 (0,32-1,55)	<b>0.36</b>	9 (5,1%)	0,84 (0,41-1,70)	<b>0.62</b>

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo. TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

### 5.3.7 DKK4

#### 5.3.7.1 Distribución alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP rs2073665 en DKK4

Las frecuencias alélicas del SNP rs2073665 en *DKK4* se muestran en la Tabla 46. Las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y distímias (TDs) tanto para el conjunto de la población:  $\chi^2 = 4,4$ ; ns, como para el subgrupo de mujeres:  $\chi^2 = 8,5$ ; ns y el subgrupo de varones:  $\chi^2 = 1,7$ ; ns. La población control no cumple la H0 del equilibrio de Hardy-Weinberg  $p=0,07$  para este locus.

**Tabla 46.- Frecuencias alélicas del SNP de *DKK4* rs2073665 incluido en el estudio en el conjunto de la muestra de mujeres y varones**

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TDs N (%)	TB N (%)
<b>DKK4</b>						
<b>rs2073665</b>						
T todos	5427 (93)	2510 (92)	1614 (92)	1102 (92)	103 (89)	896 (93)
T mujeres	3172 (93)	1710 (92)	1143 (92)	789 (91)	75 (87)	567 (93)
T varones	2255 (93)	794 (93)	465 (93)	313 (94)	28 (93)	329 (92)
C todos	425 (7)	208 (8)	138 (8)	100 (8)	13 (11)	70 (7)
C mujeres	250 (7)	146 (8)	105 (8)	81 (9)	11 (13)	41 (7)
C varones	175 (7)	62 (7)	33 (7)	19 (6)	2 (7)	29 (8)

#### 5.3.7.2 Distribución genotípica del SNP rs2073665 en DKK4 en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

Las frecuencias genotípicas del SPN de *DKK4* rs2073665 en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) en el conjunto de la población y en mujeres y hombres por separado se muestran en la Tabla 47.

En el conjunto de la población o en el subgrupo de varones no observamos asociación en el conjunto de pacientes, pacientes y en el conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, con el polimorfismo seleccionado de *DKK4*, en ninguno de los modelos estudiados (codominante, dominante y recesivo).

En el subgrupo de mujeres diagnosticadas de depresión mayor, se puede observar un incremento del riesgo en los portadores del alelo C en el rs2073665 que no llega a ser significativo en el modelo codominante (OR=1,37; IC95% = 1,03-1,82;  $p=0,11$ ), pero si en el modelo dominante TT (OR=1,35; IC95% = 1,02-1,79;  $p=0,03$ ).

**Tabla 47 Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos de los SNP en *DKK4* rs3004067 y rs6937133 en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

<b>DKK4 rs2073665</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	TT	2523 (86,2%)	1158 (85,2%)	1,00		743 (84,8%)	1,00		505 (84%)	1,00		415 (85,9%)	1,00	
	CT	381 (13%)	194 (14,3%)	1,11 (0,92-1,34)	<b>0,37</b>	128 (14,6%)	1,14 (0,92-1,42)	<b>0,42</b>	92 (15,3%)	1,21 (0,94-1,54)	<b>0,33</b>	66 (13,7%)	1,05 (0,80-1,40)	<b>0,64</b>
	CC	22 (0,8%)	7 (0,5%)	0,69 (0,30-1,63)		5 (0,6%)	0,77 (0,29-2,04)		4 (0,7%)	0,91 (0,31-2,65)		2 (0,4%)	0,55 (0,13-2,36)	
D	TT vs (CT+CC)	403 (13,8%)	201 (14,8%)	1,09 (0,90-1,30)	<b>0,37</b>	133 (15,2%)	1,12 (0,91-1,39)	<b>0,3</b>	96 (16%)	1,19 (0,93-1,52)	<b>0,86</b>	68 (14,1%)	1,03 (0,78-1,35)	<b>0,86</b>
R	(TT+CT) vs CC	22 (0,8%)	7 (0,5%)	0,68 (0,29-1,60)	<b>0,37</b>	5 (0,6%)	0,76 (0,29-2,01)	<b>0,57</b>	4 (0,7%)	0,88 (0,30-2,58)	<b>0,82</b>	2 (0,4%)	0,55 (0,13-2,34)	<b>0,38</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	TT	1473 (86,1%)	787 (84,8%)	1,00		522 (83,7%)	1,00		357 (82,1%)	1,00		265 (87,2%)	1,00	
	CT	226 (13,2%)	136 (14,7%)	1,13 (0,90-1,42)	<b>0,53</b>	99 (15,9%)	1,24 (0,96-1,60)	<b>0,23</b>	75 (17,2%)	<b>1,37 (1,03-1,82)</b>	<b>0,11</b>	37 (12,2%)	0,91 (0,63-1,32)	<b>0,88</b>
	CC	12 (0,7%)	5 (0,5%)	0,78 (0,27-2,22)		3 (0,5%)	0,71 (0,20-2,51)		3 (0,7%)	1,03 (0,29-3,67)		2 (0,7%)	0,93 (0,21-4,16)	
D	TT vs (CT+CC)	238 (13,9%)	141 (15,2%)	1,11 (0,88-1,39)	<b>0,37</b>	102 (16,4%)	1,21 (0,94-1,56)	<b>0,14</b>	78 (17,9%)	<b>1,35 (1,02-1,79)</b>	<b>0,03</b>	39 (12,8%)	0,91 (0,63-1,31)	<b>0,61</b>
R	(TT+CT) vs CC	12 (0,7%)	5 (0,5%)	0,77 (0,27-2,18)	<b>0,61</b>	3 (0,5%)	0,68 (0,19-2,43)	<b>0,54</b>	3 (0,7%)	0,98 (0,28-3,50)	<b>0,98</b>	2 (0,7%)	0,94 (0,21-4,21)	<b>0,93</b>
<b>VARONES</b>														
CD	TT	1050 (86,4%)	368 (86%)	1,00		218 (87,5%)	1,00		148 (89,2%)	1,00		150 (83,8%)	1,00	
	CT	155 (12,8%)	58 (13,6%)	1,07 (0,77-1,48)	<b>0,68</b>	29 (11,7%)	0,90 (0,59-1,37)	<b>0,89</b>	17 (10,2%)	0,78 (0,46-1,32)	<b>0,6</b>	29 (16,2%)	1,31 (0,85-2,02)	<b>0,12</b>
	CC	10 (0,8%)	2 (0,5%)	0,57 (0,12-2,62)		2 (0,8%)	0,96 (0,21-4,43)		1 (0,6%)	0,71 (0,09-5,58)		0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	
D	TT vs (CT+CC)	165 (13,6%)	60 (14%)	1,04 (0,75-1,43)	<b>0,82</b>	31 (12,4%)	0,90 (0,60-1,36)	<b>0,63</b>	18 (10,8%)	0,77 (0,46-1,30)	<b>0,32</b>	29 (16,2%)	1,23 (0,80-1,89)	<b>0,35</b>
R	(TT+CT) vs CC	10 (0,8%)	2 (0,5%)	0,57 (0,12-2,59)	<b>0,44</b>	2 (0,8%)	0,98 (0,21-4,48)	<b>0,97</b>	1 (0,6%)	0,73 (0,09-5,74)	<b>0,76</b>	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	<b>0,09</b>

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo. TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar.

### 5.3.8 FZD3

#### 5.3.8.1 Distribución alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP rs12630592 en FZD3

Las frecuencias alélicas del SNP rs352203 en *FZD3*, se muestran en la Tabla 48. Las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y distímias (TDs) tanto para el conjunto de la población:  $\chi^2 = 4,8$ ; ns, como para el subgrupo de mujeres:  $\chi^2 = 3,7$ ; ns y el subgrupo de varones:  $\chi^2 = 1,8$ ; ns. La población control no cumple la H0 de equilibrio de Hardy-Weinberg  $p=0,004$  este locus

**Tabla 48.- Frecuencias alélicas del SNP rs352203 de *FZD3* incluido en el estudio en el conjunto de la muestra y en mujeres y varones.**

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TDs N (%)	TB N (%)
<b>FZD3</b>						
<b>rs12630592</b>						
T todos	3258 (58)	1373 (58)	871 (57)	611 (60)	60 (52)	502 (59)
T mujeres	1900 (58)	950 (59)	627 (58)	448 (61)	45 (52)	323 (60)
T varones	1358 (58)	420 (57)	241 (56)	163 (59)	15 (50)	179 (58)
C todos	2374 (42)	993 (42)	647 (43)	403 (40)	56 (48)	346 (41)
C mujeres	1384 (42)	672 (41)	453 (42)	290 (39)	41 (48)	219 (40)
C varones	990 (42)	318 (43)	191 (44)	113 (41)	15 (50)	127 (42)

#### 5.3.8.2 Distribución genotípica del SNP rs12630592 en FZD3 en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

**Tabla 49.- Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos de los SNP en *FZD3* rs3004067 y rs6937133 en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

<b>FZD3 rs352203</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	TT	980 (34,8%)	427 (36,1%)	1.00		261 (34,4%)	1.00		189 (37,3%)	1.00		166 (39,1%)	1.00	
	CT	1298 (46,1%)	519 (43,9%)	0,92 (0,79-1,07)	<b>0.43</b>	349 (46%)	1,01 (0,84-1,21)	<b>0.94</b>	233 (46%)	0,93 (0,76-1,15)	<b>0.36</b>	170 (40,1%)	<b>0,77 (0,61-0,97)</b>	<b>0.06</b>
	CC	538 (19,1%)	237 (20%)	1,01 (0,84-1,22)		149 (19,6%)	1,04 (0,83-1,30)		85 (16,8%)	0,82 (0,62-1,08)		88 (20,8%)	0,97 (0,73-1,28)	
D	TT vs (CT+CC)	1836 (65,2%)	756 (63,9%)	0,95 (0,82-1,09)	<b>0.43</b>	498 (65,6%)	1,02 (0,86-1,21)	<b>0.83</b>	318 (62,7%)	0,90 (0,74-1,09)	<b>0.28</b>	258 (60,9%)	<b>0,83 (0,67-1,02)</b>	<b>0.08</b>
R	(TT+CT) vs CC	538 (19,1%)	237 (20%)	1,06 (0,89-1,26)	<b>0.5</b>	149 (19,6%)	1,03 (0,84-1,27)	<b>0.74</b>	85 (16,8%)	0,85 (0,66-1,10)	<b>0.21</b>	88 (20,8%)	1,11 (0,86-1,43)	<b>0.43</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	TT	579 (35,3%)	297 (36,6%)	1.00		188 (34,8%)	1.00		139 (37,7%)	1.00		109 (40,2%)	1.00	
	CT	742 (45,2%)	356 (43,9%)	0,94 (0,77-1,13)	<b>0.78</b>	251 (46,5%)	1,04 (0,84-1,31)	<b>0.85</b>	170 (46,1%)	0,95 (0,74-1,22)	<b>0.31</b>	105 (38,8%)	0,75 (0,56-1,00)	<b>0.13</b>
	CC	321 (19,6%)	158 (19,5%)	0,96 (0,76-1,22)		101 (18,7%)	0,97 (0,73-1,28)		60 (16,3%)	0,78 (0,56-1,09)		57 (21%)	0,94 (0,67-1,34)	
D	TT vs (CT+CC)	1063 (64,7%)	514 (63,4%)	0,94 (0,79-1,12)	<b>0.51</b>	352 (65,2%)	1,02 (0,83-1,25)	<b>0.85</b>	230 (62,3%)	0,90 (0,71-1,14)	<b>0.38</b>	162 (59,8%)	0,81 (0,62-1,05)	<b>0.12</b>
R	(TT+CT) vs CC	321 (19,6%)	158 (19,5%)	1,00 (0,81-1,23)	<b>0.97</b>	101 (18,7%)	0,95 (0,74-1,21)	<b>0.67</b>	60 (16,3%)	0,80 (0,59-1,08)	<b>0.14</b>	57 (21%)	1,10 (0,80-1,50)	<b>0.57</b>
<b>VARONES</b>														
CD	TT	401 (34,2%)	130 (35,2%)	1.00		73 (33,8%)	1.00		50 (36,2%)	1.00		57 (37,2%)	1.00	
	CT	556 (47,4%)	160 (43,4%)	0,89 (0,68-1,16)	<b>32</b>	95 (44%)	0,94 (0,67-1,31)	<b>0.42</b>	63 (45,6%)	0,91 (0,61-1,35)	<b>0.89</b>	65 (42,5%)	0,82 (0,56-1,20)	<b>0.52</b>
	CC	217 (18,5%)	79 (21,4%)	1,12 (0,81-1,55)		48 (22,2%)	1,22 (0,81-1,81)		25 (18,1%)	0,92 (0,56-1,54)		31 (20,3%)	1,01 (0,63-1,60)	
D	TT vs (CT+CC)	773 (65,8%)	239 (64,8%)	0,95 (0,75-1,22)	<b>0.71</b>	143 (66,2%)	1,02 (0,75-1,38)	<b>0.92</b>	88 (63,8%)	0,91 (0,63-1,32)	<b>0.63</b>	96 (62,8%)	0,87 (0,62-1,24)	<b>0.45</b>
R	(TT+CT) vs CC	217 (18,5%)	79 (21,4%)	1,20 (0,90-1,60)	<b>0.22</b>	48 (22,2%)	1,26 (0,89-1,79)	<b>0.21</b>	25 (18,1%)	0,98 (0,62-1,54)	<b>0.92</b>	31 (20,3%)	1,12 (0,74-1,71)	<b>0.60</b>

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo. TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

Las frecuencias genotípicas para el SNP rs352203 de *FZD3* se presentan en la Tabla 49, estas frecuencias corresponden al grupo control (GC), el conjunto de los pacientes (TP) y los distintos subgrupos de pacientes diagnosticados de trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM) o trastorno bipolar (TB) para el conjunto de la población y en mujeres y hombres por separado.

En el conjunto de la población de pacientes y en el conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, depresión mayor o trastorno bipolar no observamos asociación con el SNP rs352203 de *FZD3*, en ninguno de los modelos estudiados (codominante, dominante y recesivo) ni para el subgrupo de mujeres o varones. Se observa una tendencia a efecto protector del alelo C en el conjunto de todos los pacientes diagnosticados de trastorno bipolar, que no llega a ser estadísticamente significativo, (OR=0,77; IC95% = 0,61-0,97; p=0,07 perteneciente al modelo codominante y OR=0,83; IC95% = 0,67-1,02; p=0,08 en el modelo dominante).

### 5.3.9 GSK3 $\beta$

#### 5.3.9.1 Distribución alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP rs6438552 y rs12630592 en GSK3 $\beta$

Para los SNPs seleccionados de *GSK3 $\beta$* , rs6438552 y rs12630592, las frecuencias alélicas se muestran en la

**Tabla 50.**- Frecuencias alélicas en el conjunto de los pacientes y en mujeres y varones de los SNP rs6438552 y rs12630592 de GSK3B incluidos en el estudio

. Las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y distímias (TDs) tanto para el conjunto de la población:  $\chi^2 = 8,4$ ; ns para el rs6438552 y  $\chi^2 = 6,6$ ; ns para el rs12630592, como para el subgrupo de mujeres:  $\chi^2 = 6,7$ ; ns para el rs6438552 y  $\chi^2 = 5,6$ ; ns para el rs12630592 y el subgrupo de varones:  $\chi^2 = 7,7$ ; ns para el rs6438552 y  $\chi^2 = 5,2$ ; ns para el rs12630592. La población control no cumple la H0 de equilibrio de Hardy-Weinberg  $p=0,02$  para el SNP rs6438552 y  $p=0,03$  para el SNP rs12630592.

**Tabla 50.-** Frecuencias alélicas en el conjunto de los pacientes y en mujeres y varones de los SNP rs6438552 y rs12630 de GSK3B incluidos en el estudio

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TDs N (%)	TB N (%)
<b>GSK3B</b>						
<b>rs6438552</b>						
A todos	3272 (59)	1523 (57)	983 (57)	659 (56)	68 (59)	540 (56)
A mujeres	1926 (59)	1033 (56)	694 (57)	481 (56)	46 (53)	399 (56)
A varones	1346 (60)	486 (58)	285 (58)	178 (55)	22 (73)	201 (57)
G todos	2256 (41)	1157 (43)	741 (43)	521 (44)	48 (41)	416 (44)
G mujeres	1348 (41)	797 (44)	534 (43)	373 (44)	40 (47)	263 (44)
G varones	908 (40)	358 (42)	205 (42)	148 (45)	8 (27)	153 (43)
<b>rs12630592</b>						
G todos	3566 (61)	1589 (59)	1024 (59)	689 (57)	71 (60)	565 (59)
G mujeres	2070 (61)	1076 (58)	723 (58)	504 (58)	47 (55)	353 (59)
G varones	1496 (61)	509 (60)	297 (60)	185 (56)	24 (75)	212 (60)
T todos	2318 (39)	1117 (41)	726 (41)	511 (43)	47 (40)	391 (41)
T mujeres	1350 (39)	774 (42)	525 (42)	368 (42)	39 (45)	249 (41)
T varones	968 (39)	341 (40)	199 (40)	143 (44)	8 (25)	142 (40)

### 5.3.9.2 Distribución genotípica del SNP rs6438552 y rs12630592 en GSK3 $\beta$ en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

En la

**Tabla 51.- Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos de los SNP en *GSK3β* rs3004067 y rs6937133 en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

se muestran las frecuencias genotípicas para los SPNs rs6438552 y rs12630592 de *GSK3β* en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) en el conjunto de la población y en mujeres y hombres por separado.

En el total de pacientes se observa un incremento de riesgo del genotipo heterocigoto AG y GT en los dos SNPs seleccionados tanto en el modelo codominante (OR=1,20; IC95% = 1,04-1,39; p=0,04 para **rs6439552** y OR=1,22; IC95% = 1,05-1,40; p=0,03 para **rs12630592**). En el modelo dominante este incremento de riesgo se acentúa para ambos SNPs: **rs6439552** (OR=1,19; IC95% = 1,04-1,37; p=0,01) y **rs12630592** (OR=1,19; IC95% = 1,04-1,36; p=0,01), el efecto es por tanto dependiente de los alelos G y T respectivamente para el **rs6439552** y para el **rs12630592**.

En el conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, se observa también un incremento de riesgo del genotipo heterocigoto AG y GT para ambos SNPs de *GSK3β*, tanto en el modelo codominante **rs6439552** AG (OR=1,22; IC95% = 1,03-1,45; p=0,07) y **rs12630592** GT (OR=1,23; IC95% = 1,04-1,45; p=0,05) que se acentúa, siendo estadísticamente significativa en el modelo dominante **rs6439552** (OR=1,20; IC95% = 1,02-1,41; p=0,01) y **rs12630592** (OR=1,20; IC95% = 1,03-1,41; p=0,02) el efecto es por tanto dependiente de los alelos G y T respectivamente para el **rs6439552** y para el **rs12630592**.

Los pacientes diagnosticados de depresión mayor se observa también la asociación para ambos SNPs de *GSK3β* tanto en el modelo codominante: **rs6439552** AG (OR=1,36; IC95% = 1,11-1,67; p=0,01) y **rs12630592** GT (OR=1,37; IC95% = 1,12-1,67; p=0,01), como para el modelo dominante **rs6439552** (OR=1,33; IC95% = 1,09-1,61; p=0,004) y **rs12630592** (OR=1,33; IC95% = 1,10-1,60; p=0,003).

Para ambos SNPs de *GSK3β*, el incremento del riesgo es mayor en el subgrupo de varones tanto en el modelo codominante como dominante, (OR=1,65; IC95% = 1,13-2,42; p=0,03; y OR=1,57; IC95% = 1,09-2,25; p=0,01 para **rs6439552** y OR=1,64; IC95% = 1,13-2,38; p=0,03; (OR=1,53; IC95% = 1,07-2,19; p=0,02 para el **rs12630552**). En el subgrupo de mujeres no se presenta asociación de los SNPs de *GSK3β* elegidos con ninguna de las patologías estudiadas.

**Tabla 51.- Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos de los SNP en *GSK3β* rs3004067 y rs6937133 en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

<b>GSK3β rs6438552</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	AA	997 (36,1%)	430 (32,1%)	1.00		276 (32%)	1.00		176 (29,8%)	1.00		154 (32,2%)	1.00	
	AG	1278 (46,2%)	663 (49,5%)	<b>1,20 (1,04-1,39)</b>	<b>0,04</b>	431 (50%)	<b>1,22 (1,03-1,45)</b>	<b>0,07</b>	307 (52%)	<b>1,36 (1,11-1,67)</b>	<b>0,01</b>	232 (48,5%)	1,18 (0,94-1,46)	<b>0,25</b>
	GG	489 (17,7%)	247 (18,4%)	1,17 (0,97-1,42)		155 (18%)	1,15 (0,91-1,43)		107 (18,1%)	1,24 (0,95-1,61)		92 (19,2%)	1,22 (0,92-1,61)	
D	AA vs (AG+GG)	1767 (63,9%)	910 (67,9%)	<b>1,19 (1,04-1,37)</b>	<b>0,01</b>	586 (68%)	<b>1,20 (1,02-1,41)</b>	<b>0,02</b>	414 (70,2%)	<b>1,33 (1,09-1,61)</b>	<b>0,00</b>	324 (67,8%)	1,19 (0,97-1,46)	<b>0,1</b>
R	(AA+AG) vs GG	489 (17,7%)	247 (18,4%)	1,05 (0,89-1,25)	<b>0,56</b>	155 (18%)	1,02 (0,84-1,25)	<b>0,85</b>	107 (18,1%)	1,03 (0,82-1,30)	<b>0,8</b>	92 (19,2%)	1,11 (0,87-1,42)	<b>0,42</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	AA	567 (34,6%)	289 (31,6%)	1.00		194 (31,6%)	1.00		130 (30,4%)	1.00		95 (31,6%)	1.00	
	AG	792 (48,4%)	455 (49,7%)	1,13 (0,94-1,35)	<b>0,24</b>	306 (49,8%)	1,13 (0,92-1,39)	<b>0,36</b>	221 (51,8%)	1,22 (0,96-1,55)	<b>0,26</b>	149 (49,5%)	1,12 (0,85-1,48)	<b>0,51</b>
	GG	278 (17%)	171 (18,7%)	1,21 (0,95-1,53)		114 (18,6%)	1,20 (0,91-1,57)		76 (17,8%)	1,19 (0,87-1,64)		57 (18,9%)	1,22 (0,86-1,75)	
D	AA vs (AG+GG)	1070 (65,4%)	626 (68,4%)	1,15 (0,97-1,36)	<b>0,12</b>	420 (68,4%)	1,15 (0,94-1,40)	<b>0,17</b>	297 (69,6%)	1,21 (0,96-1,52)	<b>0,1</b>	206 (68,4%)	1,15 (0,88-1,50)	<b>0,3</b>
R	(AA+AG) vs GG	278 (17%)	171 (18,7%)	1,12 (0,91-1,39)	<b>0,28</b>	114 (18,6%)	1,11 (0,88-1,42)	<b>0,38</b>	76 (17,8%)	1,06 (0,80-1,40)	<b>0,69</b>	57 (18,9%)	1,14 (0,83-1,57)	<b>0,41</b>
<b>VARONES</b>														
CD	AA	430 (38,1%)	140 (33,2%)	1.00		81 (33,1%)	1.00		46 (28,2%)	1.00		59 (33,3%)	1.00	
	AG	486 (43,1%)	206 (48,8%)	1,30 (1,01-1,67)	<b>0,11</b>	123 (50,2%)	1,34 (0,99-1,83)	<b>0,13</b>	86 (52,8%)	<b>1,65 (1,13-2,42)</b>	<b>0,03</b>	83 (46,9%)	1,24 (0,87-1,78)	<b>0,46</b>
	GG	211 (18,7%)	76 (18%)	1,11 (0,80-1,53)		41 (16,7%)	1,03 (0,68-1,55)		31 (19%)	1,37 (0,85-2,23)		35 (19,8%)	1,21 (0,77-1,89)	
D	AA vs (AG+GG)	697 (61,9%)	282 (66,8%)	<b>1,24 (0,98-1,57)</b>	<b>0,06</b>	164 (66,9%)	1,25 (0,93-1,67)	<b>0,13</b>	117 (71,8%)	<b>1,57 (1,09-2,25)</b>	<b>0,01</b>	118 (66,7%)	1,23 (0,88-1,72)	<b>0,21</b>
R	(AA+AG) vs GG	211 (18,7%)	76 (18%)	0,95 (0,71-1,27)	<b>0,75</b>	41 (16,7%)	0,87 (0,60-1,26)	<b>0,46</b>	31 (19%)	1,02 (0,67-1,55)	<b>0,93</b>	35 (19,8%)	1,07 (0,72-1,59)	<b>0,74</b>
<b>rs12630592</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	GG	1109 (37,7%)	457 (33,8%)	1.00		293 (33,5%)	1.00		188 (31,3%)	1.00		164 (34,3%)	1.00	
	GT	1348 (45,8%)	675 (49,9%)	<b>1,22 (1,05-1,40)</b>	<b>0,02</b>	438 (50,1%)	<b>1,23 (1,04-1,45)</b>	<b>0,05</b>	313 (52,2%)	<b>1,37 (1,12-1,67)</b>	<b>0,00</b>	237 (49,6%)	1,19 (0,96-1,47)	<b>0,28</b>
	TT	485 (16,5%)	221 (16,3%)	1,11 (0,91-1,34)		144 (16,5%)	1,12 (0,90-1,41)		99 (16,5%)	1,20 (0,92-1,57)		77 (16,1%)	1,07 (0,80-1,44)	
D	GG vs (GT+TT)	1833 (62,3%)	896 (66,2%)	<b>1,19 (1,04-1,36)</b>	<b>0,01</b>	582 (66,5%)	<b>1,20 (1,03-1,41)</b>	<b>0,02</b>	412 (68,7%)	<b>1,33 (1,10-1,60)</b>	<b>0,00</b>	314 (65,7%)	1,16 (0,95-1,42)	<b>0,15</b>
R	(GG+GT) vs TT	485 (16,5%)	221 (16,3%)	0,99 (0,83-1,18)	<b>0,90</b>	144 (16,5%)	1,00 (0,81-1,22)	<b>0,98</b>	99 (16,5%)	1,00 (0,79-1,27)	<b>0,99</b>	77 (16,1%)	0,97 (0,75-1,26)	<b>0,84</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	GG	631 (36,9%)	306 (33,1%)	1.00		206 (33%)	1.00		140 (32,1%)	1.00		100 (33,2%)	1.00	
	GT	808 (47,2%)	464 (50,2%)	1,18 (0,99-1,41)	<b>0,15</b>	311 (49,8%)	1,18 (0,96-1,45)	<b>0,22</b>	224 (51,4%)	1,25 (0,99-1,58)	<b>0,17</b>	153 (50,8%)	1,19 (0,91-1,57)	<b>0,44</b>
	TT	271 (15,8%)	155 (16,8%)	1,18 (0,93-1,50)		107 (17,1%)	1,21 (0,92-1,59)		72 (16,5%)	1,20 (0,87-1,65)		48 (15,9%)	1,12 (0,77-1,62)	
D	GG vs (GT+TT)	1079 (63,1%)	619 (66,9%)	<b>1,18 (1,00-1,40)</b>	<b>0,05</b>	418 (67%)	<b>1,19 (0,98-1,44)</b>	<b>0,08</b>	296 (67,9%)	<b>1,24 (0,99-1,55)</b>	<b>0,06</b>	201 (66,8%)	1,18 (0,91-1,52)	<b>0,22</b>
R	(GG+GT) vs TT	271 (15,8%)	155 (16,8%)	1,07 (0,86-1,33)	<b>0,55</b>	107 (17,1%)	1,10 (0,86-1,40)	<b>0,45</b>	72 (16,5%)	1,05 (0,79-1,40)	<b>0,74</b>	48 (15,9%)	1,01 (0,72-1,41)	<b>0,97</b>
<b>VARONES</b>														
CD	GG	478 (38,8%)	150 (35,3%)	1.00		86 (34,7%)	1.00		48 (29,3%)	1.00		64 (36,2%)	1.00	
	GT	540 (43,8%)	209 (49,2%)	1,23 (0,97-1,57)	<b>0,16</b>	125 (50,4%)	1,29 (0,95-1,74)	<b>0,16</b>	89 (54,3%)	<b>1,64 (1,13-2,38)</b>	<b>0,028</b>	84 (47,5%)	1,16 (0,82-1,64)	<b>0,66</b>
	TT	214 (17,4%)	66 (15,5%)	0,98 (0,71-1,37)		37 (14,9%)	0,96 (0,63-1,46)		27 (16,5%)	1,26 (0,76-2,07)		29 (16,4%)	1,01 (0,63-1,62)	
D	GG vs (GT+TT)	754 (61,2%)	275 (64,7%)	1,16 (0,92-1,46)	<b>0,20</b>	162 (65,3%)	1,19 (0,90-1,59)	<b>0,22</b>	116 (70,7%)	<b>1,53 (1,07-2,19)</b>	<b>0,016</b>	113 (63,8%)	1,12 (0,81-1,55)	<b>0,50</b>
R	(GG+GT) vs TT	214 (17,4%)	66 (15,5%)	0,87 (0,65-1,18)	<b>0,38</b>	37 (14,9%)	0,83 (0,57-1,22)	<b>0,34</b>	27 (16,5%)	0,94 (0,60-1,45)	<b>0,77</b>	29 (16,4%)	0,93 (0,61-1,42)	<b>0,74</b>

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo. TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

## 5.3.10 WNT2B

## 5.3.10.1 Distribución alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP rs3790606 en WNT2B

Las frecuencias alélicas del SNP rs3790606 de WNT2B se pueden observar en la Tabla 52. Las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y distímias (TDs) tanto para el conjunto de la población:  $\chi^2 = 2,5$ ; ns, como para el subgrupo de mujeres:  $\chi^2 = 2,1$ ; ns y el subgrupo de varones:  $\chi^2 = 27,9$ ; ns. La población control cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg  $p=0,26$  para el SNP rs3790606 de WNT2B.

**Tabla 52.- Frecuencias alélicas del SNP rs3790606 de WNT2B** incluido en el estudio en el conjunto de la muestra y en mujeres y varones.

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TDs N (%)	TB N (%)
<b>WNT2B</b>						
<b>rs3790606</b>						
G todos	4133 (71)	1868 (70)	1203 (70)	819 (69)	84 (72)	665 (69)
G mujeres	2395 (71)	1284 (70)	860 (70)	596 (69)	61 (73)	241 (68)
G varones	1738 (71)	579 (68)	338 (69)	223 (69)	23 (72)	204 (57)
C todos	1707 (29)	814 (30)	521 (30)	363 (31)	32 (28)	293 (31)
C mujeres	989 (29)	546 (30)	368 (30)	262 (31)	23 (27)	115 (32)
C varones	718 (29)	267 (32)	152 (31)	101 (31)	9 (28)	154 (43)

## 5.3.10.2 Distribución genotípica del SNP rs3790606 en WNT2B en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

En la Tabla 53 se muestran las frecuencias genotípicas para el SPN rs3790606 de WNT2B grupo control, en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno

**Tabla 53.- Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos de los SNP en WNT2B rs3790606** en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones

<b>Wnt2 rs3790606</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	GG	1475 (50,5%)	645 (48,1%)	1,00		415 (48,1%)	1,00		287 (48,6%)	1,00		230 (48%)	1,00	
	CG	1183 (40,5%)	578 (43,1%)	1,12 (0,98-1,28)	0,27	373 (43,3%)	1,12 (0,96-1,31)	0,35	245 (41,5%)	1,06 (0,88-1,28)	0,6	205 (42,8%)	1,11 (0,91-1,36)	0,59
	CC	262 (9%)	118 (8,8%)	1,03 (0,81-1,30)		74 (8,6%)	1,00 (0,76-1,33)		59 (10%)	1,16 (0,85-1,58)		44 (9,2%)	1,08 (0,76-1,53)	
D	GG vs (CG+CC)	1445 (49,5%)	696 (51,9%)	1,10 (0,97-1,25)	0,14	447 (51,9%)	1,10 (0,94-1,28)	0,22	304 (51,4%)	1,08 (0,91-1,29)	0,39	249 (52%)	1,11 (0,91-1,34)	0,31
R	(GG+CG) vs CC	262 (9%)	118 (8,8%)	0,98 (0,78-1,23)	0,85	74 (8,6%)	0,95 (0,73-1,25)	0,72	59 (10%)	1,13 (0,84-1,51)	0,44	44 (9,2%)	1,03 (0,73-1,43)	0,88
<b>MUJERES</b>														
CD	GG	856 (50,6%)	450 (49,2%)	1,00		299 (48,7%)	1,00		211 (49,2%)	1,00		79 (44,4%)	1,00	
	CG	683 (40,7%)	384 (42%)	1,07 (0,90-1,27)	0,73	262 (42,7%)	1,10 (0,90-1,33)	0,61	174 (40,6%)	1,03 (0,83-1,29)	0,72	83 (46,6%)	1,30 (0,94-1,81)	0,29
	CC	153 (9%)	81 (8,8%)	1,01 (0,75-1,35)		53 (8,6%)	0,99 (0,71-1,39)		44 (10,3%)	1,17 (0,81-1,68)		16 (9%)	1,15 (0,65-2,04)	
D	GG vs (CG+CC)	836 (49,4%)	465 (50,8%)	1,06 (0,90-1,24)	0,49	315 (51,3%)	1,08 (0,90-1,30)	0,42	218 (50,8%)	1,06 (0,86-1,31)	0,60	99 (55,6%)	1,27 (0,93-1,75)	0,13
R	(GG+CG) vs CC	153 (9%)	81 (8,8%)	0,98 (0,74-1,30)	0,87	53 (8,6%)	0,95 (0,69-1,32)	0,76	44 (10,3%)	1,15 (0,81-1,64)	0,44	16 (9%)	1,01 (0,58-1,76)	0,96
<b>VARONES</b>														
CD	GG	619 (50,4%)	193 (45,6%)	1,00		114 (46,5%)	1,00		76 (46,9%)	1,00		79 (44,4%)	1,00	
	CG	500 (40,7%)	193 (45,6%)	1,24 (0,98-1,56)	0,20	110 (44,9%)	1,19 (0,90-1,59)	0,47	71 (43,8%)	1,16 (0,82-1,63)	0,70	83 (46,6%)	1,30 (0,94-1,81)	0,29
	CC	109 (8,9%)	37 (8,8%)	1,09 (0,73-1,63)		21 (8,6%)	1,05 (0,63-1,74)		15 (9,3%)	1,12 (0,62-2,02)		16 (9%)	1,15 (0,65-2,04)	
D	GG vs (CG+CC)	609 (49,6%)	230 (54,4%)	1,21 (0,97-1,51)	0,09	131 (53,5%)	1,17 (0,89-1,54)	0,27	86 (53,1%)	1,15 (0,83-1,60)	0,40	99 (55,6%)	1,27 (0,93-1,75)	0,13
R	(GG+CG) vs CC	109 (8,9%)	37 (8,8%)	0,98 (0,67-1,45)	0,94	21 (8,6%)	0,96 (0,59-1,57)	0,88	15 (9,3%)	1,05 (0,59-1,85)	0,87	16 (9%)	1,01 (0,58-1,76)	0,96

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo, TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) en el conjunto de la población y en mujeres y hombres por separado.

En el conjunto de la población de pacientes o en los subgrupos de mujeres o varones no observamos asociación con el polimorfismo seleccionado de *WNT2B*, en ninguno de los modelos estudiados (codominante, dominante y recesivo) ni para el conjunto de pacientes ni para los pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, depresión mayor o trastorno bipolar.

### 5.3.11 WNT3

#### 5.3.11.1 Distribución alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP rs199494 en WNT3

Para el gen *WNT3* se seleccionó el SNP rs199494, las frecuencias alélicas de rs199494 se muestran en la Tabla 54. Se puede observar que las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y distímias (TDs) tanto para el conjunto de la población:  $\chi^2 = 3,1$ ; ns; como para el subgrupo de mujeres:  $\chi^2 = 3,1$ ; ns;  $\chi^2 = 0,6$  y el subgrupo de varones:  $\chi^2 = 3,0$ ; ns. La población control no cumple la H0 en el equilibrio de Hardy-Weinberg  $p=0,04$ .

**Tabla 54-** Frecuencias alélicas en el conjunto de la muestra y en mujeres y varones del SNP de *WNT3* rs199494 incluidos en el estudio.

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TDs N (%)	TB N (%)
<b>WNT3</b>						
<b>rs199494</b>						
A todos	3238 (55)	1495 (55)	951 (54)	657 (54)	67 (58)	544 (56)
A mujeres	1859 (55)	999 (54)	659 (53)	466 (53)	45 (52)	340 (56)
A varones	1343 (55)	493 (58)	289 (58)	191 (58)	22 (73)	204 (57)
G todos	2612 (45)	1223 (45)	803 (46)	549 (46)	49 (42)	420 (44)
G mujeres	1527 (45)	857 (46)	591 (47)	408 (47)	41 (48)	266 (44)
G varones	1085 (45)	363 (42)	209 (42)	141 (42)	8 (27)	154 (43)

#### 5.3.11.2 Distribución genotípica del SNP rs199494 en WNT3 en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

Las frecuencias genotípicas para el SNP rs199494 de *WNT3* correspondientes al grupo control, el conjunto de los pacientes (TP) y los distintos subgrupos de pacientes diagnosticados de trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM) o trastorno bipolar (TB) para el conjunto de la población y en mujeres y hombres por separado se presentan en la Tabla 55

En el conjunto de la población de pacientes y en el conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, depresión mayor o trastorno bipolar no observamos asociación con el SNP rs199494 en *WNT3*, en ninguno de los modelos estudiados (codominante, dominante y recesivo) ni para el subgrupo de mujeres o varones.

Por el contrario se observa un tendencia al efecto protector del alelo G en el modelo codominante (OR=0,87; IC95% = 0,65-1,16;  $p=0,10$ ) y recesivo (OR=0,80; IC95% = 0,62-1,03;  $p=0,08$ ) en todos los paciente diagnosticados de trastorno bipolar.

**Tabla 55.- Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos del SNP en WNT3 rs199494 en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones**

<b>WNT3 rs199494</b>													
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>													
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)
CD	AA	924 (31,6%)	404 (29,7%)	1,00		258 (29,4%)	1,00		181 (30%)	1,00		146 (30,3%)	1,00
	AG	1390 (47,5%)	687 (50,5%)	1,13 (0,97-1,31)	<b>0,18</b>	435 (49,6%)	1,12 (0,94-1,34)	<b>0,44</b>	295 (48,9%)	1,08 (0,88-1,33)	<b>0,74</b>	252 (52,3%)	1,15 (0,92-1,4)
	GG	611 (20,9%)	268 (19,7%)	1,00 (0,83-1,21)		184 (21%)	1,08 (0,87-1,34)		127 (21,1%)	1,06 (0,83-1,36)		84 (17,4%)	<b>0,87 (0,65-1,1)</b>
D	AA vs (AG+GG)	2001 (68,4%)	955 (70,3%)	1,09 (0,95-1,26)	<b>0,22</b>	619 (70,6%)	1,11 (0,94-1,31)	<b>0,22</b>	422 (70%)	1,08 (0,89-1,30)	<b>0,45</b>	336 (69,7%)	1,06 (0,86-1,3)
R	(AA+AG) vs GG	611 (20,9%)	268 (19,7%)	0,93 (0,79-1,09)	<b>0,38</b>	184 (21%)	1,01 (0,84-1,21)	<b>0,95</b>	127 (21,1%)	1,01 (0,81-1,25)	<b>0,92</b>	84 (17,4%)	<b>0,80 (0,62-1,0)</b>
<b>MUJERES</b>													
CD	AA	528 (30,9%)	259 (27,9%)	1,00		170 (27,2%)	1,00		124 (28,4%)	1,00		89 (29,4%)	1,00
	AG	839 (49%)	481 (51,8%)	1,17 (0,97-1,41)	<b>0,26</b>	319 (51%)	1,18 (0,95-1,47)	<b>0,22</b>	218 (49,9%)	1,11 (0,87-1,41)	<b>0,54</b>	162 (53,5%)	1,15 (0,87-1,5)
	GG	344 (20,1%)	188 (20,3%)	1,11 (0,88-1,40)		136 (21,8%)	1,23 (0,94-1,60)		95 (21,7%)	1,18 (0,87-1,59)		52 (17,2%)	0,90 (0,62-1,3)
D	AA vs (AG+GG)	1183 (69,1%)	669 (72,1%)	1,15 (0,97-1,38)	<b>0,11</b>	455 (72,8%)	<b>1,19 (0,97-1,46)</b>	<b>0,08</b>	313 (71,6%)	1,13 (0,89-1,42)	<b>0,31</b>	214 (70,6%)	1,07 (0,82-1,4)
R	(AA+AG) vs GG	344 (20,1%)	188 (20,3%)	1,01 (0,83-1,23)	<b>0,93</b>	136 (21,8%)	1,11 (0,88-1,38)	<b>0,38</b>	95 (21,7%)	1,10 (0,85-1,43)	<b>0,45</b>	52 (17,2%)	0,82 (0,60-1,1)
<b>VARONES</b>													
CD	AA	396 (32,6%)	144 (33,6%)	1,00		87 (34,9%)	1,00		57 (34,3%)	1,00		57 (31,8%)	1,00
	AG	551 (45,4%)	205 (47,9%)	1,02 (0,80-1,31)	<b>0,29</b>	115 (46,2%)	0,95 (0,70-1,29)	<b>0,51</b>	77 (46,4%)	0,97 (0,67-1,40)	<b>0,71</b>	90 (50,3%)	1,13 (0,79-1,6)
	GG	267 (22%)	79 (18,5%)	0,81 (0,59-1,12)		47 (18,9%)	0,80 (0,54-1,18)		32 (19,3%)	0,83 (0,53-1,32)		32 (17,9%)	0,83 (0,53-1,3)
D	AA vs (AG+GG)	818 (67,4%)	284 (66,4%)	0,95 (0,76-1,21)	<b>0,70</b>	162 (65,1%)	0,90 (0,68-1,20)	<b>0,48</b>	109 (65,7%)	0,93 (0,66-1,30)	<b>0,66</b>	122 (68,2%)	1,04 (0,74-1,4)
R	(AA+AG) vs GG	267 (22%)	79 (18,5%)	0,80 (0,61-1,06)	<b>0,12</b>	47 (18,9%)	0,83 (0,58-1,17)	<b>0,27</b>	32 (19,3%)	0,85 (0,56-1,27)	<b>0,42</b>	32 (17,9%)	0,77 (0,51-1,1)

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo, TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: tra: trastorno bipolar

### 5.3.12 ZBED3

#### 5.3.12.1 Distribución alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP rs 2914143 en ZBED3

Las frecuencias alélicas del SNP rs2914143 de ZBED3 se muestran en la Tabla 56. Las frecuencias alélicas fueron similares en el grupo control (GC), en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y distímias (TDs) tanto para el conjunto de la población:  $\chi^2 = 8,1$ ; ns, como para el subgrupo de mujeres:  $\chi^2 = 3,7$ ; ns y el subgrupo de varones:  $\chi^2 = 6,0$ ; ns. La población control cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg  $p=0,33$  para el SNP rs2914143.

#### 5.3.12.2 Distribución genotípica del SNP rs2914143 en ZBED3 en los distintos grupos de enfermos. Análisis de asociación

En la Tabla 57 se muestran las frecuencias genotípicas para el SPN de ZBED3 rs2914143 y para el grupo control, en el conjunto de los pacientes (TP) y en los distintos subgrupos de pacientes trastorno depresivo (TD), depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) en el conjunto de la población y en mujeres y hombres por separado.

En el conjunto de la población de pacientes y en el conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, no observamos asociación con el SNP seleccionado para ZBED3, rs2914143, en ninguno de los modelos estudiados (codominante, dominante y recesivo) ni para el subgrupo de mujeres o varones. En pacientes diagnosticados de depresión mayor (DM) encontramos un efecto protector en mujeres portadoras del alelo A en los modelos codominante OR=0,78; IC95% = 0,62-0,98;  $p=0,05$  y dominante OR= 0,83; IC95% = 0,66- 1,03;  $p=0,09$ .

**Tabla 56.-** Frecuencias alélicas del SNP de ZBED3 rs2914143 incluido en el estudio, en el conjunto de la muestra y en mujeres y varones

Gen/SNP	GC N (%)	TP N (%)	TD N (%)	TDG N (%)	TDs N (%)	TB N (%)
<b>ZBED3</b>						
<b>rs2914143</b>						
G todos	4591 (78)	2124 (79)	1348 (78)	943 (79)	84 (72)	776 (81)
G mujeres	2658 (78)	1447 (79)	963 (78)	686 (79)	63 (75)	484 (80)
G varones	1933 (78)	672 (79)	380 (78)	257 (80)	21 (66)	292 (82)
A todos	1303 (22)	566 (21)	382 (22)	245 (21)	32 (28)	184 (19)
A mujeres	766 (22)	391 (21)	273 (22)	180 (21)	21 (25)	118 (20)
A varones	537 (22)	174 (21)	108 (22)	65 (20)	11 (34)	66 (18)

En el caso de los pacientes diagnosticados de trastorno bipolar, observamos una tendencia a la efecto protector del alelo A para el conjunto de los pacientes, en los modelos codominante OR=0,68; IC95% = 0,40-1,15; p=0,11 y dominante OR= 0,82; IC95% = 0,67- 1,00; p=0,05. Sin diferencias entre mujeres y varones.

**Tabla 57.-** Frecuencias genotípicas y estudio de asociación de los genotipos del SNP en ZBED3 rs2914143 en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres y varones

<b>ZBED3 rs2914143</b>														
<b>TODOS LOS PACIENTES</b>														
modelo	genotipo	Control	TP	OR (95% CI)	p	TD	OR (95% CI)	p	DM	OR (95% CI)	p	Bp	OR (95% CI)	p
CD	GG	1779 (60,4%)	840 (62,5%)	1,00		528 (61%)	1,00		379 (63,8%)	1,00		312 (65%)	1,00	
	AG	1033 (35%)	444 (33%)	0,91 (0,79-1,05)	<b>0,41</b>	292 (33,8%)	0,95 (0,81-1,12)	<b>0,63</b>	185 (31,1%)	0,84 (0,69-1,02)	<b>0,18</b>	152 (31,7%)	0,84 (0,68-1,03)	<b>0,11</b>
	AA	135 (4,6%)	61 (4,5%)	0,96 (0,70-1,31)		45 (5,2%)	1,12 (0,79-1,60)		30 (5%)	1,04 (0,69-1,57)		16 (3,3%)	<b>0,68 (0,40-1,15)</b>	
D	GG vs (AG+AA)	1168 (39,6%)	505 (37,5%)	0,92 (0,80-1,05)	<b>0,19</b>	337 (39%)	0,97 (0,83-1,14)	<b>0,72</b>	215 (36,2%)	0,86 (0,72-1,04)	<b>0,12</b>	168 (35%)	<b>0,82 (0,67-1,00)</b>	<b>0,05</b>
R	(GG+AG) vs AA	135 (4,6%)	61 (4,5%)	0,99 (0,73-1,35)	<b>0,95</b>	45 (5,2%)	1,14 (0,81-1,62)	<b>0,45</b>	30 (5%)	1,11 (0,74-1,66)	<b>0,62</b>	16 (3,3%)	0,72 (0,42-1,22)	<b>0,20</b>
<b>MUJERES</b>														
CD	GG	1026 (59,9%)	574 (62,5%)	1,00		382 (61,8%)	1,00		279 (64,4%)	1,00		192 (63,8%)	1,00	
	AG	606 (35,4%)	299 (32,5%)	0,88 (0,74-1,05)	<b>0,33</b>	199 (32,2%)	0,88 (0,72-1,08)	<b>0,21</b>	128 (29,6%)	<b>0,78 (0,62-0,98)</b>	<b>0,05</b>	100 (33,2%)	0,88 (0,68-1,15)	<b>0,25</b>
	AA	80 (4,7%)	46 (5%)	1,03 (0,71-1,50)		37 (6%)	1,24 (0,83-1,87)		26 (6%)	1,20 (0,75-1,90)		9 (3%)	0,60 (0,30-1,22)	
D	GG vs (AG+AA)	686 (40,1%)	345 (37,5%)	0,90 (0,76-1,06)	<b>0,2</b>	236 (38,2%)	0,92 (0,76-1,12)	<b>0,41</b>	154 (35,6%)	<b>0,83 (0,66-1,03)</b>	<b>0,08</b>	109 (36,2%)	0,85 (0,66-1,09)	<b>0,20</b>
R	(GG+AG) vs AA	80 (4,7%)	46 (5%)	1,07 (0,74-1,56)	<b>0,7</b>	37 (6%)	1,30 (0,87-1,94)	<b>0,21</b>	26 (6%)	1,30 (0,83-2,06)	<b>0,26</b>	9 (3%)	0,63 (0,31-1,27)	<b>0,17</b>
<b>VARONES</b>														
CD	AA	753 (61%)	264 (62,4%)	1,00		144 (59%)	1,00		100 (62,1%)	1,00		120 (67%)	1,00	
	AG	427 (34,6%)	144 (34%)	0,96 (0,76-1,22)	<b>0,68</b>	92 (37,7%)	1,13 (0,85-1,50)	<b>0,50</b>	57 (35,4%)	1,01 (0,71-1,42)	<b>0,46</b>	52 (29,1%)	0,76 (0,54-1,08)	<b>0,29</b>
	GG	55 (4,5%)	15 (3,5%)	0,78 (0,43-1,40)		8 (3,3%)	0,76 (0,35-1,63)		4 (2,5%)	0,55 (0,19-1,54)		7 (3,9%)	0,80 (0,36-1,79)	
D	AA vs (AG+GG)	482 (39%)	159 (37,6%)	0,94 (0,75-1,18)	<b>0,6</b>	100 (41%)	1,08 (0,82-1,43)	<b>0,57</b>	61 (37,9%)	0,95 (0,68-1,34)	<b>0,78</b>	59 (33%)	0,77 (0,55-1,07)	<b>0,12</b>
R	(AA+AG) vs GG	55 (4,5%)	15 (3,5%)	0,79 (0,44-1,41)	<b>0,41</b>	8 (3,3%)	0,73 (0,34-1,55)	<b>0,39</b>	4 (2,5%)	0,55 (0,20-1,53)	<b>0,21</b>	7 (3,9%)	0,87 (0,39-1,95)	<b>0,74</b>

CD: modelo codominante; D: modelo dominante y R: modelo recesivo, TP: todos los pacientes; PD: depresión; DM: Depresión mayor; TDs: trastorno distímico; TB: trastorno bipolar

### **Resumen general de la PARTE B: Estudios de genotipado.**

El estudio de asociación entre SNPs de genes candidatos de la vía wnt/ $\beta$ -catenina y los trastornos depresivos o trastorno bipolar, se realizó en una población de 4107 sujetos que participaron en el estudio DEPREGEN, promovido dentro del CBERSAM, utilizando el banco de muestras de ADN del CIBERSAM. Del total de los sujetos, 2834 (69%) fueron sujetos control y 1273 (31%) fueron pacientes diagnosticados por un psiquiatra de alguno tipo de trastorno depresivo o trastorno bipolar según criterios del DSM IV: **todos los pacientes (TP)**, **pacientes con depresión (TD)**, **depresión mayor (DM)**, trastorno distímico (TDs) y el **trastorno bipolar (TB)**. En este estudio tratamos de detectar una susceptibilidad a la depresión mediante la identificación de alelos comunes en la población (SNPs de predisposición) en una serie de genes candidatos de la vía wnt- $\beta$ -catenina implicada en procesos de proliferación y plasticidad neuronal. Mediante la utilización de software SNPStats, para cada SNP, antes de realizar el estudio de asociación, comprobamos las frecuencias alélicas y el equilibrio de Hardy-Weimberg (HWE).

Para **AKT1** no observamos asociación con los SNPs rs1130214 y rs1130233, en ninguno de los modelos estudiados (codominante, dominante y recesivo) ni para el subgrupo de mujeres o varones. En pacientes diagnosticados de depresión mayor (DM) encontramos un incremento significativo del riesgo de enfermedad en varones con genotipo TT del SNP **rs1130233**. Por el contrario, los varones portadores del alelo T del marcador **rs1130214** muestran un claro efecto protector al trastorno. El marcador **rs1130233** presenta una tendencia a incrementar el riesgo de trastorno bipolar en los individuos heterocigóticos GT del conjunto de la población, sobre todo en mujeres, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo.

Para **APC** en el SNP rs13167522 observamos una tendencia a un efecto protector del genotipo heterocigótico CT en el modelo codominante que roza la significación estadística para los pacientes varones diagnosticados de algún tipo de depresión o de depresión mayor, pero no para los pacientes diagnosticados de trastorno bipolar. Por el contrario, el genotipo homocigótico recesivo CC incrementa el riesgo en el modelo codominante para el conjunto de los varones, los varones diagnosticados de algún tipo de depresión o de depresión mayor. En el marcador **rs17290456** encontramos una tendencia no significativa al efecto protector del genotipo homocigoto (CC) en el modelo codominante (OR=0,37; p=0,15) y recesivo (OR=0,36; p=0,25) en pacientes diagnosticados de trastorno bipolar. Esta tendencia al efecto protector se observa también en el subgrupo de mujeres para todas las categorías diagnósticas.

Para el conjunto de la población, los pacientes diagnosticados de depresión, depresión mayor o trastorno bipolar, no observamos ninguna asociación significativa en los SNPs **rs214250** de **AXIN1**. En el caso del conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, observamos un incremento significativo de riesgo en el alelo recesivo G del SNP **rs3923086** de **AXIN2** para los varones en el modelo codominante, mas claro aún en el modelo recesivo.

En el caso de **CTNNA1** en varones con diagnóstico de Trastorno Depresivo se observa un genotipo protector en los pacientes heterocigóticos de los SNPs: **rs 2140090**, **rs3774369**, **rs3864004**, **rs3915129**, **rs6776881** y **rs13075993** AG (modelo dominante OR=0,72; IC95% 0,55-0,95; p=0,02). El efecto protector en varones, que se ve acentuado significativamente en la población con diagnóstico de depresión mayor para los siguientes marcadores: **rs2140090**, **rs3774369**, **rs3864004**, **rs3915129**, **rs4533622**, **rs6776881** y **rs13075993**). No se observó asociación significativa para el conjunto de varones en el **rs4135385**. Para el subgrupo de las mujeres solo encontramos una tendencia al incremento de riesgo de depresión con el alelo dominante A del SNP **rs3774369**.

Para **DKK4** no observamos asociación en el conjunto de pacientes, pacientes y en el conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, con el polimorfismo seleccionado de **DKK4**, en ninguno de los modelos estudiados (codominante, dominante y recesivo) en el conjunto de la población o en el subgrupo de varones. En el subgrupo de mujeres diagnosticadas de depresión mayor, se puede observar un incremento del riesgo para rs2073665.

Para el SNP rs352203 de **FZD3**, se observa una tendencia a efecto protector del alelo C en el conjunto de todos los pacientes diagnosticados de trastorno bipolar, que no llega a ser estadísticamente significativo.

Para **GSK3 $\beta$**  se observa en el total de pacientes un incremento de riesgo en los dos SNPs seleccionados tanto en el modelo codominante, como en el modelo dominante donde este incremento de riesgo se acentúa para ambos SNPs: **rs6439552** y **rs12630592**. En el conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, se observa también un incremento de riesgo del genotipo heterocigoto AG y GT para ambos SNPs de **GSK3 $\beta$** , tanto en el modelo codominante como en el dominante; el efecto es por tanto dependiente de los alelos G y T respectivamente para el **rs6439552** y para el **rs12630592**. En los pacientes diagnosticados de depresión mayor se observa también la asociación para ambos SNPs de **GSK3 $\beta$**  tanto en el modelo codominante como para el modelo dominante.

Para ambos SNPs de **GSK3 $\beta$** , el incremento del riesgo es mayor en el subgrupo de varones tanto en el modelo codominante como dominante. En el subgrupo de mujeres no se presenta asociación de los SNPs de **GSK3 $\beta$**  elegidos con ninguna de las patologías estudiadas.

Para el SNP **rs199494** en **WNT3** se observa una tendencia al efecto protector del alelo G en el modelo codominante y recesivo.

Para el SNP seleccionado de **ZBED3**, **rs2914143**, en pacientes diagnosticados de depresión mayor (DM) encontramos un efecto protector en mujeres portadoras del alelo A en los modelos codominante y dominante.

No observamos asociación con los SNPs seleccionados de **DAAM2** y **WNT2B** en ninguno de los modelos estudiados (codominante, dominante y recesivo), en el conjunto de la población de pacientes y en el conjunto de pacientes diagnosticados de algún tipo de depresión, depresión mayor o trastorno bipolar ni en mujeres o varones.

**Tabla 47.-** Resumen de la asociación observada para los SNPs seleccionados en los distintos grupos de pacientes (TP, todos los pacientes; TD: pacientes deprimidos; DM: depresión mayor y TB: trastorno bipolar) y en los subgrupos de mujeres (♀) y varones (♂). El incremento de riesgo se expresa como ↑ y la tendencia como †; el efecto protector como † y la tendencia como †.

GEN	SNP	TP	TD	TDG	TB
AKT1	rs1130214				♂↑
	rs1130233			♂↑	♂♀↑
APC	rs454886				
	rs17290456				♂♀↑
	rs13167522	♂↑	♂↑↑	♂↑↑	
AXIN1	rs214250				
AXIN2	rs7210356				
	rs3923086		♂↑↑		
CTNNB1	rs3864004		♂↑	♂↑↑↑	
	rs4135385				
	rs4533622			♂↑↑↑	
	rs2140090		♂↑	♂↑↑↑	
	rs3915129		♂↑	♂↑↑↑	
	rs6776881		♂↑	♂↑↑	
	rs3774369		♀↑♂↑	♂↑↑↑	
	rs13075993		♂↑	♂↑↑↑	
DAAM2	rs6937133				
	rs3004067				
DKK4	rs2073665			♀↑	
FZD3	rs352203				♂♀↑
GSK3β	rs12630592	♂↑↑	♂↑↑	♂↑↑↑	
	rs6438552	♂↑↑	♂↑↑	♂↑↑↑	
WNT2B	rs3790606				
WNT3	rs199494				♂♀↑
ZBED3	rs2914143		♀↑		

## **DISCUSSION**



El objetivo de esta tesis ha sido la búsqueda de dianas moleculares implicadas en procesos de proliferación o plasticidad en neuronas u otros tipos de células y que sean moduladas de forma rápida por fármacos con demostrado efecto antidepressivo en humanos y/o animales. Para ello se ha comparado el curso temporal de la expresión de 9 genes (*Axin-1*; *Axin-2*; *Ctnnb1*;  $\beta$ -catenina-; *c-Myc*; *c-Jun*; *Ccnd1* –ciclina D1-; *Ppar $\gamma$* ; *Notch* y *Vegf*), por ADs con diferente rapidez de acción como la fluoxetina y la paroxetina, clásicos ISRS con un retraso de 3-4 semanas en alcanzar el efecto antidepressivo. La venlafaxina un inhibidor dual de la recaptación de 5HT y NA con una cierta mayor rapidez de acción y una nueva molécula, el agonista de receptores 5HT<sub>4</sub>RS 67333, recientemente identificado como un antidepressivo de acción rápida. La finalidad del estudio ha sido la identificación de dianas sobre las que desarrollar nuevos ADs de acción rápida.

Inicialmente se consideró la utilización únicamente de fluoxetina como ISRS pero debido a la toxicidad de la concentración de 10  $\mu$ M de fluoxetina sobre los cultivos organotípicos, se utilizó la paroxetina (ISRS) con escasa toxicidad sobre el tejido.

Como modelo de expresión génica utilizamos cultivos de células progenitoras de hipocampo (CPH), donde el efecto de los distintos fármacos sobre la expresión génica se debe sólo a la acción de los fármacos sobre células madre neuronales y cultivos de rodajas de cerebro que incluyen hipocampo y corteza (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), donde el efecto de los fármacos sobre la expresión de genes se debe a la acción de estos sobre distintos tipos de células (células proliferativas como no proliferativas, células neuronales y glia) presentes en el tejido. En nuestro estudio, demostramos que la mayor parte de los genes estudiados *Axin-2*; *c-Myc*; *c-Jun*; *Ppar $\gamma$* ; *Notch* y *Vegf* se expresan basalmente a un nivel similar en las CPH, el hipocampo y la corteza de cultivos organotípicos de cerebro, por el contrario *Axin-1* y *Ccnd1* (ciclina D1) han mostrado un nivel de expresión mayor en el cerebro (tanto en Hp como en Cx), finalmente el nivel de expresión basal de *Ctnnb1* ( $\beta$ -catenina) fue 2-3 veces mayor en las CPH que en el Hp o la Cx.

Para poder establecer los genes modificados por los distintos ADs que podrían constituir dianas moleculares, era importante poder valorar el efecto de estos fármacos sobre la proliferación celular en las CPH y en la región SGZ del GD del hipocampo. Tanto en las CPH como en el GD del hipocampo el fármaco que produce un mayor efecto proliferativo fue el RS 67333 seguido de la venlafaxina, produciendo tanto fluoxetina como paroxetina un efecto débil en las CPH e inapreciable en el GD del hipocampo, por tanto los genes modulados por RS 67333 o venlafaxina en CPH y en el Hp de cultivos organotípicos serían buenos candidatos al desarrollo de ADs de acción rápida. No obstante sería aconsejable la realización de estudios en animales en que se hayan modificado genéticamente los genes candidatos tanto en el sentido de valorar la proliferación hipocámpal como el comportamiento de esos animales.

## 1.- MODULACION DE GENES POR LA FLUOXETINA

En nuestro modelo de expresión, la fluoxetina modula distintos genes en las CPH frente al Hp y la Cx, así en las CPH incrementa precozmente *Axin-1*,  $\beta$ -catenina; *c-Myc*; *Ppar $\gamma$* ; y de forma tardía *Vegf*, manteniéndose elevado *c-Myc*. En el Hp incrementa inicialmente ciclina D1 y *Notch* y disminuye *Ppar $\gamma$* , de forma tardía incrementa *Axin-2*; *c-Myc* y *c-Jun* manteniéndose elevados ciclina D1 y *Notch*. En la corteza por el contrario sólo se muestran elevados y de forma tardía  $\beta$ -catenina; *c-Myc*; *c-Jun*; ciclina D1.

### 1.1 Axin

Axina ha sido identificada como un modulador negativo de la vía canónica de Wnt aunque su papel no está claramente definido (Kikuchi, 1999; Lustig, Jerchow et al. 2002). Axina es considerada una proteína de andamiaje de la cascada de wnt, participa en la formación del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina que permite su fosforilación dependiente de GSK3 $\beta$ , por tanto actúa como regulador negativo dentro de la vía de señalización de Wnt mediante la reducción de la cantidad de  $\beta$ -catenina disponible para la activación transcripcional (Sakanaka, Weiss et al. 1998). Axin-2 actúa como elemento de expresión inducible con un potencial papel inhibitorio por retroalimentación en la vía Wnt (Lustig, Jerchow et al. 2002).

En nuestro modelo de CPH, fluoxetina incrementa Axin-1 a las 16 h mientras que el incremento de  $\beta$ -catenina, aunque pequeño, se produce a las 4 h, y podría justificar el incremento

de Axin-1 a las 16 h como regulador de los niveles de  $\beta$ -catenina, pero en el Hp el gran incremento de Axin-2 ocurre a los 7 días sin cambios en  $\beta$ -catenina, por tanto, además de su papel regulador de  $\beta$ -catenina, se intuye Axin cumple otras funciones.

Recientes evidencias postulan un papel de Axina como un scaffold que coordina la proliferación y la diferenciación de progenitores neuronales durante el desarrollo del cerebro (Fang et al., 2013). Por tanto, sería interesante estudiar los mecanismos por los que *Axin-1* regula la proliferación y diferenciación de células progenitoras neuronales en adulto y si el incremento de Axina eleva la neurogénesis en adulto. También se ha postulado que *Axin-2* podría ser útil como diana terapéutica para acelerar la diferenciación de oligodendrocitos inmaduros {Fancy, 2011 #2769}. En este contexto, el importante incremento de *Axin-2* en HP podría estar implicado en procesos de diferenciación celular, aunque no hayamos detectado proliferación.

### 1.2 *Cttnb1*( $\beta$ -catenina)

El aumento de la  $\beta$ -catenina en la zona SGZ del Hp, se correlaciona con la activación de la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina, y se asocia a un aumento en la proliferación y un comportamiento antidepressivo-like tras tratamiento antidepressivo (Mostany, Valdizan et al. 2008; Garza, Guo et al. 2012; Pascual-Brazo, Castro et al. 2012). Varios tratamientos antidepressivos aumentan la proteína  $\beta$ -catenina y el ARNm en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo, como el ECS {Madsen, 2003 #3320}, ADs como la venlafaxina crónica o el RS 67333 subagudo {Mostany, 2008 #3312; Pascual-Brazo, 2012 #3314} o los estabilizadores del ánimo como el litio {Wexler, 2008 #3321}. Los ratones transgénicos que sobre-expresan  $\beta$ -catenina en cerebro mostraron un estado de ánimo estable similar al efecto observado tras la administración de litio (Gould, Einat et al. 2007).

Por otro lado, la administración de fluoxetina en combinación con antagonistas de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, muestran un aumento del nivel de expresión de  $\beta$ -catenina en el hipocampo, este incremento se asoció a la fracción de membrana, pero no a la nuclear y se relaciono con una ausencia en el incremento de la proliferación de células del hipocampo (Pilar-Cuellar, Vidal et al. 2012). Estos cambios de  $\beta$ -catenina aparecen en paralelo a un aumento de los niveles de N-cadherina, lo que indica una mayor participación de  $\beta$ -catenina en su papel de adhesión celular que en el papel de la proliferación celular, mejorando la plasticidad sináptica (Pilar-Cuellar, Vidal et al. 2012).

En nuestros resultados, la fluoxetina produce un leve incremento de los niveles de *Cttnb1* en CPH a las 4 horas, cuando la proliferación celular vuelve a niveles normales, por lo que el incremento de  $\beta$ -catenina podría estar relacionado con cambios en plasticidad que no hemos valorado en nuestro estudio.

En el hipocampo, observamos que el tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 $\mu$ M de fluoxetina no modifica significativamente la expresión de *Cttnb1* para ninguno de los tiempos estudiados, otros autores (pero no todos) han mostrado un aumento de la expresión de  $\beta$ -catenina en el hipocampo tras el tratamiento crónico con citalopram o fluoxetina (Liu, Dang et al. 2012). Diferencias en la dosis o el tiempo de tratamiento con el antidepressivo pueden ser responsables de estas discrepancias

En corteza, nuestros resultados muestran que el tratamiento con 1 $\mu$ M de fluoxetina produce un incremento de la expresión de *Cttnb1* sólo tras 7 días de tratamiento. En la bibliografía se han realizado experimentos similares que no encuentran cambios en la expresión de  $\beta$ -catenina en la corteza prefrontal tras tratamiento crónico con imipramina antidepressivo tricíclicos, o fluoxetina. (Sutton and Rushlow 2011).

### 1.3 Genes de respuesta rápida: *c-Myc* y *c-Jun*

No hemos encontrado datos de la participación de *c-Myc* en la neuroplasticidad o la neurogénesis, más allá de su participación en el ciclo celular. No existen tampoco estudios del papel de *c-Myc* en la depresión o en el mecanismo de acción de los antidepressivos.

En nuestro estudio, en las CPH, 1 $\mu$ M de fluoxetina incrementa progresivamente el nivel de expresión de *c-Myc* desde 1 hora hasta alcanzar el máximo a los 3 días. El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1  $\mu$ M de fluoxetina incrementa significativamente la expresión de *c-Myc* tras 7 días de tratamiento, en hipocampo y en corteza.

El control de la proliferación celular es una de las principales funciones de Myc en la biología celular. La mayor parte de los datos muestran que la sobreexpresión de Myc estimula mientras que su disminución inhibe, la progresión del ciclo celular. Sin embargo nuestros datos en CPH muestran un incremento importante en la expresión de *c-Myc* a todos los tiempos estudiados y el incremento de la proliferación celular solo fue observado a 1 hora. En hipocampo no encontramos cambios en proliferación y *c-Myc* incrementa a los 7 días, por tanto podríamos pensar que la dosis o el tiempo de estudio fueron insuficientes para ver el efecto proliferativo.

La activación de genes específicos de  $\beta$ -catenina permite controlar la transcripción celular y la regulación del ciclo celular. Los dos genes *c-Myc* y ciclina D1, se han estudiado respecto a  $\beta$ -catenina en células HCT116 co-transfectadas. Se ha demostrado de esta manera que el antígeno T y  $\beta$ -catenina incrementan de forma individual *c-Myc* y ciclina D1 {Xia, 1996 #5073}. Nuestros datos no apoyan un efecto de *c-Myc* y ciclina D1 dependiente de  $\beta$ -catenina.

A pesar del creciente número de estudios que relacionan los genes inmediatos a funciones importantes del cerebro, su papel en diversos trastornos neuropsiquiátricos incluyendo la esquizofrenia o el trastorno depresivo mayor aún es poco conocido {Todorova, 2003 #5078}.

En las neuronas post mitóticas, *c-Myc* juega un papel fundamental en la promoción de apoptosis en respuesta a diversos estímulos {McGahan, 1998 #3572; Nakai, 2000 #3575}. Además, *c-Myc* puede contribuir a la patogénesis de la esquizofrenia y el trastorno bipolar {Benes, 2006 #3668; Jarskog, 2007 #3676}, la administración de metanfetamina, que induce manifestaciones esquizofrénicas en animales, aumenta la expresión de *c-Myc* en corteza del ratón {Thiriet, 2001 #3685}.

*c-Jun* está implicado en numerosas funciones celulares, como la proliferación celular, la apoptosis, la supervivencia celular y la morfogénesis {Mechta-Grigoriou, 2001 #5074}. La regulación transcripcional de genes específicos por *c-Jun* juegan un papel clave en los mecanismos moleculares como la plasticidad neuronal, la transmisión sináptica, y la diferenciación morfológica. Sin embargo, pocos estudios se han centrado en la implicación de *c-Jun* o JNK en la memoria y en la plasticidad sináptica en el hipocampo.

Varios antidepresivos, principalmente inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS paroxetina y fluoxetina) y algunos antidepresivos tricíclicos (TCAs clomipramina), poseen actividad apoptótica en líneas celulares neuronales y gliales. Estos cambios apoptóticos fueron precedidos por aumento rápido en los niveles de *c-Jun*. {Levkovitz Y, et al 2005}.

En nuestro estudio, no encontramos cambios en la expresión de *c-Jun* tras el tratamiento con fluoxetina en CPH. El tratamiento de las rodajas de cerebro con 1 $\mu$ M de fluoxetina 1, 3 y 7 días, incrementa de forma significativa y tiempo dependiente la expresión de *c-Jun* tanto en el hipocampo como en la corteza, donde podría participar tanto en procesos de plasticidad sináptica como de apoptosis, estos efectos parecen no estar mediados directamente por células proliferativas dada la ausencia de cambios en las CPH.

De hecho, antidepresivos como la fluoxetina regulan la expresión de JNK {Li, 2014 #5134}. Otros estabilizadores del estado de ánimo como VPA o Li incrementan los niveles de proteína *c-Jun*. VPA podría aumentar directamente los niveles de *c-Jun* mediante el aumento de la expresión del gen {Asghari, 1998 #5150}.

#### 1.4. *Ccnd1*

CCND1 es una proteína reguladora clave de la transición de G1 a la fase S del ciclo celular en todas las células (Weinberg 1995).

A pesar de su presencia en las neuronas del giro dentado adulto, CCND1 no parece esencial para la neurogénesis en los adultos, su ablación tiene poco o ningún efecto sobre la

proliferación celular (Fantl, et al 1995; Sicinski, Donaher et al. 1995). La sobreexpresión de CCND1/cdk4 durante el desarrollo promueve la expansión de progenitores neurales y inhibe la maduración de las neuronas, la reducción de CCND1 tiene el efecto opuesto (Lange, Hüttner et al 2009). Por lo tanto, el aumento en la expresión de *ciclina D1* en el cerebro adulto maduro amplía el grupo de progenitores neuronales y retrasa su diferenciación a neuronas maduras. Alternativamente, CCND1 puede tener funciones independientes de promover la progresión del ciclo celular en el cerebro, en las células progenitoras diferenciadas, la localización nuclear de CCND1 induce apoptosis, (Sumrejkanchanakij, Tamamori-Adachi et al. 2003).

La bibliografía respecto a la expresión de *Ccnd1* y tratamiento antidepresivos es escasa, observándose que, el gen promotor del ciclo celular *Ccnd1* se upregula por el tratamiento con sertralina (Anacker, 2014) o fluoxetina (Zusso. et al 2008).

El tratamiento con fluoxetina de las rodajas de cerebro, incrementó la expresión de *Ccnd1* en el hipocampo a 1, 3 días y 7 días de tratamiento, por el contrario, en la corteza sólo se observó un incremento significativo tras 7 días de tratamiento con 1  $\mu$ M de fármaco.

Estudios previos en cultivos de células precursoras neurales derivadas de giro dentado de rata adulta tratados con dexametasona, utilizado como modelo animal de depresión, disminuye  $\beta$ -catenina, ciclina D1 y la proliferación celular {Boku, 2009 #3098}. En nuestro modelo de CPH, la fluoxetina, incremento de la expresión de  $\beta$ -catenina, a las 4 horas de la administración del fármaco y de *Ccnd1* a las 16 horas, pero no encontramos cambios en la proliferación.

### 1.6. Ppar- $\gamma$

PPAR- $\gamma$  es importante en la regulación del desarrollo temprano del cerebro y tras una lesión cerebral (Katayama 2005). Las células madre neurales aisladas a partir de embriones de ratón expresan altos niveles de PPAR- $\gamma$ . La supresión de la expresión de la proteína PPAR- $\gamma$  reduce significativa la tasa de crecimiento celular en células madre neural (Katayama 2005). De manera similar, la activación de la vía de PPAR- $\gamma$  por los agonistas estimuló la proliferación y diferenciación de células madre neurales.

En nuestro estudio en las CPH, la fluoxetina incrementó de forma significativa el nivel de expresión de Ppar $\gamma$  desde 1 hora hasta las 16 horas con un máximo a las 4 horas, observándose a las 72 horas una disminución de la expresión de Ppar- $\gamma$ . El tratamiento de las rodajas de cerebro con fluoxetina sólo modificó la expresión de Ppar- $\gamma$  en hipocampo, sin cambios significativos en la corteza. En el hipocampo, 1 día de tratamiento con 1  $\mu$ M de fluoxetina disminuye significativamente la expresión de Ppar $\gamma$  mientras que a los 3 o 7 días de tratamiento no se modifica de forma significativa la expresión de Ppar $\gamma$ .

No hay muchos datos del efecto de ADs sobre los Ppar $\gamma$ , sin embargo la activación del receptor PPAR $\gamma$  podrían tener efecto antidepresivo, ya que su agonismo inhibe la enzima GSK3 $\beta$  (un posible mecanismo ADs) en neuronas (Inestrosa et al., 2005).

### 1.7. Notch1

El tratamiento crónico con fluoxetina activa la vía de Notch en el hipocampo aumentando tanto la expresión de ARNm como de proteína, este efecto sobre Notch se acompaña de un incremento en la proliferación y la supervivencia celular que pueden contribuir a incrementar la neurogenesis en hipocampo inducida por ADs (Yuxiu et al., 2009).

En nuestro modelo, fluoxetina no modifica la expresión de *Notch-1* en las CPH ni en la Cx de los cultivos de rodajas, si observamos incremento, precoz, de *Notch-1* en el Hp de acuerdo con los datos publicados. Estos resultados pueden sugerir que el incremento de *Notch-1* no se produce en las células proliferativas (caso de las CPH) si no en algún otro de los componentes del nicho ulceroso. La ausencia de cambios en Cx nos podría indicar que fluoxetina modula la participación de *Notch-1* en neurogénesis más que en procesos de plasticidad.

El papel específico de Notch1 en la neurogénesis adulta SVZ no se ha determinado. Notch1 es necesaria para mantener in vitro la neurogenesis en adulto (Nyfeler et al., 2005). Esta vía de

señalización inicialmente inhibe la diferenciación neuronal determinando al mismo tiempo el destino de células gliales, y promoviendo la diferenciación de astrocitos, mientras que inhiben la diferenciación de neuronas y oligodendrocitos (Grandbarbe et al., 2003).

La participación de Notch en mantener un depósito de células indiferenciadas y garantizar la neurogénesis continua durante la vida adulta, su papel en la formación de dendritas parece estar restringida a la inmadurez de las neuronas durante el desarrollo, ya que la activación Notch 1 en las neuronas postmitóticas maduras no tiene ningún efecto sobre la arborización dendrítica (Dahlhaus et al 2008).

### 1.8. Vegf

Algunos estudios han demostrado la colocalización del receptor de Vegf, Flk-1 y doblecortina (un marcador de neuronas inmaduras) estos datos parecen indicar que la vía de Vegf participa en la expansión de los progenitores neuronales intermedios (Jin et al., 2002). La expansión de estas células es estimulada por diferentes procesos como la actividad del hipocampo, el ejercicio físico, las convulsiones, y los fármacos ADs incluida la fluoxetina (Brandt et al., 2003; Encinas et al., 2006; Jessberger et al., 2005; Kempermann et al., 2004; Kronenberg et al., 2003).

En nuestro estudio, el tratamiento de las CPH con fluoxetina 1  $\mu$ M incrementa el nivel de expresión de *Vegfa* a partir de las 16 horas hasta las 72 horas, en cerebro no se ha observado incremento en la expresión de *Vegfa* en tejido (Hp o Cx) tratado con fluoxetina.

Una cuestión importante es si la proliferación celular mediada por Vegf en el cerebro adulto es debida a una acción directa de Vegf sobre progenitores neuronales o a una acción indirecta mediante la estimulación y liberación de factores de crecimiento de las células del entorno (astrocitos o células endoteliales) (Louissaint et al., 2002). Los datos de nuestro estudio parecen indicar que el efecto es directo sobre progenitores celulares ya que observamos un efecto en las CPH pero no en el Hp o la Cx de cultivos organotípicos de rodajas de cerebro, no podemos descartar que la baja dosis de fluoxetina utilizada en este estudio se insuficiente para poder ver los efectos en tejido cerebral.

## 2.- MODULACION DE GENES POR LA PAROXETINA

La paroxetina es un fármaco antidepresivo, inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS), con efecto ansiolítico. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la mejora de la sintomatología ni en las tasas de respuesta entre fluoxetina y paroxetina (Cipriani et al., 2007)..

En nuestro estudio, si hemos encontrado diferencias entre los genes modulados por fluoxetina y paroxetina tanto en CPH como en los cultivos de rodajas de cerebro. Además, paroxetina modula distintos genes en las CPH frente al Hp y la Cx.

En las CPH la paroxetina incrementa tardíamente la expresión de *Ctnnb1*, *c-Jun* y *Ppar $\gamma$*  y durante todo el periodo de tratamiento *c-Myc*. A diferencia de fluoxetina, no modula *Axin1*, *Cnd1* ni *Vegfa*.

En los cultivos de rodajas de tejido, la paroxetina sólo modifica en el Hp *Axin2*, *c-jun*, *Notch-1* y *Vegfa*, en HP y Cx *c-Myc* y *Ppar $\gamma$*  no son regulados ni en Hp ni en Cx; *Axin-1*, *Ctnnb1* ni *Ccnd1*

### 2.1 *Axin* y *Ctnnb1*( $\beta$ -catenina)

*Axin* no es un gen regulado por paroxetina, en el caso de *Axin-1* no se modifica ni en CPH ni en los cultivos de rodaja de cerebro, en el caso de *Axin-2* sólo encontramos un leve incremento en el hipocampo a los 3 y 7 días de administrar una dosis baja de 1  $\mu$ M de paroxetina. Dada la ausencia de incremento de *Ctnnb1* por paroxetina, sería adecuado pensar que no se precisa el efecto modulador negativo de *Axin-1* sobre los niveles intracelulares de *Ctnnb1* en el tratamiento con paroxetina (Kikuchi, 1999; Lustig, Jerchow et al. 2002).

Al igual que encontramos con fluoxetina, la paroxetina incrementa la expresión de Axin-2 en el Hp a los 3 y 7 días de tratamiento con 1 $\mu$ M de paroxetina, sin cambios en  $\beta$ -catenina, el incremento fue mucho menor que el obtenido con fluoxetina. Estos datos, apoyan la hipótesis postulada con fluoxetina de que, además su papel regulador de  $\beta$ -catenina, otras deben de ser las funciones de *Axin-2*, un gen inducible como por ejemplo para coordinar la proliferación y la diferenciación de progenitores neuronales en el cerebro (Fang et al., 2013).

## 2.2 Genes de respuesta rápida *c-myc* y *c-jun*

En las CPH, el incremento en la expresión de *c-myc* producido por paroxetina fue máximo a la hora, manteniéndose los niveles de expresión del gen elevados durante las 72 horas del estudio. Ambos ISRS (fluoxetina y paroxetina) producen un incremento mantenido en la expresión del gen. El incremento en la expresión de *c-Jun* fue tardío a partir de las 16 horas de tratamiento.

En el tejido cerebral, el tratamiento con paroxetina incrementa de forma dosis dependiente la expresión de *c-Myc*, en el Hp pero no en la corteza, el incremento obtenido fue similar a 1, 3 y 7 días para Hp, en la Cx, el incremento fue mayor tras 7 días con la dosis alta. En el caso de *c-Jun*, la paroxetina incrementa su expresión sólo en Hp a partir de los 3 días de tratamiento

Al igual que ocurre con fluoxetina encontramos una discrepancia entre el efecto proliferativo de *c-Myc* y el incremento de su expresión en CPH y rodajas en cultivo, ya que ambos ISRS incrementan de forma importante la expresión de *c-Myc* sin un efecto paralelo en la proliferación celular, que sólo se observó en ambos casos en las CPH. Tampoco podemos explicar el incremento de *c-Myc* como respuesta a la activación de  $\beta$ -catenina ya que no es modificada por el tratamiento.

No podemos descartar el papel de *c-Myc* en la apoptosis en respuesta a diversos estímulos en neuronas post mitóticas {McGahan, 1998 #3572; Nakai, 2000 #3575}. Aunque no hemos visto a los tiempos estudiados una importante división celular.

*c-Jun* está implicado en numerosas funciones celulares, como la proliferación celular, la apoptosis, la supervivencia celular y la morfogénesis {Mechta-Grigoriou, 2001 #5074}. Se ha descrito que varios antidepresivos, principalmente inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS La paroxetina y la fluoxetina) y algunos antidepresivos tricíclicos (TCAs clomipramina), poseen actividad apoptótica en líneas celulares neuronales y gliales. Estos cambios apoptóticos fueron precedidos por aumento rápido en los niveles de *c-Jun*. (Levkovitz Y, et al 2005) (Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines: evidence for p-c-Jun, cytochrome c, and caspase-3 involvement. Levkovitz Y1, Gil-Ad I, Zeldich E, Dayag M, Weizman A.). En nuestro estudio, la paroxetina, incrementa débilmente los niveles de *c-Jun* en las CPH y en el Hp. Estos datos junto con los obtenidos con *Axin-2* podrían indicar que tanto fluoxetina como paroxetina inducen un efecto apoptótico que contrarresta el efecto proliferativo, lo que justificaría la ausencia de cambios en la proliferación.

## 2.3. *Ccnd1*

Paroxetina no modificó la expresión de *Ccnd1* ni en las CPH, ni en el HP ni en la Cx para ninguna de las dosis o tiempos estudiados

Otros estudios, encuentran una expresión regulada a la baja de *Ccnd1* tras el tratamiento crónico paroxetina, en hipocampo de rata (McHugh et al., 2008). Diferencias en la vía, dosis y tiempo de administración pueden ser responsables de estas diferencias.

## 2.4. *Ppar- $\gamma$*

La paroxetina incrementa la expresión de *Ppar- $\gamma$*  a las 16 horas en las CPH. El tratamiento de las rodajas de cerebro incrementa la expresión de *Ppar- $\gamma$*  a dosis altas en el Hp a todos los tiempos estudiados y en la Cx para todas las dosis y tiempos estudiados. El efecto de paroxetina fue diferente al observado tras el tratamiento con fluoxetina en el cerebro, fluoxetina inhibe mientras que paroxetina incrementa la expresión de *Ppar- $\gamma$* , esto podría mediar un efecto ADs ya que los

agonistas de receptor PPAR $\gamma$  inhiben la enzima GSK3 $\beta$  (un posible mecanismo ADs) en neuronas (Inestrosa et al., 2005).

### 2.5. *Notch1* y *Vegf*

Paroxetina, a diferencia de la fluoxetina, no modifica la expresión de *Notch1* ni *Vegf* en las CPH, incrementa la expresión de forma dosis dependiente para *Notch1* y sólo a dosis altas para *Vegf* en Hp pero no en Cx de cultivos organotípicos de rodajas de cerebro.

En nuestro estudio, paroxetina al igual que fluoxetina, incrementan la expresión de *Notch1* en el Hp pero no en la Cx. Otros estudios con tratamiento crónico con fluoxetina encuentran una activación la vía de Notch en el hipocampo (Yuxiu et al., 2009) efecto Notch que se acompaña de un incremento en la proliferación y la supervivencia.

La hipótesis de que el efecto de la fluoxetina sobre el incremento de *Notch1* no se produce en las células proliferativas (caso de las CPH) si no en algún otro de los componentes del nicho, junto a la ausencia de cambios en Cx, se reproducen con la paroxetina, por lo que nos podría indicar que los ISRS modula la participación de *Notch1* en neurogenesis más que en procesos de plasticidad.

Una cuestión importante es si la proliferación celular mediada por *Vegf* en el cerebro adulto es debida a una acción directa de *Vegf* sobre progenitores neuronales o a una acción indirecta mediante la estimulación y liberación de factores de crecimiento de las células del entorno (astrocitos o células endoteliales) (Louissaint et al., 2002). Los datos de paroxetina, al contrario de la fluoxetina, parecen indicar que el efecto es indirecto mediante la estimulación y liberación de factores de crecimiento de las células del entorno ya que observamos un efecto en el Hp pero no en las CPH o la Cx de cultivos organotípicos de rodajas de cerebro.

## 3.- MODULACION DE GENES POR LA VENLAFAXINA

Varios estudios doble ciego demuestran una eficacia de la venlafaxina en el tratamiento de la depresión similar a los antidepresivos tricíclicos amitriptilina e imipramina, y es mejor tolerada que la amitriptilina. Su eficacia es similar o mejor que la sertralina y fluoxetina, dependiendo de los criterios y escalas de valoración utilizadas. Las dosis mayores de venlafaxina son más eficaces, y más pacientes alcanzaron la remisión completa o "mejoraron mucho". Un metaanálisis que comparaba la venlafaxina y grupos combinados de ISRS o antidepresivos tricíclicos mostró la superioridad de la venlafaxina. REFERENCIA Juzgado por los mismos criterios, la venlafaxina fue similar en eficacia al antidepresivo atípico bupropion (Wellbutrin), sin embargo, la tasa de remisión fue significativamente menor para la venlafaxina (Thase et al., 2006). En un estudio doble ciego, los pacientes que no respondieron a un ISRS fueron cambiados a la venlafaxina o al citalopram. Se observó una mejora similar en ambos grupos (Lenox-Smith et al., 2008).

### 3.1. *Axin* y $\beta$ -*catenina*

En las CPH la venlafaxina incrementa de forma precoz la expresión de *Axin-1* y *Axin-2*, el incremento se produce a la hora y se mantiene durante 16 horas y es paralelo al incremento de *Ctnnb1* ( $\beta$ -catenina), por lo que vuelve a ser difícil explicar el incremento de *Axin* como regulador negativo de los niveles de  $\beta$ -catenina. En células progenitoras de oligodendrocitos inmaduros, la manipulación farmacológica de los niveles de *Axin-2* promueve la diferenciación acelerada de los oligodendrocitos (Fancy, Harrington et al. 2011). Una acción similar sobre la maduración de las células neuronales podría ser mediada por venlafaxina a través de *Axin-2* en nuestro modelo.

En cultivos organotípicos de cerebro, la venlafaxina modifica de forma significativa, la expresión de *Axin-1* en Hp pero no en Cx. *Axin-1* ha demostrado actuar como miembro limitante de la velocidad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, su expresión a niveles bajos en comparación con otros componentes de la vía (Lee, Salic et al. 2003) puede sugiere que pequeños cambios en los niveles de *Axin-1* podría tener importantes efectos sobre la actividad de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina.

Además, dentro de la vía Wnt, *Axin-1* puede sufrir un cambio de localización desde el citoplasma a la membrana. De hecho, la proteína LRP5/6 es capaz de reclutar *Axin1* en la

membrana con la disminución de la concentración de *Axin-1* en el citoplasma y el aumento de la transcripción de  $\beta$ -catenina (Tolwinski, Wehrli et al. 2003).

El tratamiento de las rodajas de cerebro con venlafaxina modifica la expresión de *Axin-2* tanto en hipocampo como en corteza, con un curso temporal no compatible con que su incremento responda a una regulación negativa de los niveles de  $\beta$ -catenina.

En relación a la  $\beta$ -catenina, la venlafaxina produce un incremento importante de *Ctnnb1* en las CPH y en el Hp, el incremento fue menor y a dosis mayores en la Cx. El tratamiento crónico in vivo en la rata con la venlafaxina (Mostany, Valdizan et al. 2008), aumenta la expresión de  $\beta$ -catenina en el hipocampo, incremento que se correlaciona con la activación de la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina, y se asocia a un aumento en la proliferación y un comportamiento antidepresivo-like (Mostany, Valdizan et al. 2008). En nuestro estudio, el incremento de  $\beta$ -catenina inducido por venlafaxina puede asociarse a la activación de la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina, y a un aumento en la proliferación celular tanto en las CPH como en el Hp.

### 3.2 Genes de respuesta rápida *c-Myc* y *c-Jun*

En nuestro estudio el tratamiento de las rodajas de cerebro con venlafaxina incrementa la expresión de *c-Myc* y *c-Jun* en Hp y Cx. En el Hp el incremento de la expresión es tiempo dependiente mientras que en la Cx es dosis dependiente. En las CPH venlafaxina produce un incremento rápido, breve y escaso en la expresión de *c-Myc* y *c-Jun*.

A diferencia de los ISRS como fluoxetina y paroxetina que producen un incremento importante en la expresión de *c-Myc*, la venlafaxina produce un incremento en la expresión de *c-Myc*, breve, débil y corto sobretodo en CPH. Por el contrario el incremento de expresión producido por venlafaxina sobre *c-Jun* o  $\beta$ -catenina es mayor que el observado con ISRS. Estos datos parece indicar que  $\beta$ -catenina y/o *c-Jun* pero no *c-Myc* están implicados en la proliferación neuronal inducida por venlafaxina. En CPH el incremento en la proliferación es paralelo al incremento de *c-Myc*.

Tampoco podemos explicar el incremento de *c-Myc* o *c-Jun* como respuesta a la activación de  $\beta$ -catenina ya que en el tejido, el incremento en la expresión de *c-Myc* es anterior al incremento de  $\beta$ -catenina.

Como se ha comentado para los ISRS, es posible que los fármacos ADs produzcan un efecto apoptótico mediado por el incremento en la expresión de *c-Jun* (Levkovitz Y, et al 2005) que contribuya a regular la tasa de proliferación celular o el tipo de células que proliferan.

### 3.3. *Ccnd1* y *Ppar- $\gamma$*

En nuestro estudio el tratamiento con venlafaxina incrementa la expresión de *Ccnd1* en las CPH, en el Hp y en la Cx, siendo el efecto precoz. Determinados estudios han demostrado que el tratamiento antidepresivo con sertralina (Anacker 2014) o fluoxetina (Zusso et al ----) upregula la expresión de *Ccnd1*, nuestros resultados demuestran que otros antidepresivos como los ISRS, incrementan la expresión de *Ccnd1* Tanto en células como en tejido.

A pesar de su presencia en las neuronas del giro dentado adulto, CCND1 no parece esencial para la neurogénesis en los adultos, su ablación tiene poco o ningún efecto sobre la proliferación celular (Fantl, et al 1995; Sicinski, Donaher et al. 1995). La sobreexpresión de CCND1/*cdk4* durante el desarrollo promueve la expansión de progenitores neurales y inhibe la maduración de las neuronas, la reducción de CCND1 tiene el efecto opuesto (Lange, Hüttner et al 2009). Por lo tanto, el efecto de venlafaxina al incrementar la expresión de ciclina D1 en hipocampo puede ser la ampliación de los progenitores neuronales, retrasando su diferenciación a neuronas maduras.

Alternativamente, *Ccnd1* puede tener funciones independientes de promover la progresión del ciclo celular en el cerebro, en las células progenitoras diferenciadas, la localización nuclear de CCND1 induce apoptosis, (Sumrejkanchanakij, Tamamori-Adachi et al. 2003). Además ciclina D1 juega un papel claro en la determinación de destino neuronal independiente de su función de ciclo celular genera un nicho de importancia biológica para las

actividades de regulación transcripcionales que se han descubierto de esta proteína reguladora de múltiples funciones (Glickstein, Alexander et al. 2007). No está clara cuál sería la consecuencia del incremento de *Ccnd1* En la corteza, donde los procesos de neurogénesis son escasos, no podemos descartar que, a través de su actividad transcripcional, *ccnd1* regule otras funciones implicadas en la plasticidad neuronal.

En nuestro estudio, venlafaxina incrementa la expresión de *Ppar-γ* en las CPH de forma similar a los ISRS, así como en la Cx de las rodajas de cerebro en cultivo, en el Hp el incremento sólo se observó a dosis altas y de forma tardía 3 y 7 días. En Cx, el nivel de expresión fue mayor al obtenido con los ISRS.

PPAR- $\gamma$  es importante en la regulación del desarrollo temprano del cerebro y tras lesión cerebral (Katayama 2005). Las células madre neurales aisladas a partir de embriones de ratón expresan altos niveles de PPAR- $\gamma$ . La supresión de la expresión de la proteína PPAR- $\gamma$  reduce significativa la tasa de crecimiento celular en células madre neural (Katayama 2005). De manera similar, la activación de la vía de PPAR- $\gamma$  por los agonistas estimuló la proliferación y diferenciación de células madre neurales. Pese a todos estos efectos sobre la proliferación, ni los ISRS ni la venlafaxina incrementan de forma importante la expresión de pPAR $\gamma$  en el hipocampo, este efecto proliferativo podría verse en la CPH, pero con incrementos de Ppar $\gamma$  similares por ISRS y venlafaxina, el efecto proliferativo en las CPH fue mayor tras venlafaxina que con los ISRS.

Sería importante dilucidar el papel de la importante expresión de pPAR $\gamma$  inducido por venlafaxina en la Cx de rodajas de cerebro en cultivo, sería también importante valorar este efecto sobre la formación de nuevas sinapsis en la Cx o sobre otros fenómenos plásticos.

### 3.4. *Notch1* y *Vegf*

En nuestro estudio, el nivel de expresión de *Notch1* tras el tratamiento con venlafaxina incrementó de forma tardía en las CPH, no así en el Hp donde el incremento fue débil pero rápido, no observamos incremento de la expresión de *Notch1* en la Cx de los cultivos de rodajas. El efecto de la venlafaxina sobre *Notch1* fue similar al observado tras el tratamiento con los ISRS, el incremento se produce solo en Hp. La señalización de Notch parece estar implicada en la regulación de identidad de la célula nicho y plasticidad. Un estudio reciente demostró una importante interacción entre la señalización del receptor de EGF y Notch en el mantenimiento de las células madre y progenitoras neuronales en la SVZ adulto.

Por lo tanto, se requiere la señalización de Notch para mantener un depósito de células indiferenciadas y garantizar la neurogénesis continua durante la vida adulta. El papel de la señalización de Notch en la formación de dendritas parece estar restringida a la inmadurez de las neuronas en desarrollo, ya que se demostró que la activación Notch en las neuronas postmitóticas maduras no tendrían ningún efecto sobre la arborización dendrítica (Dahlhaus, Hermans et al. 2008).

Nuestros resultados muestran que la venlafaxina no modifica la expresión de *Vegf* en las CPH, pero incrementa de forma importante, dosis y tiempo dependiente y de forma precoz, la expresión de *Vegf* en el Hp y la Cx de las rodajas de cerebro en cultivo.

Algunos estudios han demostrado la colocalización del receptor de *Vegf*, Flk-1 y la doblecortina (un marcador de neuronas inmaduras) estos datos parecen indicar que la vía de *Vegf* participa en la expansión de los progenitores neuronales intermedios (Jin et al., 2002). La expansión de estas células es estimulada por diferentes procesos que también incrementan la expresión de *Vegf*. como el ejercicio físico, estabilizadores del ánimo como lamotrigina y los fármacos ADs incluida la fluoxetina (Newton, Collier et al. 2003; Altar, Laeng et al. 2004; Warner-Schmidt, Madsen et al. 2008 ; E, Burns et al. 2014; Warner-Schmidt, Madsen et al. 2008; Brandt et al., 2003; Encinas et al., 2006; Jessberger et al., 2005; Kempermann et al., 2004; Kronenberg et al., 2003). Nuestros resultados en el Hp apoyarían estos datos, sin embargo la ausencia de incremento en la expresión de *Vegf* en el cultivo de CPH no apoyaría la participación de la vía *Vegf* en la proliferación en estas células,

Una cuestión importante es si la proliferación celular mediada por Vegf en el cerebro adulto es debida a una acción directa de Vegf sobre progenitores neuronales o a una acción indirecta mediante la estimulación y liberación de factores de crecimiento de las células del entorno (astrocitos o células endoteliales) (Louissaint et al., 2002). Los datos de paroxetina, y venlafaxina, parecen indicar que el efecto es indirecto mediante la estimulación y liberación de factores de crecimiento de las células del entorno ya que observamos un efecto en el Hp pero no en las CPH.

Finalmente el efecto del incremento de *Vegf* en la Cx debería ser sometido a un estudio más específico.

#### 4.- MODULACION DE GENES POR EL RS 67333

Se cree que un incremento de la activación de los receptores serotoninérgicos mediada por los antidepresivos favorece la activación de diversas cascadas de señalización intracelulares, que resultan en un incremento de la expresión génica, síntesis de proteínas y liberación de BDNF (Altar, 1999). Por otro lado se han observado evidencias de que dos agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub> (RS 67333 y prucaloprida) son eficaces en test predictivos de acción antidepresiva tras tres días de tratamiento (Lucas et al., 2007; Pascual-Brazo, Castro et al. 2012), además de presentar la capacidad de estimular la frecuencia de descarga de las neuronas serotoninérgicas del rafe tras el tratamiento agudo y crónico (Lucas et al., 2005).

Investigaciones previas en nuestro equipo han demostrado que el tratamiento in vivo durante tres días, con agonista parcial del receptor 5-HT<sub>4</sub> el RS 67333 induce un incremento de la expresión del ARNm del BDNF en la región CA3 del hipocampo sin alterar los niveles en el giro dentado o el área CA1, aunque sí se observa una tendencia al incremento en estas últimas áreas (Pascual-Brazo, Castro et al. 2012). A diferencia de los antidepresivos clásicos, tres días de tratamiento son suficientes para inducir un incremento de los niveles de expresión del ARNm de BDNF (Vidal et al 2009). Esta regulación de la síntesis de BDNF podría ser consecuencia de una elevación en los niveles de serotonina en el hipocampo tras la administración de RS 67333. En este sentido se ha descrito mediante técnicas de microdiálisis que la administración por vía sistémica del agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub> renzapride incrementa la liberación de serotonina en el hipocampo (Ge y Barnes, 1996). Por otra parte, se ha mostrado que la activación de receptores 5-HT<sub>4</sub> localizados en la corteza cerebral conduce a un incremento de la actividad de las neuronas del rafe (Lucas et al., 2005).

Este mecanismo podría aplicarse igualmente a los efectos de los antidepresivos clásicos por el bloqueo del transportador de serotonina, aunque en este caso el efecto “neurotrófico” dependiente del aumento de los niveles extracelulares de serotonina no sería evidente hasta pasadas dos o tres semanas. En línea con estos resultados, un estudio más reciente (Tamburella et al., 2009) llevado a cabo con otro agonista parcial 5-HT<sub>4</sub> como es el SL. 65.0155, muestra que su administración aguda disminuye el tiempo de inmovilidad en el test de la natación forzada (FST) además de incrementar la expresión de BDNF y pCREB, reforzando así la hipótesis propuesta por Lucas et al., (2007) que sugiere que los agonistas parciales del receptor 5-HT<sub>4</sub> podrían ejercer efectos antidepresivos de forma precoz.

Nuestro grupo ha demostrado que la administración durante tres días de RS 67333 también es suficiente para activar otras vías de señalización reguladoras de neuroplasticidad: así, se ha observado que el aumento en la neurogénesis hipocampal inducida por este protocolo de administración se acompaña de un incremento significativo de la expresión de  $\beta$ -catenina, una proteína claramente implicada en las respuestas neuroproliferativas de los antidepresivos clásicos (Pascual-Brazo, Castro et al. 2012). Además este incremento tiene lugar en células progenitoras hipocampales. Todo ello refuerza la capacidad del estímulo subcrónico de los receptores 5-HT<sub>4</sub> para promover los cambios neuroplásticos que se han descrito para los antidepresivos clásicos tras varias semanas de tratamiento.

##### 4.1. Axin y $\beta$ -catenina

*Axin* es un modulador negativo de la vía canónica de Wnt (Kikuchi, 1999; Lustig, Jerchow et al. 2002). Axin1 de forma constitutiva y Axin-2 de forma inducible (Lustig, Jerchow et al. 2002) mantienen bajos niveles de  $\beta$ -catenina citoplásmica ayudando a su degradación mediante la

fosforilación dependiente de GSK3 $\beta$  que marca  $\beta$ -catenina para ser degradada en el protosoma, reducción de la cantidad de  $\beta$ -catenina disponible para la activación transcripcional (Sakanaka, Weiss et al. 1998). Estudios recientes han encontrado que *Axin1* afecta a la señalización no sólo de  $\beta$ -catenina, sino que también ejerce una función en la regulación de las vías SAPK/JNK, TGF $\beta$ , p53 y c-myc {Arnold, 2009 #2457; Salahshor, 2005 #2455}. *Axin1* regula diferencialmente estas vías mediante la formación de diferentes complejos de proteínas.

En nuestras células provenientes de cultivo primario de hipocampo el tratamiento con RS 67333 incrementa el nivel de expresión del gen de forma aguda a 1 hora de tratamiento de manera significativa luego desciende a lo largo del tiempo hasta las 16 horas de tratamiento. En tejido proveniente de cultivos organotípicos tanto en hipocampo como en corteza el tratamiento con la dosis más elevada de fármaco incrementa el nivel de expresión de manera tiempo dependiente de igual manera en ambas estructuras.

El incremento de expresión de *Axin-1* y *2* ha sido más marcado con venlafaxina y Rs 67333 que con los ISRS, tanto en CPH como en tejido de Hp y Cx (sobretudo tras RS 67333). En el caso de los ISRS no puede postularse que *Axin* incrementa su expresión de forma secundaria al incremento de  $\beta$ -catenina para regular sus niveles, por el contrario, tras tratamiento con venlafaxina y Rs 67333 y sobretudo en CPH, pero no en el tejido, el mayor incremento de *Axin* si podría ser secundario al incremento de  $\beta$ -catenina

En nuestro caso el tratamiento de CPH con RS 67333 modula un rápido aumento de la expresión del gen de  $\beta$ -catenina desde 1 hora y durante las primeras 16 horas de tratamiento, siendo más fuerte durante la primera hora de exposición al fármaco. En tejido, tanto en hipocampo como en corteza el incremento del nivel de expresión del gen se observa a los 3 días siendo mayor el incremento en el Hp que en la Cx.

En el caso de  $\beta$ -catenina por tanto, podríamos sugerir que los ISRS (fundamentalmente fluoxetina) incrementan su expresión sólo en CPH siendo el efecto intermedio en el tiempo, Por el contrario, venlafaxina y Rs 67333 incrementan de forma importante su expresión tanto en CPH como en tejido siendo el efecto más rápido en las CPH donde el incremento se observa ya desde la primera hora. En el tejido tanto venlafaxina como Rs 67333 incrementan la expresión de  $\beta$ -catenina a los 3 días de tratamiento en el Hp como en Cx para *Axin 1* tanto con venlafaxina como con RS 67333 pero la intensidad del efecto es mayor con venlafaxina que con Rs 67333. De forma paralela, el estudio de la expresión de  $\beta$ -catenina proteína muestra que los ISRS como fluoxetina y paroxetina no modifican el nivel de expresión de la proteína en CPH, por el contrario venlafaxina y RS 67333 producen un incremento importante de la expresión de la proteína en las CPH. El nivel de expresión en nuestro modelo de tejido no pudo realizarse por el bajo grado de expresión de la proteína.

Por tanto podríamos sugerir que, de todos los ADs estudiados la venlafaxina es el fármaco que más incrementa la expresión de  $\beta$ -catenina

#### 4.2 Los IEGs (genes tempranos inmediatos) *c-myc* y *c-jun*

El tratamiento con RS 67333 produce un patrón de expresión de *c-Myc* y *c-Jun* similar al observado con fluoxetina tanto en las CPH como en las rodajas de cerebro, aunque el nivel de expresión alcanzado tras el tratamiento con RS 67333 fue mucho mayor que el observado con venlafaxina tanto para *c-Myc* como para *c-Jun* en el Hp y en la Cx.

El incremento en la expresión de *c-myc* y *c-jun* fue paralelo al incremento de la proliferación celular tanto en las CPH como en los cultivos de rodajas de cerebro para los distintos ADs estudiados. De hecho estos genes tempranos inmediatos, en nuestro caso *c-Myc* pueden considerarse un buen candidato para el estudio de las etapas iniciales del crecimiento neuronal y posiblemente de la plasticidad sináptica (Abraham 1991), ya que se cree que desencadenan cascadas de expresión génica neuronal que conducen a eventos plásticos en las neuronas. (Abraham 1991). El papel de *c-Myc* en el inicio y progresión del ciclo celular, se refleja en el grado de proliferación tanto en las CPH como en el GD del hipocampo, el aumento de *c-Myc* en la Cx inducido por todos los ADs aunque a distinto nivel, puede reflejar otro tipo de eventos plásticos como formación de dendritas o botones sinápticos que no incluyen la proliferación celular.

### 4.3. *Ccnd1* y PPAR- $\gamma$

En las CPH el tratamiento con RS67333 produce un leve incremento del nivel de expresión *Ccnd1* a las 4 horas, efecto similar al observado con el tratamiento con venlafaxina pero no con los ISRS. En el tejido, el RS 67 333 incrementa de forma precoz la expresión de *Ccnd1*, siendo el efecto mayor en el Hp que en la Cx a diferencia de venlafaxina o fluoxetina que producen un incremento mayor en la Cx o la paroxetina que no modifica la expresión de *ccnd1* en el tejido. Estas regiones son conocidas por ser sitios de neurogénesis en el cerebro adulto; alternativamente, CCND1 puede tener funciones independientes de promover la progresión del ciclo celular en el cerebro.

Además del incremento en la expresión de *Ccnd1* por sertralina (Anacker 2014) y fluoxetina (Zusso. et al 2008), nuestro estudio demuestra que otros ADs como venlafaxina, el RS 67333 y en menor grado la paroxetina, también upregula la expresión de *Ccnd1*. Es importante destacar las diferencias en el tiempo, intensidad y localización del incremento de *ccnd1*, estas diferencias posiblemente estén implicadas tanto en los genes cuya transcripción da lugar al incremento de *ccnd1* o los genes a los que *ccnd1* da lugar a una modulación de la transcripción, además no hay que olvidar que las diferencias en la localización de *Ccnd1* serán importantes para los procesos funcionales regulados, así el incremento de *Ccnd1* en la Cx, una zona con esa capacidad neurogenética, no estará implicada en la iniciación y proceso del ciclo celular, como puede ocurrir en el Hp y las CPH, pero puede participar en otros procesos plásticos.

Varios datos han contribuido a la implicación de los agonistas *Ppar $\gamma$*  en la depresión, su expresión en Hp, el incremento, por sus agonistas, en la proliferación y diferenciación de células madre neurales; el efecto antiinflamatorio conocido el componente inflamatorio en la depresión existe (Maes, 1995) y la inhibe la enzima GSK3 $\beta$  (un posible mecanismo ADs) en neuronas por los agonistas de receptor PPAR $\gamma$  (Inestrosa et al., 2005). La supresión de la expresión de la proteína PPAR- $\gamma$  reduce significativamente la tasa de crecimiento celular en células madre neural (Katayama 2005).

En nuestro modelo de CPH, el tratamiento con RS 67333 incrementa la expresión del gen al inicio del tratamiento pero disminuye su expresión a partir de las 24 horas. En los cultivos de rodaja de cerebro, el RS 67333 disminuye la expresión del gen tanto en Hp como en Cx a los 3 días de tratamiento, en la corteza, 1 día de tratamiento con RS 67333 produce un leve incremento en la expresión de PPAR- $\gamma$ .

El descenso en la expresión de *Ppar $\gamma$*  tras el tratamiento con Rs 76333 se acompaña de un descenso significativo de la actividad transcripcional de *Ppar $\gamma$*  en extractos nucleares del hipocampo de las rodajas de cerebro en cultivo.

Dados nuestros conocimientos actuales, es difícil explicar el papel de la inhibición de la expresión de *Ppar $\gamma$*  en el importante efecto proliferativo de este fármaco.

### 4.4. *Notch1* y *Vegf*

En CPH RS 67333 produce un incremento tardío (a partir de las 24 h) en la expresión de *Notch-1*. En las rodajas de cerebro en cultivo, Rs67333 incrementa la expresión del gen de forma precoz e intensa en el Hp siendo este nivel de expresión mayor al observado con venlafaxina. En la corteza RS 67 333 incrementa el nivel de expresión de *Notch-1* de forma tardía y más leve.

La señalización de *Notch* también está implicada en la regulación neurogénica. *Notch* está implicado en el mantenimiento de las células madre y progenitoras neuronales en la SVZ adulto. Que permite mantener un depósito de células indiferenciadas que garantiza la neurogénesis continua durante la vida adulta. El papel de la señalización de *Notch1* en la formación de dendritas parece estar restringida a la inmadurez de las neuronas en desarrollo, ya que se demostró que la activación Notch 1 en las neuronas postmitóticas maduras no tendrían ningún efecto sobre la arborización dendrítica (Dahlhaus et al 2008). El mantenimiento de un depósito de células indiferenciadas inducido por *Notch-1*, puede contribuir, dado el efecto de RS 67333 sobre este gen, a que RS 67333 pueda producir una mayor tasa de proliferación celular que otros fármacos como la venlafaxina con un efecto menor y más tardío sobre *Notch-1*.

Además de sus propiedades angiogénicas y neuroprotectoras, el *Vegf* está implicado en la neurogénesis adulta, promoviendo la proliferación y la diferenciación de precursores neuronales (Louissaint A Jr et al 2002). Además, se ha demostrado que la administración intracerebroventricular de *Vegf* estimula la neurogénesis en adultos en la zona subventricular y subgranular del giro dentado del hipocampo (Jin K et al 2002) y promueve el subsiguiente crecimiento de neuritas (Khaibullina et al 2004).

En las CPH RS 67333 induce un leve y precoz incremento de *Vegf*. En las rodajas de cerebro en cultivo, RS67333 incrementa la expresión de *Vegf* de forma precoz e intensa sobre todo a dosis altas en el Hp y en la Cx. Efecto similar al observado con venlafaxina.

Nuestros resultados demuestran un perfil diferenciado de la expresión entre venlafaxina y RS 67333 respecto a vías asociadas a cambios de tipo neuroplástico/neuroproliferativo: venlafaxina incrementa más la expresión del mRNA de una gran parte de los genes implicados en la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina mientras que RS67333 aumenta más la expresión de los genes como *Ccnd1*, *Notch1* o *Vegf*. Esta regulación fármaco-dependiente de la neuroplasticidad puede explicar las diferencias temporales existentes en la neurogénesis y en el inicio de la acción antidepressiva-like en modelos animales de RS 67333.

## 5.- IMPLICACIÓN DE SNP DE LA VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA EN LA ETIOPATOGENIA DEL ADEPRESIÓN

La vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina juega un rol central en los procesos de diferenciación celular así como en el control de la expresión génica durante el desarrollo y en la vida adulta. Es una vía tremendamente conservada en la evolución, lo que muestra la importancia funcional de la misma. Dada la reciente implicación de la vía de señalización y algunas de sus proteínas ( $\beta$ -catenina, *GSL3 $\beta$* ) en la depresión y en el efecto de los fármacos ADS, hemos seleccionado diferentes SNPs pertenecientes a genes que codifican proteínas de esta vía de señalización en búsqueda de una posible asociación entre alteraciones genéticas en estas proteínas y pacientes con alteraciones del ánimo.

A pesar de que los intrones abarcan el 90% de la secuencia de un gen, la mayoría de las mutaciones conocidas están situadas en secuencias exónicas. Sin embargo, ha aumentado el número de nuevas variantes patológicas situadas en intrones. Recientemente, muchas mutaciones relacionadas con algún tipo de enfermedad se han asociado a procesos de splicing (empalme) erróneos. La mayor parte de las mutaciones que de este tipo irrumpen en sitios altamente conservados (GT/AG) del exon-intron. El empalme alternativo es un mecanismo dominante que enriquece la diversidad proteómica, regulando el desarrollo, y la especificidad de cada tejido, produciendo varias transcripciones partiendo de un gen original (Wang y Martin, 2006).

### 5.1. *AKT1*

Los SNP estudiados del gen *AKT1* han sido el rs1130214 cuyo alelo T presenta efecto protector al trastorno bipolar en varones y el rs1130233 cuyo alelo G aumenta el riesgo trastorno bipolar en mujeres y de depresión mayor en varones.

No hemos encontrado datos en la bibliografía que estudien la relación de estos SNP y la depresión, sin embargo, el alelo T del SNP rs1130214 y el alelo G del SNP rs1130233 se han asociado con el desarrollo de esquizofrenia cuando se forma el haplotipo T-C-G de los SNPs rs1130214, rs3730358 y rs1130233 del gen Emamian et al (2004)

Recientemente, {Thiselton, 2008 #103} se sugirió que el efecto potencial del SNP (rs1130214) es debido a su posición en una región promotora susceptible de modificar la expresión del gen. El alelo T se encuentra dentro de un grupo de sitios potencialmente funcionales de unión de STAT3 y podría abolir una secuencia consenso para un sitio de unión de factor de transcripción, y potencialmente modificar la expresión de *AKT1* {Park, 2005 #107}.

Aunque se ha descrito que el alelo A del rs1130233 localizado en el exón 11 y que causa una mutación no sinónima en la expresión *AKT1* se asocia a deterioro cognitivo, reducción de volumen de materia gris, reducción de la expresión de *AKT1* en los linfocitos y finalmente con riesgo de

SCZ {Tan, 2008 #95}, En nuestro estudio es el alelo G el asociado a un mayor riesgo de trastorno bipolar o depresión mayor.

## 5.2. APC

Las mutaciones de APC se ha demostrado que están asociadas con algunos trastornos psiquiátricos, incluyendo la esquizofrenia, el retraso mental, y el trastorno del espectro autista {Cui, 2005 #1237; Finch, 2005 #1238; Heald, 2007 #1239; Zhou, 2007 #1247}.

Los SNP rs454886, rs13167522, y rs17290456 fueron seleccionados porque mostraron asociación con patologías asociadas al incremento de proliferación celular como el cáncer de mama en mujeres {Wang, 2008 #1537}. En nuestro estudio no se ha encontrado asociación entre el SNP rs454886 t los trastornos del ánimo pero encontramos una tendencia a asociar el alelo C de los SNPs rs13167522, y rs17290456 a un efecto protector al trastorno bipolar en mujeres y una tendencia a la asociación del alelo C del SNP rs13167522 a la depresión mayor en varones.

## 5.3. AXIN

Debido a la importancia que la activación de la vía de señalización de Wnt posee en varios tipos de carcinoma, se hipotetizó que el gen AXIN1 podría encontrarse mutado y ser responsable de su activación. AXIN1, codifica la proteína Axina-1 parte integrante del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina, con una elevada frecuencia de mutaciones (81,8%) {Kurihara, 2004 #1472}.

En un GWAS (PGC) llevado a cabo el Consorcio Psiquiátrico GWAS (PGC) que reunificaba 9 estudios GWAS en depresión mayor, incluyó 9.240 casos y 9.519 controles MDD todos de ascendencia europea con datos sobre ~ 1.2M SNPs, {Ripke, 2013 #1570} dentro de los genes estudiados, se incluyeron AXIN1 y de AXIN2 no se han encontrado asociaciones significativa entre SNP en AXIN y la depresión, no se incluyeron en el estudio los SNPs valorados en nuestro estudio .

En el caso de AXIN2, cinco SNPs entre ellos los dos seleccionados en nuestro estudio, rs7210356, rs4791171, rs11079571, rs3923087 y rs3923086 se asociaron con un mayor riesgo de cáncer de mama {Wang, 2008 #1537}

### 5.3.1.- AXIN1-rs214250-

En nuestro estudio no observamos asociación entre los alelos de este SNP y las alteraciones del ánimo estudiadas.

### 5.3.2. AXIN2-rs7210356, rs3923086-

En nuestro estudio, sólo el alelo G del SNP rs3923086 se asocia a un incremento de riesgo de depresión en varones.

En definitiva y a pesar del bajo número de SNPs estudiados parece existir una relación clara entre alteraciones génicas en el gen de AXIN (tanto AXIN-1 como AXIN2) y las alteraciones en el estado del ánimo, en nuestro estudio no podemos concluir si factores ambientales influyen en el efecto de estos SNPs

## 5.4. CTNNB1

Las mutaciones patogénicas que aparecen en el gen CTNNB1, localizado en el locus 3p21 y que codifica  $\beta$ -catenina, modifican los residuos de serina y treonina o los residuos adyacentes de su dominio regulador, codificados por el exón 3. De esta manera, se ve afectada su unión al complejo de degradación, aumentando la acumulación de la proteína en el citoplasma {Gumbiner, 1995 #1574; Orford, 1997 #1860}, lo que produce una mayor translocación hacia el núcleo. En esta localización es donde ejerce su función transcriptora, facilitándose la sobreexpresión génica que aumenta la proliferación celular y el crecimiento de la célula, desempeñando un importante papel en la formación de varios tipos de tumores {Gumbiner, 1995 #1574}.

La gran mayoría de mutaciones registradas en el gen CTNNB1 son heterocigotas, de tipo "missense" y se localizan en el exon 3. Estas alteraciones están involucradas en la patogénesis de multitud de tumores. No obstante, muchos estudios inmunohistoquímicos de  $\beta$ -catenina, muestran patrones alterados de localización de la proteína en el compartimento citoplasmático que no se relacionan con las mutaciones encontradas en esta región {Kobayashi, 1999 #1864; Machin, 2002 #1866; Palacios, 1998 #1865}. Teniendo en cuenta que los genes regulados por  $\beta$ -catenina, son genes de proliferación en células con capacidad de división, se han estudiado ampliamente por su implicación directa principalmente en algunos tipos de cáncer.

Con respecto a patologías psiquiátricas se seleccionaron SNPs de  $\beta$ -catenina, entre ellos las variantes genéticas incluidas en este trabajo, como integrantes de un locus con susceptibilidad para trastorno bipolar (*Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4*. Nat Genet, 2011). En nuestro estudio en varones con diagnóstico de Trastorno Depresivo y Trastorno depresivo Grave se observa genotipo protector en los pacientes heterocigóticos para los SNPs: rs 2140090, rs3864004, rs3915129, rs6776881, rs4533622 y rs13075993. Para el subgrupo de las mujeres solo encontramos una tendencia al incremento de riesgo de depresión con el alelo dominante A del SNP rs3774369. Estos SNPs podían modificar la unión de  $\beta$ -catenina al complejo de degradación, aumentando la acumulación de la proteína en el citoplasma y su translocación al núcleo (Gumbiner., 1995; Orford et al., 1997), facilitándose la sobreexpresión de genes implicados en procesos de proliferación celular u otros procesos plásticos que protegerían del trastorno del ánimo.

Teniendo en cuenta que DAAM2 se ha descrito como alterado en pacientes psicóticos estudiamos dos SNPs que cubrieron los criterios de selección para este gen: rs3004067 y rs6937133 {Kuzman, 2009 #2038} no observamos ninguna asociación en nuestras poblaciones entre los SNP de DAAM2 y las patologías estudiadas.

## 5.6. DKK4

DKK4 codifica una proteína de la familia Dickkopf. Varias proteínas que se encuentran en el cromosoma 8p, entre ellos DKK4 que ha sido asociada a trastornos neuropsiquiátricos y otras enfermedades humanas graves, como el cáncer. Aunque el cromosoma 8p no mostró asociación en estudios de exploración de todo el genoma en esquizofrenia y trastorno bipolar. En la depresión mayor, dos estudios de ligamiento de todo el genoma en muestras de familias de pacientes con un índice de dos o más casos de aparición temprana de depresión mayor, se encontró una asociación positiva entre un historial de intentos de suicidio y varias regiones cromosómicas, entre ellas en 8p11.2-p11.1 -DKK4-(D8S1145, 37,0 cm, 18,2 Mbps,  $P < 0.0001$ ; {Zubenko, 2003 #2055; Zubenko, 2004 #2054}. Un estudio de asociación de 28 genes de señalización de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina ha descrito que la variación polimórfica en el gen DKK4 (DKK4) presenta asociación con esquizofrenia (Proitsi, P., et al., 2008).

Curiosamente, el SNP, rs2073665 de DKK4 se encontró que estaba asociado significativamente con el volumen del cerebro en 961 individuos esquizofrénicos vs sanos {Zhang, 2011 #2080}, fortaleciéndose así la evidencia para una hipótesis del neurodesarrollo en la esquizofrenia.

En nuestro estudio el SNP rs2073665 presentó asociación con incremento del riesgo de padecer Trastorno Depresivo y Trastorno Distímico en mujeres portadoras del alelo T.

## 5.7. FZD3

Por otra parte, también se examinó la posible asociación entre el gen FZD3 con trastornos de humor, esquizofrenia y trastornos del estado de ánimo, patologías que pueden compartir la vulnerabilidad genética {Berrettini, 2003 #2427}. Basándonos en estos indicios se seleccionó el SNP rs352203 que mostró un potente factor protector de psicosis que en un estudio de genotipado masivo {Kishimoto, 2008 #2442}. En nuestro caso ese efecto protector se observa entre el alelo T del SNP y los individuos diagnosticados de Trastorno Bipolar.

## 5.8. GSK3 $\beta$

En nuestro estudio, el alelo G del SNP rs12630592 y el alelo A del SNP rs6438552 se asocian a un mayor riesgo de trastorno depresivo y depresión mayor en varones.

The intronic SNP rs12630592 in GSK-3 $\beta$  gene regulate splicing, possibly triggering mechanisms of mRNA surveillance, thus affecting the abundance of the total transcript. In nonpsychiatric TT subjects, the SNP exhibited reduced GSK-3 $\beta$  mRNA, GSK-3 $\beta$  protein expression and Ser-9 phosphorylation in healthy subjects and in lymphocytes and postmortem prefrontal cortex of individuals with schizophrenia (Blasi et al. 2013).

In Parkinson disease, the A allele of rs6438552 is associated with increased levels of GSK-3 $\beta$  lacking exons 9+11 and 11, which correlated with GSK-3 $\beta$  active state and more phosphorylation of Tau target {Kwok, 2005 #1}. Our study has concordance with these statements, but the allele associated to increase GSK3 $\beta$  exon $\Delta$ 9+11 was the G one.

SNP in GSK-3 $\beta$  may have a role in the susceptibility for multiple diseases like depression diseases. En un estudio en nuestro grupo en que los homocigotos AA y GG del SNP rs6438552 ( high risk of MDD), fueron expresado en células HeLa, encontramos que cells transfected with el homocigoto AA presenta high expression of GSK-3 $\beta$  exon $\Delta$ 9+11, and increase in GSK-3 $\beta$  active state, more  $\beta$ -catenin phosphorylated una disminución de citosolic  $\beta$ -catenin vs transfected HeLa with the GG genotype.

Several lines of evidence indicate that GSK-3 $\beta$  is a good candidate molecule for MDD susceptibility and antidepressant therapeutic effect. However, to date, not all studies have found SNP of GSK-3 $\beta$  to be associated with MDD itself. The different SNPs selection, sample size or ethnic of the population could be responsible of those differences. {Caspi, 2003 #6}; Tsai, et al. 2008; Inkster et al., 2009; Zhang et al. 2010). Our result show a increase risk od MDD associated with the GA allele of rs6438552 in GSK-3 $\beta$ . Then rs643855 is associated with effects on GSK-3 $\beta$  expression and phosphorylation, which also affect downstream signaling of gene expression with possible effect on the neuronal function of relevance to MDD or antidepressant treatment.

## 5.9. WNT

Las proteínas Wnt son una familia de moléculas que localmente activan vías de señalización, que regulan el destino celular y juegan un papel importante en malformaciones durante el desarrollo y ha sido postulada su participación en la neuroplasticidad, la supervivencia celular y la neurogénesis adulta {Nusse, 2005 #2315}. Varias líneas de evidencia sugieren su implicación en el trastorno bipolar {Gould, 2002 #2316}.

### 5.98.1. WNT2b

Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 1p13.2., y se ha asociado tanto a desarrollo neuronal como a carcinogénesis humana. En un estudio de genotipado masivo de la vía de señalización de Wnt para Trastorno Bipolar, los genes candidatos fueron seleccionados bien por su elevado nivel de expresión en cerebro o por su localización en regiones cromosómicas implicadas previamente en el trastorno bipolar por estudios de ligamiento. En este estudio, se detectó una asociación positiva entre el trastorno bipolar y los pacientes que tenían un alelo recesivo en el SNP rs3790606 de WNT2B{Zandi, 2008 #2317}. En nuestro estudio no observándose ninguna relación entre el SNP rs3790606 de WNT2B y ninguno de los trastornos estudiados.

### 5.9.2. WNT3

El SNP rs199494 de WNT3 se selecciono en base a que cumpliera con los criterios como posible target de asociación, y porque presenta una asociación en Parkinson {Liu, 2011 #2333}. En nuestro estudio, no observamos una asociación significativa con ninguno de los trastorno del estudio, pero encontramos una tendencia a un efecto protector del alelo G en el trastorno bipolar .

### 5.10. ZBED

El gen ZBED3 se encuentra en el cromosoma 5q13.3 y actúa como regulador de la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina estabilizando  $\beta$ -catenina en el citoplasma. En nuestro estudio no observamos una asociación significativa del SNP rs2914143 con ninguno de los trastornos del estudio, pero observamos una tendencia al efecto protector a la depresión mayor del alelo G en mujeres y al trastorno bipolar en el conjunto de la población.

Pese a que el número de SNP seleccionados para cada gen ha sido bajo, nuestros datos apoyan una clara implicación de la vía wnt/ $\beta$ catenina en la etiopatogenia de los trastornos del ánimo incluida la depresión y el trastorno bipolar, incluyendo una alteración en la funcionalidad de GSK- $\beta$  similar a la encontrada en modelos animales de depresión para el SNP rs6438552.



## **CONCLUSIONES**



### En lo relativo al Estudio de Expresión Génica podemos concluir:

1- A nivel basal la mayoría de los genes estudiados se expresan de forma similar en las CPH como en el tejido de rodajas de cerebro (Hp y Cx), salvo *Ccnd1* que se expresa de manera marcada en tejido y  $\beta$ -catenina que lo hace dos veces más en las CPH.

2- RS 67333 es el fármaco que induce una mayor proliferación celular tanto en las CPH como en los cultivos organotípicos, fluoxetina, paroxetina producen un efecto proliferativo débil o ausente

3- El nivel de expresión de *c-Myc* es incrementado por todos los ADs y tanto en CPH como en las rodajas de cerebro en cultivo, independientemente de la dosis o el tiempo de tratamiento.

4- En CPH, los ISRS mostraron un leve incremento de expresión *c-Myc*, *Ppar $\gamma$* , y  $\beta$ -catenina, fluoxetina incrementó además *Axin-1*, *Ccnd1* y *Vegf* y paroxetina elevó el nivel de expresión de *c-Jun*.

5- En el hipocampo los ISRS incrementan *Axin-2*, *c-Jun*, *Notch*, fluoxetina también incrementa *Ccnd1* y paroxetina incrementa *Ppar $\gamma$* , y *Vegf*. En la corteza fluoxetina aumentan  $\beta$ -catenina, *c-Jun* y *Ccnd1* y paroxetina incremento *c-Myc* y *Ppar $\gamma$* .

6- La velafaxina en CPH incrementa el nivel de expresión de todos los genes estudiados, salvo *Vegf*. En hipocampo incrementa el nivel de expresión de todos los genes estudiados, sobre todo de  $\beta$ -catenina, *Ppar $\gamma$* , *Notch* y *Vegf* de manera más tardía. En corteza aumenta el nivel de expresión de *Axin-2*,  $\beta$ -catenina, *c-Myc*, *c-Jun*, *Ccnd1*, *Ppar $\gamma$*  y de forma más marcada *Vegf*.

7-RS 67333 en las CPH incrementa *Axin-1*, *Axin-2*,  $\beta$ -catenina, *c-Myc*, *Ccnd1*, *Vegf* y más tardíamente *Notch*. En el hipocampo aumenta *Axin-1*, *Ccnd1*, de forma más marcada *c-Myc* y *c-Jun*, y de forma tardía *Axin-2* y  $\beta$ -catenina. En corteza, RS 67333 incrementa *Axin-1*, *c-Myc*, *Ccnd1*, de forma más marcada *Vegf* y de forma tardía *Axin-2*, *c-Jun* y *Notch*.

8- El nivel de expresión de *Ppar $\gamma$*  aumenta tras el tratamiento con ISRS y venlafaxina, pero disminuye tras el tratamiento con RS 67333. Estos cambios en expresión se correlacionaron con cambios en la actividad transcripcional de *Ppar $\gamma$* , así, la venlafaxina incremento y RS 67333 disminuyo la actividad transcripcional de *Ppar $\gamma$*  en extractos nucleares del hipocampo.

9- En conjunto, nuestros resultados muestran un perfil diferencial de expresión para los diferentes ADs, observándose aumentos discretos en el nivel expresión de los genes seleccionados con los ISRS. Venlafaxina incrementa más y de forma más temprana la expresión de genes implicados principalmente con la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, mientras que RS67333 incrementa incrementa menos y de forma más tardía la expresión de genes implicados con la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, mientras que incrementa de forma más temprana y en mayor grado la expresión de genes implicados las vías de *Ccnd1* y *Notch*.

### En lo relativo al Estudio de Genotipado podemos concluir:

1- Para *AKT1* El aleloT del SNP rs1130233 incrementa de forma significativa el riesgo de depresión mayor en varones en el modelo recesivo. Por el contrario, el alelo T del SNP rs1130214 muestra efecto protector al trastorno bipolar en varones tanto en el modelo dominante como en el recesivo.

2- El alelo G del SNP rs3923086 de *AXIN2* incrementa de forma significativa el riesgo de depresión en varones en el modelo codominante y más claramente aún en el modelo recesivo.

3- los SNPs: rs 2140090, rs3774369, rs3864004, rs3915129, rs6776881 y rs13075993 de *CTNNB1* presentan un efecto protector frente a la depresión en varones, el efecto es mayor en el caso de depresión mayor en el modelo dominante.

4- El alelo T del SNP rs2073665 del gen *DKK4*, incrementa el riesgo de depresión mayor en el subgrupo de mujeres en el modelo dominante.

5- El alelo A del SNPs rs6439552 y el alelo G del SNP rs12630592 de *GSK3 $\beta$*  muestran un incremento de riesgo de padecer algún tipo de depresión, incluida la depresión mayor en el conjunto de los paciente, tanto en el modelo codominante como para el modelo dominante. Para ambos SNPs de *GSK3 $\beta$* , el incremento del riesgo es mayor en el subgrupo de varones. En el subgrupo de mujeres no se presenta asociación de los SNPs de *GSK3 $\beta$*  elegidos con ninguna de las patologías estudiadas.

6- El alelo A del SNP rs2914143 del gen *ZBED3* muestra un efecto protector en mujeres frente a la depresión mayor en el modelo dominante .

## **BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFIA**

- (2011). "Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4." *Nat Genet* 43(10): 977-983.
- Aberle, H., A. Bauer, et al. (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." *EMBO J* 16(13): 3797-3804.
- Adachi, K., Z. Mirzadeh, et al. (2007). "Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone." *Stem Cells* 25(11): 2827-2836.
- Adachi, M., M. Barrot, et al. (2008). "Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy." *Biol Psychiatry* 63(7): 642-649.
- Adell, A., E. Castro, et al. (2005). "Strategies for producing faster acting antidepressants." *Drug Discov Today* 10(8): 578-585.
- Adler, P. N. and H. Lee (2001). "Frizzled signaling and cell-cell interactions in planar polarity." *Curr Opin Cell Biol* 13(5): 635-640.
- Al-Harbi, K. S. and N. A. Qureshi (2012). "Neuromodulation therapies and treatment-resistant depression." *Med Devices (Auckl)* 5: 53-65.
- Alberi, L., S. E. Hoey, et al. (2013). "Notch signaling in the brain: in good and bad times." *Ageing research reviews* 12(3): 801-814.
- Alberi, L., S. Liu, et al. (2011). "Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks." *Neuron* 69(3): 437-444.
- Alexopoulos, G. S., B. S. Meyers, et al. (1997). "'Vascular depression' hypothesis." *Arch Gen Psychiatry* 54(10): 915-922.
- Alfonso, J., L. R. Frick, et al. (2006). "Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments." *Biol Psychiatry* 59(3): 244-251.
- Alme, M. N., K. Wibbrand, et al. (2007). "Chronic fluoxetine treatment induces brain region-specific upregulation of genes associated with BDNF-induced long-term potentiation." *Neural Plast* 2007: 26496.
- Altman, J. (1962). "Are new neurons formed in the brains of adult mammals?" *Science* 135(3509): 1127-1128.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Post-natal origin of microneurons in the rat brain." *Nature* 207(5000): 953-956.
- Alvarez-Buylla, A. and S. Temple (1998). "Stem cells in the developing and adult nervous system." *J Neurobiol* 36(2): 105-110.
- Amit, S., A. Hatzubai, et al. (2002). "Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway." *Genes Dev* 16(9): 1066-1076.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, et al. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* 284(5415): 770-776.
- Artegiani, B., D. Lindemann, et al. (2011). "Overexpression of cdk4 and cyclinD1 triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain." *The Journal of experimental medicine* 208(5): 937-948.
- Asghari, V., J. F. Wang, et al. (1998). "Differential effects of mood stabilizers on Fos/Jun proteins and AP-1 DNA binding activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." *Brain research. Molecular brain research* 58(1-2): 95-102.
- Association, A. P. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)*. Arlington, American Psychiatric Association.
- Autry, A. E. and L. M. Monteggia (2012). "Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders." *Pharmacol Rev* 64(2): 238-258.
- Bachis, A., M. I. Cruz, et al. (2008). "Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex." *Neurosci Lett* 442(2): 104-108.
- Bajestan, S. N., A. H. Sabouri, et al. (2006). "Association of AKT1 haplotype with the risk of schizophrenia in Iranian population." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B(4): 383-386.
- Baldin, V., J. Lukas, et al. (1993). "Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1." *Genes & development* 7(5): 812-821.
- Bamji, S. X., B. Rico, et al. (2006). "BDNF mobilizes synaptic vesicles and enhances synapse formation by disrupting cadherin-beta-catenin interactions." *J Cell Biol* 174(2): 289-299.
- Bamji, S. X., K. Shimazu, et al. (2003). "Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly." *Neuron* 40(4): 719-731.
- Banasr, M. and R. S. Duman (2008). "Keeping 'trk' of antidepressant actions." *Neuron* 59(3): 349-351.
- Banasr, M., M. Hery, et al. (2001). "Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus." *Eur J Neurosci* 14(9): 1417-1424.
- Barbash, O., P. Zamfirova, et al. (2008). "Mutations in Fbx4 inhibit dimerization of the SCF(Fbx4) ligase and contribute to cyclin D1 overexpression in human cancer." *Cancer cell* 14(1): 68-78.
- Barnea, A. and F. Nottebohm (1994). "Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23): 11217-11221.
- Barroso, I., M. Gurnell, et al. (1999). "Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension." *Nature* 402(6764): 880-883.

- Beaulieu, J. M., X. Zhang, et al. (2008). "Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(4): 1333-1338.
- Beauquis, J., P. Roig, et al. (2006). "Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment." *Eur J Neurosci* 23(6): 1539-1546.
- Benedetti, F., A. Bernasconi, et al. (2004). "A single nucleotide polymorphism in glycogen synthase kinase 3-beta promoter gene influences onset of illness in patients affected by bipolar disorder." *Neurosci Lett* 355(1-2): 37-40.
- Benedetti, F., S. Dallaspesza, et al. (2012). "Gene-gene interaction of glycogen synthase kinase 3-beta and serotonin transporter on human antidepressant response to sleep deprivation." *J Affect Disord* 136(3): 514-519.
- Berezovska, O., P. McLean, et al. (1999). "Notch1 inhibits neurite outgrowth in postmitotic primary neurons." *Neuroscience* 93(2): 433-439.
- Berezovska, O., M. Q. Xia, et al. (1998). "Notch is expressed in adult brain, is coexpressed with presenilin-1, and is altered in Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* 57(8): 738-745.
- Bergami, M., R. Rimondini, et al. (2008). "Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(40): 15570-15575.
- Bergstrom, A., M. N. Jayatissa, et al. (2008). "Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression; an in situ hybridization study." *Brain Res* 1196: 41-52.
- Berrettini, W. (2003). "Evidence for shared susceptibility in bipolar disorder and schizophrenia." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 123C(1): 59-64.
- Berton, O., C. A. McClung, et al. (2006). "Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress." *Science* 311(5762): 864-868.
- Berton, O. and E. J. Nestler (2006). "New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines." *Nat Rev Neurosci* 7(2): 137-151.
- Bertrand, N., D. S. Castro, et al. (2002). "Proneural genes and the specification of neural cell types." *Nature reviews. Neuroscience* 3(7): 517-530.
- Bessa, J. M., D. Ferreira, et al. (2009). "The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling." *Mol Psychiatry* 14(8): 764-773, 739.
- Bierkamp, C. and J. A. Campos-Ortega (1993). "A zebrafish homologue of the Drosophila neurogenic gene Notch and its pattern of transcription during early embryogenesis." *Mechanisms of development* 43(2-3): 87-100.
- Blundy, J. A. (2006). "The role of CREB in depression and antidepressant treatment." *Biol Psychiatry* 59(12): 1144-1150.
- Blugeot, A., C. Rivat, et al. (2011). "Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers." *J Neurosci* 31(36): 12889-12899.
- Boldrini, M. and V. Arango (2010). "Antidepressants, age, and neuroprogenitors." *Neuropsychopharmacology* 35(1): 351-352.
- Borrell, V. and F. Calegari (2014). "Mechanisms of brain evolution: regulation of neural progenitor cell diversity and cell cycle length." *Neuroscience research* 86: 14-24.
- Bowley, M. P., W. C. Drevets, et al. (2002). "Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder." *Biol Psychiatry* 52(5): 404-412.
- Braissant, O., F. Fougère, et al. (1996). "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat." *Endocrinology* 137(1): 354-366.
- Brandenberger, R., H. Wei, et al. (2004). "Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation." *Nat Biotechnol* 22(6): 707-716.
- Brembeck, F. H., T. Schwarz-Romond, et al. (2004). "Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions." *Genes Dev* 18(18): 2225-2230.
- Bremner, J. D., M. Narayan, et al. (2000). "Hippocampal volume reduction in major depression." *Am J Psychiatry* 157(1): 115-118.
- Bremner, J. D., M. Vythilingam, et al. (2004). "Effects of glucocorticoids on declarative memory function in major depression." *Biol Psychiatry* 55(8): 811-815.
- Bremner, J. D., M. Vythilingam, et al. (2004). "Deficits in hippocampal and anterior cingulate functioning during verbal declarative memory encoding in midlife major depression." *Am J Psychiatry* 161(4): 637-645.
- Bretones, G., M. D. Delgado, et al. (2015). "Myc and cell cycle control." *Biochimica et biophysica acta* 1849(5): 506-516.
- Breunig, J. J., J. Silbereis, et al. (2007). "Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(51): 20558-20563.
- Brockington, A., C. Lewis, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor and the nervous system." *Neuropathol Appl Neurobiol* 30(5): 427-446.
- Bryja, V., G. Schulte, et al. (2007). "Wnt-3a utilizes a novel low dose and rapid pathway that does not require casein kinase 1-mediated phosphorylation of Dvl to activate beta-catenin." *Cell Signal* 19(3): 610-616.

- Bylsma, L. M., B. H. Morris, et al. (2008). "A meta-analysis of emotional reactivity in major depressive disorder." *Clin Psychol Rev* 28(4): 676-691.
- Cadigan, K. M. and R. Nusse (1997). "Wnt signaling: a common theme in animal development." *Genes Dev* 11(24): 3286-3305.
- Campbell, S. and G. Macqueen (2004). "The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression." *J Psychiatry Neurosci* 29(6): 417-426.
- Cao, L., X. Jiao, et al. (2004). "VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory." *Nat Genet* 36(8): 827-835.
- Carlezon, W. A., Jr., R. S. Duman, et al. (2005). "The many faces of CREB." *Trends Neurosci* 28(8): 436-445.
- Caspi, A., K. Sugden, et al. (2003). "Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene." *Science* 301(5631): 386-389.
- Castro, J. E., E. Varea, et al. (2010). "Role of the amygdala in antidepressant effects on hippocampal cell proliferation and survival and on depression-like behavior in the rat." *PLoS One* 5(1): e8618.
- Cavallo, R. A., R. T. Cox, et al. (1998). "Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity." *Nature* 395(6702): 604-608.
- Cerqueira, J. J., F. Mailliet, et al. (2007). "The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress." *J Neurosci* 27(11): 2781-2787.
- Ciani, L. and P. C. Salinas (2005). "WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity." *Nat Rev Neurosci* 6(5): 351-362.
- Clark-Raymond, A. and A. Halaris (2013). "VEGF and depression: a comprehensive assessment of clinical data." *J Psychiatr Res* 47(8): 1080-1087.
- Clevers, H. and R. Nusse (2012). "Wnt/beta-catenin signaling and disease." *Cell* 149(6): 1192-1205.
- Coffman, C., W. Harris, et al. (1990). "Xotch, the *Xenopus* homolog of *Drosophila* notch." *Science* 249(4975): 1438-1441.
- Conboy, L., C. M. Seymour, et al. (2007). "Notch signalling becomes transiently attenuated during long-term memory consolidation in adult Wistar rats." *Neurobiology of learning and memory* 88(3): 342-351.
- Cong, F. and H. Varmus (2004). "Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2882-2887.
- Costa, R. M., T. Honjo, et al. (2003). "Learning and memory deficits in Notch mutant mice." *Current biology : CB* 13(15): 1348-1354.
- Crowner, D., M. Le Gall, et al. (2003). "Notch steers *Drosophila* ISNb motor axons by regulating the Abl signaling pathway." *Current biology : CB* 13(11): 967-972.
- Czeh, B. and P. J. Lucassen (2007). "What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated?" *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257(5): 250-260.
- Czeh, B., T. Michaelis, et al. (2001). "Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12796-12801.
- Czeh, B., J. I. Muller-Keuker, et al. (2007). "Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment." *Neuropsychopharmacology* 32(7): 1490-1503.
- Chambers, C. B., Y. Peng, et al. (2001). "Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors." *Development* 128(5): 689-702.
- Chandran, A., A. H. Iyo, et al. (2013). "Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40: 240-245.
- Chao, M. Y., J. Larkins-Ford, et al. (2005). "lin-12 Notch functions in the adult nervous system of *C. elegans*." *BMC neuroscience* 6: 45.
- Chen, A. C., Y. Shirayama, et al. (2001). "Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect." *Biol Psychiatry* 49(9): 753-762.
- Chen, G., L. D. Huang, et al. (1999). "The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3." *J Neurochem* 72(3): 1327-1330.
- Chen, T., M. Li, et al. (2009). "Identification of zinc-finger BED domain-containing 3 (Zbed3) as a novel Axin-interacting protein that activates Wnt/beta-catenin signaling." *J Biol Chem* 284(11): 6683-6689.
- Chiba, S. (2006). "Notch signaling in stem cell systems." *Stem cells* 24(11): 2437-2447.
- Choi, S. H., Y. Li, et al. (2009). "Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF." *Mol Neurodegener* 4: 52.
- Dahmen, R. P., A. Koch, et al. (2001). "Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas." *Cancer Res* 61(19): 7039-7043.
- Dann, C. E., J. C. Hsieh, et al. (2001). "Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains." *Nature* 412(6842): 86-90.
- Datson, N. A., M. C. Morsink, et al. (2008). "Central corticosteroid actions: Search for gene targets." *Eur J Pharmacol* 583(2-3): 272-289.

- de la Pompa, J. L., A. Wakeham, et al. (1997). "Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis." *Development* 124(6): 1139-1148.
- Deardorff, M. A., C. Tan, et al. (2001). "A role for frizzled 3 in neural crest development." *Development* 128(19): 3655-3663.
- Delerive, P., J. C. Fruchart, et al. (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control." *J Endocrinol* 169(3): 453-459.
- Deng, W., J. B. Aimone, et al. (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" *Nat Rev Neurosci* 11(5): 339-350.
- Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." *Endocr Rev* 20(5): 649-688.
- Diamond, D. M., A. Campbell, et al. (2004). "Preclinical research on stress, memory, and the brain in the development of pharmacotherapy for depression." *Eur Neuropsychopharmacol* 14 Suppl 5: S491-495.
- Diehl, J. A., F. Zindy, et al. (1997). "Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway." *Genes & development* 11(8): 957-972.
- Doetsch, F., J. M. Verdugo, et al. (2002). "Lack of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 results in selective increase of transit-amplifying cells for adult neurogenesis." *J Neurosci* 22(6): 2255-2264.
- Doherty, G. H. (2007). "Developmental switch in the effects of TNFalpha on ventral midbrain dopaminergic neurons." *Neurosci Res* 57(2): 296-305.
- Dominguez-Escriba, L., V. Hernandez-Rabaza, et al. (2006). "Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus." *Eur J Neurosci* 24(2): 586-594.
- Dowell, P., J. E. Ishmael, et al. (1999). "Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein." *J Biol Chem* 274(22): 15901-15907.
- Dowlatshahi, D., G. M. MacQueen, et al. (1999). "G Protein-coupled cyclic AMP signaling in postmortem brain of subjects with mood disorders: effects of diagnosis, suicide, and treatment at the time of death." *J Neurochem* 73(3): 1121-1126.
- Dowlatshahi, D., G. M. MacQueen, et al. (1998). "Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression." *Lancet* 352(9142): 1754-1755.
- Dranovsky, A. and R. Hen (2006). "Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants." *Biol Psychiatry* 59(12): 1136-1143.
- Duman, R. S., G. R. Heninger, et al. (1997). "A molecular and cellular theory of depression." *Arch Gen Psychiatry* 54(7): 597-606.
- Duman, R. S., J. Malberg, et al. (2000). "Neuronal plasticity and survival in mood disorders." *Biol Psychiatry* 48(8): 732-739.
- Duman, R. S., J. Malberg, et al. (1999). "Neural plasticity to stress and antidepressant treatment." *Biol Psychiatry* 46(9): 1181-1191.
- Duman, R. S. and L. M. Monteggia (2006). "A neurotrophic model for stress-related mood disorders." *Biol Psychiatry* 59(12): 1116-1127.
- Dvorak, H. F. (2006). "Discovery of vascular permeability factor (VPF)." *Exp Cell Res* 312(5): 522-526.
- Dwivedi, Y. (2009). "Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide." *Neuropsychiatr Dis Treat* 5: 433-449.
- Dwivedi, Y., A. C. Mondal, et al. (2006). "Differential and brain region-specific regulation of Rap-1 and Epac in depressed suicide victims." *Arch Gen Psychiatry* 63(6): 639-648.
- Egan, M. F., M. Kojima, et al. (2003). "The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function." *Cell* 112(2): 257-269.
- Eisch, A. J., C. A. Bolanos, et al. (2003). "Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression." *Biol Psychiatry* 54(10): 994-1005.
- Eissa Ahmed, A. A. and N. M. Al-Rasheed (2009). "Antidepressant-like effects of rosiglitazone, a PPARgamma agonist, in the rat forced swim and mouse tail suspension tests." *Behav Pharmacol* 20(7): 635-642.
- Elbrecht, A., Y. Chen, et al. (1996). "Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2." *Biochem Biophys Res Commun* 224(2): 431-437.
- Elfving, B., P. H. Plougmann, et al. (2010). "Differential brain, but not serum VEGF levels in a genetic rat model of depression." *Neurosci Lett* 474(1): 13-16.
- Emamian, E. S., D. Hall, et al. (2004). "Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia." *Nat Genet* 36(2): 131-137.
- Encinas, J. M., A. Vahtokari, et al. (2006). "Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(21): 8233-8238.
- Eom, T. Y. and R. S. Jope (2009). "Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3alpha/beta impairs in vivo neural precursor cell proliferation." *Biol Psychiatry* 66(5): 494-502.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* 4(11): 1313-1317.
- Extein, I., J. Tallman, et al. (1979). "Changes in lymphocyte beta-adrenergic receptors in depression and mania." *Psychiatry Res* 1(2): 191-197.

- Fabel, K., B. Tam, et al. (2003). "VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis." *Eur J Neurosci* 18(10): 2803-2812.
- Fagotto, F., E. Jho, et al. (1999). "Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization." *J Cell Biol* 145(4): 741-756.
- Fearnhead, N. S., M. P. Britton, et al. (2001). "The ABC of APC." *Hum Mol Genet* 10(7): 721-733.
- Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." *Nat Med* 9(6): 669-676.
- Ferres-Coy, A., F. Pilar-Cuellar, et al. (2013). "RNAi-mediated serotonin transporter suppression rapidly increases serotonergic neurotransmission and hippocampal neurogenesis." *Transl Psychiatry* 3: e211.
- Fong, G. H., L. Zhang, et al. (1999). "Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in *flt-1* knock-out mice." *Development* 126(13): 3015-3025.
- Fournier, N. M. and R. S. Duman (2012). "Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: implications for the pathophysiology and treatment of depression." *Behav Brain Res* 227(2): 440-449.
- Frame, S., P. Cohen, et al. (2001). "A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation." *Mol Cell* 7(6): 1321-1327.
- Fujioka, T., A. Fujioka, et al. (2004). "Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus." *J Neurosci* 24(2): 319-328.
- Fukuchi, M., H. Fujii, et al. (2010). "Activation of tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its selective inhibition through Ca(2+) signals evoked via the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor." *Brain Res* 1366: 18-26.
- Fuster-Matanzo, A., M. Llorens-Martin, et al. (2013). "Dual effects of increased glycogen synthase kinase-3beta activity on adult neurogenesis." *Hum Mol Genet* 22(7): 1300-1315.
- Galceran, J., E. M. Miyashita-Lin, et al. (2000). "Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1." *Development* 127(3): 469-482.
- Gan, X. Q., J. Y. Wang, et al. (2008). "Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction." *The Journal of cell biology* 180(6): 1087-1100.
- Gao, X., P. Arlotta, et al. (2007). "Conditional knock-out of beta-catenin in postnatal-born dentate gyrus granule neurons results in dendritic malformation." *J Neurosci* 27(52): 14317-14325.
- Gardner, O. S., B. J. Dewar, et al. (2005). "Activation of mitogen-activated protein kinases by peroxisome proliferator-activated receptor ligands: an example of nongenomic signaling." *Mol Pharmacol* 68(4): 933-941.
- Garza, J. C., M. Guo, et al. (2008). "Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro." *J Biol Chem* 283(26): 18238-18247.
- Garza, J. C., M. Guo, et al. (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(8): 790-808.
- Gasbarri, A., C. Verney, et al. (1994). "Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study." *Brain Res* 668(1-2): 71-79.
- Ge, S., K. A. Sailor, et al. (2008). "Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus." *J Physiol* 586(16): 3759-3765.
- Gordon, M. D. and R. Nusse (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." *J Biol Chem* 281(32): 22429-22433.
- Gottardi, C. J. and B. M. Gumbiner (2004). "Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes." *J Cell Biol* 167(2): 339-349.
- Gottardi, C. J. and B. M. Gumbiner (2004). "Role for ICAT in beta-catenin-dependent nuclear signaling and cadherin functions." *Am J Physiol Cell Physiol* 286(4): C747-756.
- Gould, E., B. S. McEwen, et al. (1997). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation." *J Neurosci* 17(7): 2492-2498.
- Gould, T. D., G. Chen, et al. (2004). "In vivo evidence in the brain for lithium inhibition of glycogen synthase kinase-3." *Neuropsychopharmacology* 29(1): 32-38.
- Gould, T. D., H. Einat, et al. (2004). "AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test." *Int J Neuropsychopharmacol* 7(4): 387-390.
- Gould, T. D., H. Einat, et al. (2007). "Beta-catenin overexpression in the mouse brain phenocopies lithium-sensitive behaviors." *Neuropsychopharmacology* 32(10): 2173-2183.
- Gould, T. D. and H. K. Manji (2002). "Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders." *J Psychosom Res* 53(2): 687-697.
- Gould, T. D., K. C. O'Donnell, et al. (2008). "Generation and behavioral characterization of beta-catenin forebrain-specific conditional knock-out mice." *Behav Brain Res* 189(1): 117-125.
- Grandbarbe, L., J. Bouissac, et al. (2003). "Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process." *Development* 130(7): 1391-1402.
- Gray, G. E., R. S. Mann, et al. (1999). "Human ligands of the Notch receptor." *The American journal of pathology* 154(3): 785-794.
- Green, J. L., S. G. Kuntz, et al. (2008). "Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more." *Trends Cell Biol* 18(11): 536-544.

- Greene, J., M. Banasr, et al. (2009). "Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: pharmacological and cellular characterization." *Neuropsychopharmacology* 34(11): 2459-2468.
- Guillemot, F. (2007). "Cell fate specification in the mammalian telencephalon." *Prog Neurobiol* 83(1): 37-52.
- Gulyas, A. I., L. Acsady, et al. (1999). "Structural basis of the cholinergic and serotonergic modulation of GABAergic neurons in the hippocampus." *Neurochem Int* 34(5): 359-372.
- Gumbiner, B. M. (1995). "Signal transduction of beta-catenin." *Curr Opin Cell Biol* 7(5): 634-640.
- Guo, Y., K. Yang, et al. (2005). "Phosphorylation of cyclin D1 at Thr 286 during S phase leads to its proteasomal degradation and allows efficient DNA synthesis." *Oncogene* 24(16): 2599-2612.
- Guo, Y. J., Z. J. Zhang, et al. (2009). "Notch1 signaling, hippocampal neurogenesis and behavioral responses to chronic unpredicted mild stress in adult ischemic rats." *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 33(4): 688-694.
- Halmi, Z., P. Dome, et al. (2013). "Peripheral vascular endothelial growth factor level is associated with antidepressant treatment response: results of a preliminary study." *J Affect Disord* 144(3): 269-273.
- Halper, J. P., R. P. Brown, et al. (1988). "Blunted beta-adrenergic responsivity of peripheral blood mononuclear cells in endogenous depression. Isoproterenol dose-response studies." *Arch Gen Psychiatry* 45(3): 241-244.
- Hardingham, G. E., F. J. Arnold, et al. (2001). "Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity." *Nat Neurosci* 4(3): 261-267.
- Haroon, E., C. L. Raison, et al. (2012). "Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior." *Neuropsychopharmacology* 37(1): 137-162.
- Hart, M., J. P. Concordet, et al. (1999). "The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell." *Curr Biol* 9(4): 207-210.
- Hart, M. J., R. de los Santos, et al. (1998). "Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta." *Curr Biol* 8(10): 573-581.
- Hashimoto, K. (2010). "Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: an historical overview and future directions." *Psychiatry Clin Neurosci* 64(4): 341-357.
- Heine, V. M., S. Maslam, et al. (2004). "Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible." *Eur J Neurosci* 19(1): 131-144.
- Heine, V. M., J. Zareno, et al. (2005). "Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression." *Eur J Neurosci* 21(5): 1304-1314.
- Hellsten, J., M. Wennstrom, et al. (2004). "Electroconvulsive seizures induce endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus." *Biol Psychiatry* 55(4): 420-427.
- Hendrickx, M. and L. Leyns (2008). "Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors." *Dev Growth Differ* 50(4): 229-243.
- Herdegen, T. and J. D. Leah (1998). "Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins." *Brain research. Brain research reviews* 28(3): 370-490.
- Hernandez, F., J. Borrell, et al. (2002). "Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments." *J Neurochem* 83(6): 1529-1533.
- Hikasa, H., J. Ezan, et al. (2010). "Regulation of TCF3 by Wnt-dependent phosphorylation during vertebrate axis specification." *Dev Cell* 19(4): 521-532.
- Hinck, L., I. S. Nathke, et al. (1994). "Beta-catenin: a common target for the regulation of cell adhesion by Wnt-1 and Src signaling pathways." *Trends Biochem Sci* 19(12): 538-542.
- Hino, S., T. Michiue, et al. (2003). "Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin." *J Biol Chem* 278(16): 14066-14073.
- Hirschfeld, R. M. (2012). "Depression epidemiology and its treatment evolution." *J Clin Psychiatry* 73(10): e29.
- Hitomi, M. and D. W. Stacey (1999). "Cyclin D1 production in cycling cells depends on ras in a cell-cycle-specific manner." *Current biology : CB* 9(19): 1075-1084.
- Hong, S., Y. Xin, et al. (2013). "The PPARgamma agonist rosiglitazone prevents neuronal loss and attenuates development of spontaneous recurrent seizures through BDNF/TrkB signaling following pilocarpine-induced status epilepticus." *Neurochem Int* 63(5): 405-412.
- Horvitz, H. R. and P. W. Sternberg (1991). "Multiple intercellular signalling systems control the development of the *Caenorhabditis elegans* vulva." *Nature* 351(6327): 535-541.
- Hoshaw, B. A., J. E. Malberg, et al. (2005). "Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects." *Brain Res* 1037(1-2): 204-208.
- Howell, K. R., A. Kutiyawalla, et al. (2011). "Long-term continuous corticosterone treatment decreases VEGF receptor-2 expression in frontal cortex." *PLoS One* 6(5): e20198.
- Hsu, W., L. Zeng, et al. (1999). "Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain." *J Biol Chem* 274(6): 3439-3445.
- Hu, J., C. X. Luo, et al. (2012). "20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF-kappaB and JNK pathways." *PLoS One* 7(12): e50764.
- Huang, H. C. and P. S. Klein (2004). "The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways." *Genome Biol* 5(7): 234.

- Hur, E. M. and F. Q. Zhou (2010). "GSK3 signalling in neural development." *Nat Rev Neurosci* 11(8): 539-551.
- Hussaini, S. M., C. I. Choi, et al. (2014). "Wnt signaling in neuropsychiatric disorders: ties with adult hippocampal neurogenesis and behavior." *Neurosci Biobehav Rev* 47: 369-383.
- Ide, M., T. Ohnishi, et al. (2006). "Failure to support a genetic contribution of AKT1 polymorphisms and altered AKT signaling in schizophrenia." *J Neurochem* 99(1): 277-287.
- Ikeda, M., N. Iwata, et al. (2004). "Association of AKT1 with schizophrenia confirmed in a Japanese population." *Biol Psychiatry* 56(9): 698-700.
- Ikeda, S., M. Kishida, et al. (2000). "GSK-3beta-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin." *Oncogene* 19(4): 537-545.
- Ikeda, S., S. Kishida, et al. (1998). "Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin." *EMBO J* 17(5): 1371-1384.
- Imayoshi, I., M. Sakamoto, et al. (2010). "Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(9): 3489-3498.
- Inkster, B., T. E. Nichols, et al. (2009). "Association of GSK3beta polymorphisms with brain structural changes in major depressive disorder." *Arch Gen Psychiatry* 66(7): 721-728.
- Ishizaki, Y., S. Ikeda, et al. (2004). "Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas." *Int J Oncol* 24(5): 1077-1083.
- Issemann, I. and S. Green (1990). "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators." *Nature* 347(6294): 645-650.
- Jaako-Movits, K., T. Zharkovsky, et al. (2006). "Decreased hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy is reversed by repeated citalopram administration." *Cell Mol Neurobiol* 26(7-8): 1559-1570.
- Jackstadt, R. and H. Hermeking (2015). "MicroRNAs as regulators and mediators of c-MYC function." *Biochimica et biophysica acta* 1849(5): 544-553.
- Jackstadt, R., A. Menssen, et al. (2013). "Genome-wide analysis of c-MYC-regulated mRNAs and miRNAs, and c-MYC DNA binding by next-generation sequencing." *Methods in molecular biology* 1012: 145-185.
- Jacobs, B. L., H. van Praag, et al. (2000). "Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression." *Mol Psychiatry* 5(3): 262-269.
- Jang, M. H., M. A. Bonaguidi, et al. (2013). "Secreted frizzled-related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis." *Cell Stem Cell* 12(2): 215-223.
- Jayatissa, M. N., K. Henningsen, et al. (2009). "Decreased cell proliferation in the dentate gyrus does not associate with development of anhedonic-like symptoms in rats." *Brain Res* 1290: 133-141.
- Jin, K., Y. Zhu, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11946-11950.
- Johnston, S. H., C. Rauskolb, et al. (1997). "A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway." *Development* 124(11): 2245-2254.
- Jope, R. S. and G. N. Bijur (2002). "Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3beta and cell survival." *Mol Psychiatry* 7 Suppl 1: S35-45.
- Jordan, J. D., D. K. Ma, et al. (2007). "Cellular niches for endogenous neural stem cells in the adult brain." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(5): 336-341.
- Kadesch, T. (2004). "Notch signaling: the demise of elegant simplicity." *Current opinion in genetics & development* 14(5): 506-512.
- Kageyama, R. and T. Ohtsuka (1999). "The Notch-Hes pathway in mammalian neural development." *Cell research* 9(3): 179-188.
- Kaidanovich-Beilin, O., A. Milman, et al. (2004). "Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus." *Biol Psychiatry* 55(8): 781-784.
- Kallunki, T., B. Su, et al. (1994). "JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation." *Genes & development* 8(24): 2996-3007.
- Karege, F., G. Bondolfi, et al. (2005). "Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity." *Biol Psychiatry* 57(9): 1068-1072.
- Karege, F., N. Perroud, et al. (2012). "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(1-2): 185-188.
- Karege, F., G. Vaudan, et al. (2005). "Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs." *Brain Res Mol Brain Res* 136(1-2): 29-37.
- Katoh, M. (2002). "Regulation of WNT signaling molecules by retinoic acid during neuronal differentiation in NT2 cells: threshold model of WNT action (review)." *Int J Mol Med* 10(6): 683-687.
- Katoh, M. (2003). "Identification and characterization of human DAAM2 gene in silico." *Int J Oncol* 22(4): 915-920.
- Katsu, T., H. Ujike, et al. (2003). "The human frizzled-3 (FZD3) gene on chromosome 8p21, a receptor gene for Wnt ligands, is associated with the susceptibility to schizophrenia." *Neurosci Lett* 353(1): 53-56.

- Kawahara, K., T. Morishita, et al. (2000). "Down-regulation of beta-catenin by the colorectal tumor suppressor APC requires association with Axin and beta-catenin." *J Biol Chem* 275(12): 8369-8374.
- Kaya, D., Y. Gursoy-Ozdemir, et al. (2005). "VEGF protects brain against focal ischemia without increasing blood-brain permeability when administered intracerebroventricularly." *J Cereb Blood Flow Metab* 25(9): 1111-1118.
- Kemp, D. E., F. Ismail-Beigi, et al. (2012). "Use of insulin sensitizers for the treatment of major depressive disorder: a pilot study of pioglitazone for major depression accompanied by abdominal obesity." *J Affect Disord* 136(3): 1164-1173.
- Kempermann, G. (2002). "Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression." *Bipolar Disord* 4(1): 17-33.
- Kempermann, G. (2008). "The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for?" *Trends in neurosciences* 31(4): 163-169.
- Kempermann, G., E. J. Chesler, et al. (2006). "Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(3): 780-785.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn, et al. (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." *Nature* 386(6624): 493-495.
- Kempermann, G., L. Wiskott, et al. (2004). "Functional significance of adult neurogenesis." *Curr Opin Neurobiol* 14(2): 186-191.
- Kersten, S., B. Desvergne, et al. (2000). "Roles of PPARs in health and disease." *Nature* 405(6785): 421-424.
- Kidd, S., M. R. Kelley, et al. (1986). "Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors." *Molecular and cellular biology* 6(9): 3094-3108.
- Kikuchi, A. (2000). "Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 268(2): 243-248.
- Kim, W. Y., X. Wang, et al. (2009). "GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis." *Nat Neurosci* 12(11): 1390-1397.
- Kimelman, D. and W. Xu (2006). "beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective." *Oncogene* 25(57): 7482-7491.
- Kirikoshi, H., J. Koike, et al. (2000). "Molecular cloning and genomic structure of human frizzled-3 at chromosome 8p21." *Biochem Biophys Res Commun* 271(1): 8-14.
- Kishimoto, M., H. Ujike, et al. (2008). "The Frizzled 3 gene is associated with methamphetamine psychosis in the Japanese population." *Behav Brain Funct* 4: 37.
- Kitamura, Y., S. Hattori, et al. (2015). "Doxorubicin and cyclophosphamide treatment produces anxiety-like behavior and spatial cognition impairment in rats: Possible involvement of hippocampal neurogenesis via brain-derived neurotrophic factor and cyclin D1 regulation." *Behavioural brain research* 292: 184-193.
- Kiuchi, T., H. Lee, et al. (2012). "Regular exercise cures depression-like behavior via VEGF-Flk-1 signaling in chronically stressed mice." *Neuroscience* 207: 208-217.
- Klein, P. S. and D. A. Melton (1996). "A molecular mechanism for the effect of lithium on development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8455-8459.
- Kobayashi, K., S. Sagae, et al. (1999). "Mutations of the beta-catenin gene in endometrial carcinomas." *Jpn J Cancer Res* 90(1): 55-59.
- Kocabas, N. A., I. Antonijevic, et al. (2011). "Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms: influence on treatment response phenotypes of major depressive disorder." *Int Clin Psychopharmacol* 26(1): 1-10.
- Kodama, M., T. Fujioka, et al. (2004). "Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat." *Biol Psychiatry* 56(8): 570-580.
- Koenigs, M. and J. Grafman (2009). "The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex." *Behav Brain Res* 201(2): 239-243.
- Kosten, T. A., M. P. Galloway, et al. (2008). "Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures." *Neuropsychopharmacology* 33(7): 1545-1558.
- Kumar, D. U. and H. Devaraj (2012). "Expression of Wnt 3a, beta-catenin, cyclin D1 and PCNA in mouse dentate gyrus subgranular zone (SGZ): a possible role of Wnt pathway in SGZ neural stem cell proliferation." *Folia biologica* 58(3): 115-120.
- Kurihara, T., S. Ikeda, et al. (2004). "Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers." *Thyroid* 14(12): 1020-1029.
- Kuwabara, T., J. Hsieh, et al. (2009). "Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis." *Nat Neurosci* 12(9): 1097-1105.
- Kuzman, M. R., V. Medved, et al. (2009). "Genome-wide expression analysis of peripheral blood identifies candidate biomarkers for schizophrenia." *J Psychiatr Res* 43(13): 1073-1077.
- Lafuente, J. V., B. Adan, et al. (1999). "Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR-beta) in human gliomas." *J Mol Neurosci* 13(1-2): 177-185.
- Lafuente, J. V., B. Mitre, et al. (2007). "Spatio-temporal distribution of apoptosis and the modulators thereof following a cortical microinfarct in rat brain." *Neurosci Res* 57(3): 354-361.
- Laifenfeld, D., R. Karry, et al. (2005). "Antidepressants and prolonged stress in rats modulate CAM-L1, laminin, and pCREB, implicated in neuronal plasticity." *Neurobiol Dis* 20(2): 432-441.

- Latapy, C., V. Rioux, et al. (2012). "Selective deletion of forebrain glycogen synthase kinase 3beta reveals a central role in serotonin-sensitive anxiety and social behaviour." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367(1601): 2460-2474.
- Latella, L., A. Sacco, et al. (2001). "Reconstitution of cyclin D1-associated kinase activity drives terminally differentiated cells into the cell cycle." *Molecular and cellular biology* 21(16): 5631-5643.
- Lee, E. and H. Son (2009). "Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors." *BMB Rep* 42(5): 239-244.
- Lee, H. J., J. W. Kim, et al. (2001). "Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats." *Mol Psychiatry* 6(6): 610, 725-618.
- Lee, W., S. Swarup, et al. (2009). "Homeodomain-interacting protein kinases (Hipks) promote Wnt/Wg signaling through stabilization of beta-catenin/Arm and stimulation of target gene expression." *Development* 136(2): 241-251.
- Lehmann, J. M., L. B. Moore, et al. (1995). "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)." *J Biol Chem* 270(22): 12953-12956.
- Lessmann, V., K. Gottmann, et al. (2003). "Neurotrophin secretion: current facts and future prospects." *Prog Neurobiol* 69(5): 341-374.
- Li, F., Z. Z. Chong, et al. (2005). "Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system." *Curr Neurovasc Res* 2(4): 331-340.
- Li, F., Z. Z. Chong, et al. (2006). "Winding through the WNT pathway during cellular development and demise." *Histol Histopathol* 21(1): 103-124.
- Li, L., H. Yuan, et al. (1999). "Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1." *EMBO J* 18(15): 4233-4240.
- Li, N., B. Lee, et al. (2010). "mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists." *Science* 329(5994): 959-964.
- Li, X., W. Zhu, et al. (2004). "In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain." *Neuropsychopharmacology* 29(8): 1426-1431.
- Li, Y. H., C. H. Zhang, et al. (2014). "Antidepressant-like effects of Chaihu-Shugan-San via SAPK/JNK signal transduction in rat models of depression." *Pharmacognosy magazine* 10(39): 271-277.
- Lie, A. A., B. Sommersberg, et al. (2005). "Analysis of pThr286-CaMKII and CaMKII immunohistochemistry in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy." *Epilepsy Res* 67(1-2): 13-23.
- Lie, D. C., S. A. Colamarino, et al. (2005). "Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis." *Nature* 437(7063): 1370-1375.
- Lie, D. C., H. Song, et al. (2004). "Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 399-421.
- Liem, M. K., J. van der Grond, et al. (2007). "Lacunar infarcts are the main correlate with cognitive dysfunction in CADASIL." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38(3): 923-928.
- Lin, H. S., G. J. Berry, et al. (2006). "Cyclin D1 and p16 expression in recurrent nasopharyngeal carcinoma." *World journal of surgical oncology* 4: 62.
- Liu, F., D. M. Virshup, et al. (2002). "Mechanism of regulation of casein kinase I activity by group I metabotropic glutamate receptors." *J Biol Chem* 277(47): 45393-45399.
- Liu, M., F. A. Pereira, et al. (2000). "Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems." *Genes Dev* 14(22): 2839-2854.
- Liu, R., W. Dang, et al. (2012). "Citalopram alleviates chronic stress induced depression-like behaviors in rats by activating GSK3beta signaling in dorsal hippocampus." *Brain Res* 1467: 10-17.
- Liu, X., R. Cheng, et al. (2011). "Genome-wide association study identifies candidate genes for Parkinson's disease in an Ashkenazi Jewish population." *BMC Med Genet* 12: 104.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1994). "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain." *Science* 264(5162): 1145-1148.
- Lonze, B. E. and D. D. Ginty (2002). "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system." *Neuron* 35(4): 605-623.
- Lopez-Garcia, C., A. Molowny, et al. (1988). "Delayed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex of lizards." *Brain Res* 471(2): 167-174.
- Lu, B., P. T. Pang, et al. (2005). "The yin and yang of neurotrophin action." *Nat Rev Neurosci* 6(8): 603-614.
- Lucassen, P. J., E. Fuchs, et al. (2004). "Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex." *Biol Psychiatry* 55(8): 789-796.
- Lucassen, P. J., P. Meerlo, et al. (2010). "Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action." *Eur Neuropsychopharmacol* 20(1): 1-17.
- Ludka, F. K., L. C. Constantino, et al. (2014). "Atorvastatin evokes a serotonergic system-dependent antidepressant-like effect in mice." *Pharmacol Biochem Behav* 122: 253-260.

- Ludka, F. K., A. D. Zomkowski, et al. (2013). "Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels." *Eur Neuropsychopharmacol* 23(5): 400-412.
- Lugert, S., O. Basak, et al. (2010). "Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging." *Cell Stem Cell* 6(5): 445-456.
- Luscher, B. and J. Vervoorts (2012). "Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC." *Gene* 494(2): 145-160.
- Lustig, B., B. Jerchow, et al. (2002). "Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors." *Mol Cell Biol* 22(4): 1184-1193.
- Llorens-Martin, M., A. Fuster-Matanzo, et al. (2013). "GSK-3beta overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo." *Mol Psychiatry* 18(4): 451-460.
- MacDonald, B. T., K. Tamai, et al. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." *Dev Cell* 17(1): 9-26.
- Machin, P., L. Catasus, et al. (2002). "CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas." *Hum Pathol* 33(2): 206-212.
- Madsen, T. M., S. S. Newton, et al. (2003). "Chronic electroconvulsive seizure up-regulates beta-catenin expression in rat hippocampus: role in adult neurogenesis." *Biol Psychiatry* 54(10): 1006-1014.
- Madsen, T. M., A. Treschow, et al. (2000). "Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy." *Biol Psychiatry* 47(12): 1043-1049.
- Magnusson, J. P., C. Goritz, et al. (2014). "A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse." *Science* 346(6206): 237-241.
- Malberg, J. E. and R. S. Duman (2003). "Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment." *Neuropsychopharmacology* 28(9): 1562-1571.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, et al. (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." *J Neurosci* 20(24): 9104-9110.
- Malberg, J. E. and L. E. Schechter (2005). "Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs." *Curr Pharm Des* 11(2): 145-155.
- Manier, D. H., R. C. Shelton, et al. (2002). "Noradrenergic antidepressants: does chronic treatment increase or decrease nuclear CREB-P?" *J Neural Transm* 109(1): 91-99.
- Mann, J. J., J. P. Halper, et al. (1997). "Subsensitivity of adenylyl cyclase-coupled receptors on mononuclear leukocytes from drug-free inpatients with a major depressive episode." *Biol Psychiatry* 42(10): 859-870.
- Marandi, N., A. Konnerth, et al. (2002). "Two-photon chloride imaging in neurons of brain slices." *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 445(3): 357-365.
- Marti, H. J., M. Bernaudin, et al. (2000). "Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia." *Am J Pathol* 156(3): 965-976.
- Martin, G., H. Poirier, et al. (2000). "Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer-selective retinoids suggests that the peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is their molecular target." *J Biol Chem* 275(17): 12612-12618.
- Martinez-Turrillas, R., J. Del Rio, et al. (2005). "Sequential changes in BDNF mRNA expression and synaptic levels of AMPA receptor subunits in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment." *Neuropharmacology* 49(8): 1178-1188.
- Martinowich, K., H. Manji, et al. (2007). "New insights into BDNF function in depression and anxiety." *Nat Neurosci* 10(9): 1089-1093.
- Mathew, S. J., K. Keegan, et al. (2005). "Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders." *Rev Bras Psiquiatr* 27(3): 243-248.
- Mato, S., R. Vidal, et al. (2010). "Long-term fluoxetine treatment modulates cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in the rat prefrontal cortex through 5-hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanisms." *Mol Pharmacol* 77(3): 424-434.
- Matsuda, T., T. Nakamura, et al. (1999). "STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells." *EMBO J* 18(15): 4261-4269.
- Matsuno, M., J. Horiuchi, et al. (2009). "The Drosophila cell adhesion molecule kllngon is required for long-term memory formation and is regulated by Notch." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(1): 310-315.
- Matsushime, H., D. E. Quelle, et al. (1994). "D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells." *Molecular and cellular biology* 14(3): 2066-2076.
- Maurer, M. H., W. K. Tripps, et al. (2003). "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells." *Neurosci Lett* 344(3): 165-168.
- Mazzola-Pomietto, P., J. M. Azorin, et al. (1994). "Relation between lymphocyte beta-adrenergic responsivity and the severity of depressive disorders." *Biol Psychiatry* 35(12): 920-925.
- McGuffin, P., K. Tandon, et al. (2003). "Linkage and association studies of schizophrenia." *Curr Psychiatry Rep* 5(2): 121-127.
- Mechta-Grigoriou, F., D. Gerald, et al. (2001). "The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity." *Oncogene* 20(19): 2378-2389.

- Menn, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2006). "Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain." *J Neurosci* 26(30): 7907-7918.
- Menninger, J. A. and B. Tabakoff (1997). "Forskolin-stimulated platelet adenylyl cyclase activity is lower in persons with major depression." *Biol Psychiatry* 42(1): 30-38.
- Meshi, D., M. R. Drew, et al. (2006). "Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment." *Nat Neurosci* 9(6): 729-731.
- Meyer, N. and L. Z. Penn (2008). "Reflecting on 25 years with MYC." *Nature reviews. Cancer* 8(12): 976-990.
- Miele, L. and B. Osborne (1999). "Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis." *Journal of cellular physiology* 181(3): 393-409.
- Miller, J. R., A. M. Hocking, et al. (1999). "Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca2+ pathways." *Oncogene* 18(55): 7860-7872.
- Miller, L. D., K. S. Park, et al. (2001). "Silencing of Wnt signaling and activation of multiple metabolic pathways in response to thyroid hormone-stimulated cell proliferation." *Mol Cell Biol* 21(19): 6626-6639.
- Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." *Annu Rev Neurosci* 28: 223-250.
- Minichiello, L., A. M. Calella, et al. (2002). "Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation." *Neuron* 36(1): 121-137.
- Mirescu, C., J. D. Peters, et al. (2004). "Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress." *Nat Neurosci* 7(8): 841-846.
- Molteni, R., F. Calabrese, et al. (2006). "Chronic treatment with fluoxetine up-regulates cellular BDNF mRNA expression in rat dopaminergic regions." *Int J Neuropsychopharmacol* 9(3): 307-317.
- Monsalve, E. M., M. S. Garcia-Gutierrez, et al. (2014). "Abnormal expression pattern of Notch receptors, ligands, and downstream effectors in the dorsolateral prefrontal cortex and amygdala of suicidal victims." *Molecular neurobiology* 49(2): 957-965.
- Monteggia, L. M., M. Barrot, et al. (2004). "Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29): 10827-10832.
- Monteleone, P., C. Serritella, et al. (2008). "Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders." *Bipolar Disord* 10(1): 95-100.
- Moon, R. T., B. Bowerman, et al. (2002). "The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin." *Science* 296(5573): 1644-1646.
- Moran, J. L., S. H. Johnston, et al. (1999). "Genomic structure, mapping, and expression analysis of the mammalian Lunatic, Manic, and Radical fringe genes." *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 10(6): 535-541.
- Moreno, S., S. Farioli-Vecchioli, et al. (2004). "Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS." *Neuroscience* 123(1): 131-145.
- Morgan, T. H. (1917). "Goodale's Experiments on Gonadectomy of Fowls." *Science* 45(1168): 483-484.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." *Science* 275(5307): 1787-1790.
- Morley-Fletcher, S., J. Mairesse, et al. (2011). "Chronic agomelatine treatment corrects behavioral, cellular, and biochemical abnormalities induced by prenatal stress in rats." *Psychopharmacology (Berl)* 217(3): 301-313.
- Mostany, R., E. M. Valdizan, et al. (2008). "A role for nuclear beta-catenin in SNRI antidepressant-induced hippocampal cell proliferation." *Neuropharmacology* 55(1): 18-26.
- Mulinari, S. (2012). "Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research." *J Hist Neurosci* 21(4): 366-392.
- Nakagawa, S., J. E. Kim, et al. (2002). "Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein." *J Neurosci* 22(9): 3673-3682.
- Namiecinska, M., K. Marciniak, et al. (2005). "[VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor]." *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 59: 573-583.
- Nelson, W. J. and R. Nusse (2004). "Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways." *Science* 303(5663): 1483-1487.
- Nestler, E. J., M. Barrot, et al. (2002). "Neurobiology of depression." *Neuron* 34(1): 13-25.
- Nestler, E. J., R. Z. Terwilliger, et al. (1989). "Chronic antidepressant administration alters the subcellular distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in rat frontal cortex." *J Neurochem* 53(5): 1644-1647.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (2002). "The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis." *Trends Cardiovasc Med* 12(1): 13-19.
- Newton, S. S., E. F. Collier, et al. (2003). "Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors." *J Neurosci* 23(34): 10841-10851.
- Nibuya, M., S. Morinobu, et al. (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." *J Neurosci* 15(11): 7539-7547.
- Nibuya, M., E. J. Nestler, et al. (1996). "Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus." *J Neurosci* 16(7): 2365-2372.

- Nickoloff, B. J., B. A. Osborne, et al. (2003). "Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents." *Oncogene* 22(42): 6598-6608.
- Nilsson, M., E. Perfilieva, et al. (1999). "Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory." *J Neurobiol* 39(4): 569-578.
- Norton, N., H. J. Williams, et al. (2007). "Association analysis of AKT1 and schizophrenia in a UK case control sample." *Schizophr Res* 93(1-3): 58-65.
- Notaridou, M., L. Quaye, et al. (2011). "Common alleles in candidate susceptibility genes associated with risk and development of epithelial ovarian cancer." *Int J Cancer* 128(9): 2063-2074.
- Nowacka, M. M. and E. Obuchowicz (2012). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: a new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action." *Neuropeptides* 46(1): 1-10.
- Nusse, R., A. Brown, et al. (1991). "A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family." *Cell* 64(2): 231.
- Nusse, R. and H. E. Varmus (1992). "Wnt genes." *Cell* 69(7): 1073-1087.
- Nyfelner, Y., R. D. Kirch, et al. (2005). "Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal." *The EMBO journal* 24(19): 3504-3515.
- O'Brien, W. T., A. D. Harper, et al. (2004). "Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium." *J Neurosci* 24(30): 6791-6798.
- Odagaki, Y., J. A. Garcia-Sevilla, et al. (2001). "Cyclic AMP-mediated signaling components are upregulated in the prefrontal cortex of depressed suicide victims." *Brain Res* 898(2): 224-231.
- Ogunshola, O. O., A. Antic, et al. (2002). "Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system." *J Biol Chem* 277(13): 11410-11415.
- Oh, D. H., Y. C. Park, et al. (2010). "Increased glycogen synthase kinase-3beta mRNA level in the hippocampus of patients with major depression: a study using the stanley neuropathology consortium integrative database." *Psychiatry Investig* 7(3): 202-207.
- Ohtsuki, T., T. Inada, et al. (2004). "Failure to confirm association between AKT1 haplotype and schizophrenia in a Japanese case-control population." *Mol Psychiatry* 9(11): 981-983.
- Okamoto, H., B. Voleti, et al. (2010). "Wnt2 expression and signaling is increased by different classes of antidepressant treatments." *Biol Psychiatry* 68(6): 521-527.
- Olefsky, J. M. and A. R. Saltiel (2000). "PPAR gamma and the treatment of insulin resistance." *Trends Endocrinol Metab* 11(9): 362-368.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, et al. (2006). "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(5): 359-371.
- Ongur, D., W. C. Drevets, et al. (1998). "Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13290-13295.
- Orford, K., C. Crockett, et al. (1997). "Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin." *J Biol Chem* 272(40): 24735-24738.
- Palacios, J. and C. Gamallo (1998). "Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas." *Cancer Res* 58(7): 1344-1347.
- Palmer, C. N., M. H. Hsu, et al. (1995). "Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling." *J Biol Chem* 270(27): 16114-16121.
- Palmer, T. D., A. R. Willhoite, et al. (2000). "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis." *J Comp Neurol* 425(4): 479-494.
- Pandey, G. N., P. Sudershan, et al. (1985). "Beta adrenergic receptor function in depression and the effect of antidepressant drugs." *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 56 Suppl 1: 66-79.
- Park, S., D. Kim, et al. (2005). "Molecular cloning and characterization of the human AKT1 promoter uncovers its up-regulation by the Src/Stat3 pathway." *J Biol Chem* 280(47): 38932-38941.
- Pascual-Brazo, J., E. Castro, et al. (2012). "Modulation of neuroplasticity pathways and antidepressant-like behavioural responses following the short-term (3 and 7 days) administration of the 5-HT(4) receptor agonist RS67333." *Int J Neuropsychopharmacol* 15(5): 631-643.
- Patapoutian, A. and L. F. Reichardt (2000). "Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance." *Curr Opin Neurobiol* 10(3): 392-399.
- Peifer, M., S. Orsulic, et al. (1993). "A model system for cell adhesion and signal transduction in Drosophila." *Dev Suppl*: 163-176.
- Peifer, M. and P. Polakis (2000). "Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus." *Science* 287(5458): 1606-1609.
- Peltier, J., A. O'Neill, et al. (2007). "PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation." *Dev Neurobiol* 67(10): 1348-1361.
- Pencea, V., K. D. Bingaman, et al. (2001). "Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain." *Exp Neurol* 172(1): 1-16.
- Penzes, P., M. E. Cahill, et al. (2011). "Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders." *Nat Neurosci* 14(3): 285-293.

- Pereira, P. A., M. A. Bicalho, et al. (2014). "Genetic variant of AKT1 and AKTIP associated with late-onset depression in a Brazilian population." *International journal of geriatric psychiatry* 29(4): 399-405.
- Perera, T. D., S. Park, et al. (2008). "Cognitive role of neurogenesis in depression and antidepressant treatment." *Neuroscientist* 14(4): 326-338.
- Perez-Canellas, M. M. and J. M. Garcia-Verdugo (1996). "Adult neurogenesis in the telencephalon of a lizard: a [<sup>3</sup>H]thymidine autoradiographic and bromodeoxyuridine immunocytochemical study." *Brain Res Dev Brain Res* 93(1-2): 49-61.
- Peterson, D. A. (2002). "Stem cells in brain plasticity and repair." *Curr Opin Pharmacol* 2(1): 34-42.
- Pilar-Cuellar, F., R. Vidal, et al. (2013). "Neural plasticity and proliferation in the generation of antidepressant effects: hippocampal implication." *Neural Plast* 2013: 537265.
- Pilar-Cuellar, F., R. Vidal, et al. (2012). "Subchronic treatment with fluoxetine and ketanserin increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor, beta-catenin and antidepressant-like effects." *Br J Pharmacol* 165(4b): 1046-1057.
- Pittenger, C. and R. S. Duman (2008). "Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms." *Neuropsychopharmacology* 33(1): 88-109.
- Pitzer, M. R., C. E. Sortwell, et al. (2003). "Angiogenic and neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor (VEGF165): studies of grafted and cultured embryonic ventral mesencephalic cells." *Exp Neurol* 182(2): 435-445.
- Plate, K. H., G. Breier, et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo." *Nature* 359(6398): 845-848.
- Pliakas, A. M., R. R. Carlson, et al. (2001). "Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens." *J Neurosci* 21(18): 7397-7403.
- Polakis, P. (2012). "Drugging Wnt signalling in cancer." *EMBO J* 31(12): 2737-2746.
- Polter, A., E. Beurel, et al. (2010). "Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances." *Neuropsychopharmacology* 35(8): 1761-1774.
- Popoli, M., Z. Yan, et al. (2012). "The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission." *Nat Rev Neurosci* 13(1): 22-37.
- Price, J. L. and W. C. Drevets (2010). "Neurocircuitry of mood disorders." *Neuropsychopharmacology* 35(1): 192-216.
- Proitsi, P., T. Li, et al. (2008). "Positional pathway screen of wnt signaling genes in schizophrenia: association with DKK4." *Biol Psychiatry* 63(1): 13-16.
- Purro, S. A., L. Ciani, et al. (2008). "Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli." *J Neurosci* 28(34): 8644-8654.
- Qi, H., M. D. Rand, et al. (1999). "Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian." *Science* 283(5398): 91-94.
- Qu, Q., G. Sun, et al. (2010). "Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal." *Nat Cell Biol* 12(1): 31-40; sup pp 31-39.
- Quinn, T. P., K. G. Peters, et al. (1993). "Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(16): 7533-7537.
- Radtko, F. and K. Raj (2003). "The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?" *Nature reviews. Cancer* 3(10): 756-767.
- Rajkowska, G., J. J. Miguel-Hidalgo, et al. (1999). "Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression." *Biol Psychiatry* 45(9): 1085-1098.
- Redmond, L., S. R. Oh, et al. (2000). "Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development." *Nature neuroscience* 3(1): 30-40.
- Reif, A., S. Fritzen, et al. (2006). "Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression." *Mol Psychiatry* 11(5): 514-522.
- Revest, J. M., D. Dupret, et al. (2009). "Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors." *Mol Psychiatry* 14(10): 959-967.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* 255(5052): 1707-1710.
- Rijsewijk, F., M. Schuermann, et al. (1987). "The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." *Cell* 50(4): 649-657.
- Ripke, S., N. R. Wray, et al. (2013). "A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder." *Mol Psychiatry* 18(4): 497-511.
- Roose, J., M. Molenaar, et al. (1998). "The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors." *Nature* 395(6702): 608-612.
- Rosel, P., B. Arranz, et al. (2004). "Altered 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>4</sub> postsynaptic receptors and their intracellular signalling systems IP<sub>3</sub> and cAMP in brains from depressed violent suicide victims." *Neuropsychobiology* 49(4): 189-195.
- Rubinfeld, B., I. Albert, et al. (1996). "Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly." *Science* 272(5264): 1023-1026.

- Rubinfeld, B., D. A. Tice, et al. (2001). "Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1epsilon." *J Biol Chem* 276(42): 39037-39045.
- Ruhe, H. G., N. S. Mason, et al. (2007). "Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies." *Mol Psychiatry* 12(4): 331-359.
- Ruiz de Almodovar, C., D. Lambrechts, et al. (2009). "Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system." *Physiol Rev* 89(2): 607-648.
- Russo-Neustadt, A. A. and M. J. Chen (2005). "Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity." *Curr Pharm Des* 11(12): 1495-1510.
- Saarelainen, T., P. Hendolin, et al. (2003). "Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects." *J Neurosci* 23(1): 349-357.
- Sadaghiani, M. S., M. Javadi-Paydar, et al. (2011). "Antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice: the role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway." *Behav Brain Res* 224(2): 336-343.
- Sadot, E., I. Simcha, et al. (1998). "Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15339-15344.
- Sahay, A. and R. Hen (2007). "Adult hippocampal neurogenesis in depression." *Nat Neurosci* 10(9): 1110-1115.
- Sakanaka, C., J. B. Weiss, et al. (1998). "Bridging of beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta by axin and inhibition of beta-catenin-mediated transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 3020-3023.
- Sala, C. F., E. Formenti, et al. (2000). "Identification, gene structure, and expression of human frizzled-3 (FZD3)." *Biochem Biophys Res Commun* 273(1): 27-34.
- Saldanha, J., J. Singh, et al. (1998). "Identification of a Frizzled-like cysteine rich domain in the extracellular region of developmental receptor tyrosine kinases." *Protein Sci* 7(8): 1632-1635.
- Santarelli, L., M. Saxe, et al. (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." *Science* 301(5634): 805-809.
- Saxena, S., A. L. Brody, et al. (2001). "Cerebral metabolism in major depression and obsessive-compulsive disorder occurring separately and concurrently." *Biol Psychiatry* 50(3): 159-170.
- Scott, B. W., J. M. Wojtowicz, et al. (2000). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures." *Exp Neurol* 165(2): 231-236.
- Schanzer, A., F. P. Wachs, et al. (2004). "Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor." *Brain Pathol* 14(3): 237-248.
- Schildkraut, J. J. (1965). "The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence." *Am J Psychiatry* 122(5): 509-522.
- Schloesser, R. J., G. Chen, et al. (2007). "Neurogenesis and neuroenhancement in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder." *Int Rev Neurobiol* 77: 143-178.
- Schmidt, H. D. and R. S. Duman (2010). "Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models." *Neuropsychopharmacology* 35(12): 2378-2391.
- Scholtyssek, C., J. Katzenbeisser, et al. (2013). "PPARbeta/delta governs Wnt signaling and bone turnover." *Nat Med* 19(5): 608-613.
- Schwab, S. G., B. Hoefgen, et al. (2005). "Further evidence for association of variants in the AKT1 gene with schizophrenia in a sample of European sib-pair families." *Biol Psychiatry* 58(6): 446-450.
- Segi-Nishida, E., J. L. Warner-Schmidt, et al. (2008). "Electroconvulsive seizure and VEGF increase the proliferation of neural stem-like cells in rat hippocampus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(32): 11352-11357.
- Sen, S., R. Duman, et al. (2008). "Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications." *Biol Psychiatry* 64(6): 527-532.
- Sen, S., R. M. Nesse, et al. (2003). "A BDNF coding variant is associated with the NEO personality inventory domain neuroticism, a risk factor for depression." *Neuropsychopharmacology* 28(2): 397-401.
- Sestan, N., S. Artavanis-Tsakonas, et al. (1999). "Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling." *Science* 286(5440): 741-746.
- Shahsavarian, A., S. Javadi, et al. (2014). "Antidepressant-like effect of atorvastatin in the forced swimming test in mice: the role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway." *Eur J Pharmacol* 745: 52-58.
- Shalaby, F., J. Rossant, et al. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." *Nature* 376(6535): 62-66.
- Shaywitz, A. J. and M. E. Greenberg (1999). "CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals." *Annu Rev Biochem* 68: 821-861.
- Sheline, Y. I., M. H. Gado, et al. (2003). "Untreated depression and hippocampal volume loss." *Am J Psychiatry* 160(8): 1516-1518.
- Sheline, Y. I., P. W. Wang, et al. (1996). "Hippocampal atrophy in recurrent major depression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 3908-3913.
- Sherr, C. J. (1996). "Cancer cell cycles." *Science* 274(5293): 1672-1677.
- Shirayama, Y., A. C. Chen, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression." *J Neurosci* 22(8): 3251-3261.

- Shitashige, M., S. Hirohashi, et al. (2008). "Wnt signaling inside the nucleus." *Cancer Sci* 99(4): 631-637.
- Shtutman, M., J. Zhurinsky, et al. (1999). "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(10): 5522-5527.
- Sirerol-Piquer, M., P. Gomez-Ramos, et al. (2011). "GSK3beta overexpression induces neuronal death and a depletion of the neurogenic niches in the dentate gyrus." *Hippocampus* 21(8): 910-922.
- Siuciak, J. A., C. Boylan, et al. (1996). "BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration." *Brain Res* 710(1-2): 11-20.
- Siuciak, J. A., D. R. Lewis, et al. (1997). "Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)." *Pharmacol Biochem Behav* 56(1): 131-137.
- Soker, S., S. Takashima, et al. (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." *Cell* 92(6): 735-745.
- Son, H., M. Banasr, et al. (2012). "Neuritin produces antidepressant actions and blocks the neuronal and behavioral deficits caused by chronic stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(28): 11378-11383.
- Spana, E. P. and C. Q. Doe (1996). "Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates." *Neuron* 17(1): 21-26.
- Storkebaum, E., D. Lambrechts, et al. (2004). "VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection." *Bioessays* 26(9): 943-954.
- Storkebaum, E., D. Lambrechts, et al. (2005). "Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS." *Nat Neurosci* 8(1): 85-92.
- Stump, G., A. Durrer, et al. (2002). "Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain." *Mechanisms of development* 114(1-2): 153-159.
- Sui, L., J. Wang, et al. (2008). "Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex." *Learn Mem* 15(10): 762-776.
- Sun, Y., M. Aiga, et al. (2009). "Scribble interacts with beta-catenin to localize synaptic vesicles to synapses." *Mol Biol Cell* 20(14): 3390-3400.
- Surget, A., M. Saxe, et al. (2008). "Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal." *Biol Psychiatry* 64(4): 293-301.
- Tachibana, K., Y. Kobayashi, et al. (2005). "Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing different PPAR isoforms." *Nucl Recept* 3: 3.
- Taliaz, D., A. Loya, et al. (2011). "Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor." *J Neurosci* 31(12): 4475-4483.
- Tamburella, A., V. Micale, et al. (2009). "Antidepressant properties of the 5-HT4 receptor partial agonist, SL65.0155: behavioral and neurochemical studies in rats." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(7): 1205-1210.
- Tamura, K., Y. Taniguchi, et al. (1995). "Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H)." *Current biology : CB* 5(12): 1416-1423.
- Tan, H. Y., K. K. Nicodemus, et al. (2008). "Genetic variation in AKT1 is linked to dopamine-associated prefrontal cortical structure and function in humans." *J Clin Invest* 118(6): 2200-2208.
- Tanapat, P., N. B. Hastings, et al. (2005). "Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner." *J Comp Neurol* 481(3): 252-265.
- Tanapat, P., N. B. Hastings, et al. (2001). "Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism." *J Comp Neurol* 437(4): 496-504.
- Taniguchi, K., L. R. Roberts, et al. (2002). "Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas." *Oncogene* 21(31): 4863-4871.
- Tardito, D., J. Perez, et al. (2006). "Signaling pathways regulating gene expression, neuroplasticity, and neurotrophic mechanisms in the action of antidepressants: a critical overview." *Pharmacol Rev* 58(1): 115-134.
- Tashiro, A., H. Makino, et al. (2007). "Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage." *J Neurosci* 27(12): 3252-3259.
- Thiselton, D. L., V. I. Vladimirov, et al. (2008). "AKT1 is associated with schizophrenia across multiple symptom dimensions in the Irish study of high density schizophrenia families." *Biol Psychiatry* 63(5): 449-457.
- Toonen, H. (1995). "Neurotrophins and neuronal plasticity." *Science* 270(5236): 593-598.
- Thome, J., N. Sakai, et al. (2000). "cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment." *J Neurosci* 20(11): 4030-4036.
- Tochigi, M., K. Iwamoto, et al. (2008). "Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains." *Neurosci Res* 60(2): 184-191.
- Todorova, V. K., A. D. Elbein, et al. (2003). "Increased expression of c-Jun transcription factor in cerebellar vermis of patients with schizophrenia." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28(8): 1506-1514.
- Tokunaga, A., J. Kohyama, et al. (2004). "Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain." *Journal of neurochemistry* 90(1): 142-154.

- Tordera, R. M., A. L. Garcia-Garcia, et al. (2011). "Chronic stress and impaired glutamate function elicit a depressive-like phenotype and common changes in gene expression in the mouse frontal cortex." *Eur Neuropsychopharmacol* 21(1): 23-32.
- Tsai, S. J., Y. T. Gau, et al. (2008). "Association study of brain-derived neurotrophic factor and apolipoprotein E polymorphisms and cognitive function in aged males without dementia." *Neurosci Lett* 433(2): 158-162.
- Ueda, S., S. Sakakibara, et al. (2005). "Effect of long-lasting serotonin depletion on environmental enrichment-induced neurogenesis in adult rat hippocampus and spatial learning." *Neuroscience* 135(2): 395-402.
- Umbhauer, M., A. Djiane, et al. (2000). "The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling." *EMBO J* 19(18): 4944-4954.
- Vaidya, V. A., G. J. Marek, et al. (1997). "5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex." *J Neurosci* 17(8): 2785-2795.
- Vaidya, V. A., R. M. Terwilliger, et al. (1999). "Role of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the stress-induced down-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus." *Neurosci Lett* 262(1): 1-4.
- Valdizan, E. M., R. Diez-Alarcia, et al. (2010). "alpha(2)-Adrenoceptor functionality in postmortem frontal cortex of depressed suicide victims." *Biol Psychiatry* 68(9): 869-872.
- Valdizan, E. M., O. Gutierrez, et al. (2003). "Adenylate cyclase activity in postmortem brain of suicide subjects: reduced response to beta-adrenergic stimulation." *Biol Psychiatry* 54(12): 1457-1464.
- Valverde, O., T. Mantamadiotis, et al. (2004). "Modulation of anxiety-like behavior and morphine dependence in CREB-deficient mice." *Neuropsychopharmacology* 29(6): 1122-1133.
- van Gijn, M. E., M. J. Daemen, et al. (2002). "The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease." *Cardiovasc Res* 55(1): 16-24.
- van Praag, H., B. R. Christie, et al. (1999). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13427-13431.
- Verhagen, M., A. van der Meij, et al. (2010). "Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity." *Mol Psychiatry* 15(3): 260-271.
- Vidal-Puig, A., M. Jimenez-Linan, et al. (1996). "Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents." *J Clin Invest* 97(11): 2553-2561.
- Vidal, R., E. M. Valdizan, et al. (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(3): 1120-1127.
- Vidal, R., E. M. Valdizan, et al. (2010). "Reduced signal transduction by 5-HT<sub>4</sub> receptors after long-term venlafaxine treatment in rats." *Br J Pharmacol* 161(3): 695-706.
- Videbech, P., B. Ravnkilde, et al. (2001). "The Danish PET/depression project: PET findings in patients with major depression." *Psychol Med* 31(7): 1147-1158.
- Viiikki, M., S. Anttila, et al. (2010). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphism is associated with treatment resistant depression." *Neurosci Lett* 477(3): 105-108.
- Viola, H., M. Furman, et al. (2000). "Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty." *J Neurosci* 20(23): RC112.
- Vivar, C. and H. van Praag (2013). "Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus." *Front Neural Circuits* 7: 15.
- Vollmayr, B., C. Simonis, et al. (2003). "Reduced cell proliferation in the dentate gyrus is not correlated with the development of learned helplessness." *Biol Psychiatry* 54(10): 1035-1040.
- Vythilingam, M., E. Vermetten, et al. (2004). "Hippocampal volume, memory, and cortisol status in major depressive disorder: effects of treatment." *Biol Psychiatry* 56(2): 101-112.
- Wada, A., H. Yokoo, et al. (2005). "Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases." *J Pharmacol Sci* 99(4): 307-321.
- Wada, K., A. Nakajima, et al. (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation." *J Biol Chem* 281(18): 12673-12681.
- Wallace, T. L., K. E. Stellitano, et al. (2004). "Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety." *Biol Psychiatry* 56(3): 151-160.
- Wang, J. W., D. J. David, et al. (2008). "Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells." *J Neurosci* 28(6): 1374-1384.
- Wang, W. and G. Struhl (2004). "Drosophila Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch." *Development* 131(21): 5367-5380.
- Wang, X., E. L. Goode, et al. (2008). "Association of genetic variation in genes implicated in the beta-catenin destruction complex with risk of breast cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(8): 2101-2108.
- Wang, Y., N. Thekdi, et al. (2002). "Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS." *J Neurosci* 22(19): 8563-8573.
- Warner-Schmidt, J. L. and R. S. Duman (2006). "Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment." *Hippocampus* 16(3): 239-249.
- Warner-Schmidt, J. L. and R. S. Duman (2007). "VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11): 4647-4652.

- Warner-Schmidt, J. L. and R. S. Duman (2008). "VEGF as a potential target for therapeutic intervention in depression." *Curr Opin Pharmacol* 8(1): 14-19.
- Warton, S. S. and D. G. Jones (1985). "Postnatal development of the superficial layers in the rat superior colliculus: a study with Golgi-Cox and Kluver-Barrera techniques." *Experimental brain research* 58(3): 490-502.
- Watts, V. J. and K. A. Neve (2005). "Sensitization of adenylate cyclase by Galpha i/o-coupled receptors." *Pharmacol Ther* 106(3): 405-421.
- Weinmaster, G., V. J. Roberts, et al. (1991). "A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development." *Development* 113(1): 199-205.
- Wesolowska, A. (2008). "The anxiolytic-like effect of the selective 5-HT6 receptor antagonist SB-399885: the impact of benzodiazepine receptors." *Eur J Pharmacol* 580(3): 355-360.
- Wesolowska, A. (2010). "Potential role of the 5-HT6 receptor in depression and anxiety: an overview of preclinical data." *Pharmacol Rep* 62(4): 564-577.
- Wesolowska, A. and A. Nikiforuk (2007). "Effects of the brain-penetrant and selective 5-HT6 receptor antagonist SB-399885 in animal models of anxiety and depression." *Neuropharmacology* 52(5): 1274-1283.
- Wexler, E. M., D. H. Geschwind, et al. (2008). "Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation." *Mol Psychiatry* 13(3): 285-292.
- Wexler, E. M., A. Paucer, et al. (2009). "Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency." *Stem Cells* 27(5): 1130-1141.
- Wick, A., W. Wick, et al. (2002). "Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt." *J Neurosci* 22(15): 6401-6407.
- Willson, T. M., P. J. Brown, et al. (2000). "The PPARs: from orphan receptors to drug discovery." *J Med Chem* 43(4): 527-550.
- Wise, M. G. and S. E. Taylor (1990). "Anxiety and mood disorders in medically ill patients." *J Clin Psychiatry* 51 Suppl: 27-32.
- Wong, H. C., A. Bourdelas, et al. (2003). "Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled." *Mol Cell* 12(5): 1251-1260.
- Woo, N. H., H. K. Teng, et al. (2005). "Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression." *Nat Neurosci* 8(8): 1069-1077.
- Wu, J., T. J. Klein, et al. (2004). "Subcellular localization of frizzled receptors, mediated by their cytoplasmic tails, regulates signaling pathway specificity." *PLoS Biol* 2(7): E158.
- Wu, J. Y. and Y. Rao (1999). "Fringe: defining borders by regulating the notch pathway." *Current opinion in neurobiology* 9(5): 537-543.
- Wu, R., Y. Zhai, et al. (2001). "Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas." *Cancer Res* 61(22): 8247-8255.
- Xia, Z., J. W. DePierre, et al. (1996). "Dysregulation of bcl-2, c-myc, and Fas expression during tricyclic antidepressant-induced apoptosis in human peripheral lymphocytes." *Journal of biochemical toxicology* 11(4): 203-204.
- Xie, K., D. Wei, et al. (2004). "Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor." *Cytokine Growth Factor Rev* 15(5): 297-324.
- Xing, Y., W. K. Clements, et al. (2003). "Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex." *Genes Dev* 17(22): 2753-2764.
- Xu, Y., P. A. Barish, et al. (2012). "Animal models of depression and neuroplasticity: assessing drug action in relation to behavior and neurogenesis." *Methods Mol Biol* 829: 103-124.
- Yamada, S., M. Yamamoto, et al. (2003). "Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder." *J Neural Transm* 110(6): 671-680.
- Yamaguchi, M., T. Suzuki, et al. (2004). "Repetitive cocaine administration decreases neurogenesis in adult rat hippocampus." *Ann N Y Acad Sci* 1025: 351-362.
- Yau, S. Y., B. W. Lau, et al. (2011). "Hippocampal neurogenesis and dendritic plasticity support running-improved spatial learning and depression-like behaviour in stressed rats." *PLoS One* 6(9): e24263.
- Ye, Y., G. Wang, et al. (2011). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression." *Neurosci Lett* 503(1): 15-19.
- Yokoyama, N. and C. C. Malbon (2007). "Phosphoprotein phosphatase-2A docks to Dishevelled and counterregulates Wnt3a/beta-catenin signaling." *J Mol Signal* 2: 12.
- Yost, C., M. Torres, et al. (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(12): 1443-1454.
- You, H., W. Lu, et al. (2013). "The relationship between statins and depression: a review of the literature." *Expert Opin Pharmacother* 14(11): 1467-1476.
- Yu, H., D. D. Wang, et al. (2012). "Variant brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism alters vulnerability to stress and response to antidepressants." *J Neurosci* 32(12): 4092-4101.
- Yu, J. J., Y. Zhang, et al. (2013). "Inhibition of calcineurin in the prefrontal cortex induced depressive-like behavior through mTOR signaling pathway." *Psychopharmacology (Berl)* 225(2): 361-372.

- Yu, X. and R. C. Malenka (2003). "Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis." *Nat Neurosci* 6(11): 1169-1177.
- Zachary, I. (2003). "VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1171-1177.
- Zaghetto, A. A., S. Paina, et al. (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(36): 9757-9768.
- Zandi, P. P., P. L. Belmonte, et al. (2008). "Association study of Wnt signaling pathway genes in bipolar disorder." *Arch Gen Psychiatry* 65(7): 785-793.
- Zeller, K. I., A. G. Jegga, et al. (2003). "An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets." *Genome biology* 4(10): R69.
- Zeng, X., K. Tamai, et al. (2005). "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation." *Nature* 438(7069): 873-877.
- Zeng, Z. Y., Y. H. Zhou, et al. (2007). "Gene expression profiling of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway." *Hum Pathol* 38(1): 120-133.
- Zhang, H. T. (2009). "Cyclic AMP-specific phosphodiesterase-4 as a target for the development of antidepressant drugs." *Curr Pharm Des* 15(14): 1688-1698.
- Zhang, L. H., M. Li, et al. (2011). "[Association of the schizophrenia susceptible gene DKK4 with brain volume in Chinese populations]." *Dongwuxue Yanjiu* 32(1): 62-65.
- Zhang, Z. G., L. Zhang, et al. (2000). "VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain." *J Clin Invest* 106(7): 829-838.
- Zhou, C. J., C. Zhao, et al. (2004). "Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities." *J Neurosci* 24(1): 121-126.
- Zubenko, G. S., B. Maher, et al. (2003). "Genome-wide linkage survey for genetic loci that influence the development of depressive disorders in families with recurrent, early-onset, major depression." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 123B(1): 1-18.
- Zubenko, G. S., B. S. Maher, et al. (2004). "Genome-wide linkage survey for genetic loci that affect the risk of suicide attempts in families with recurrent, early-onset, major depression." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129B(1): 47-54.
- Zupanc, G. K. and I. Horschke (1995). "Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study." *J Comp Neurol* 353(2): 213-233.
- (2011). "Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4." *Nat Genet* 43(10): 977-983.
- Aberle, H., A. Bauer, et al. (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." *EMBO J* 16(13): 3797-3804.
- Adachi, K., Z. Mirzadeh, et al. (2007). "Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone." *Stem Cells* 25(11): 2827-2836.
- Adachi, M., M. Barrot, et al. (2008). "Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy." *Biol Psychiatry* 63(7): 642-649.
- Adell, A., E. Castro, et al. (2005). "Strategies for producing faster acting antidepressants." *Drug Discov Today* 10(8): 578-585.
- Adler, P. N. and H. Lee (2001). "Frizzled signaling and cell-cell interactions in planar polarity." *Curr Opin Cell Biol* 13(5): 635-640.
- Al-Harbi, K. S. and N. A. Qureshi (2012). "Neuromodulation therapies and treatment-resistant depression." *Med Devices (Auckl)* 5: 53-65.
- Alberi, L., S. E. Hoey, et al. (2013). "Notch signaling in the brain: in good and bad times." *Ageing research reviews* 12(3): 801-814.
- Alberi, L., S. Liu, et al. (2011). "Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks." *Neuron* 69(3): 437-444.
- Alexopoulos, G. S., B. S. Meyers, et al. (1997). "'Vascular depression' hypothesis." *Arch Gen Psychiatry* 54(10): 915-922.
- Alfonso, J., L. R. Frick, et al. (2006). "Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments." *Biol Psychiatry* 59(3): 244-251.
- Alme, M. N., K. Wibbrand, et al. (2007). "Chronic fluoxetine treatment induces brain region-specific upregulation of genes associated with BDNF-induced long-term potentiation." *Neural Plast* 2007: 26496.
- Altman, J. (1962). "Are new neurons formed in the brains of adult mammals?" *Science* 135(3509): 1127-1128.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Post-natal origin of microneurons in the rat brain." *Nature* 207(5000): 953-956.
- Alvarez-Buylla, A. and S. Temple (1998). "Stem cells in the developing and adult nervous system." *J Neurobiol* 36(2): 105-110.
- Amit, S., A. Hatzubai, et al. (2002). "Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway." *Genes Dev* 16(9): 1066-1076.
- Arnold, H. K., X. Zhang, et al. (2009). "The Axin1 scaffold protein promotes formation of a degradation complex for c-Myc." *EMBO J* 28(5): 500-512.

- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, et al. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* 284(5415): 770-776.
- Artegiani, B., D. Lindemann, et al. (2011). "Overexpression of cdk4 and cyclinD1 triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain." *The Journal of experimental medicine* 208(5): 937-948.
- Asghari, V., J. F. Wang, et al. (1998). "Differential effects of mood stabilizers on Fos/Jun proteins and AP-1 DNA binding activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." *Brain research. Molecular brain research* 58(1-2): 95-102.
- Association, A. P. (2013 ). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)*. Arlington, American Psychiatric Association.
- Autry, A. E. and L. M. Monteggia (2012). "Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders." *Pharmacol Rev* 64(2): 238-258.
- Bachis, A., M. I. Cruz, et al. (2008). "Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex." *Neurosci Lett* 442(2): 104-108.
- Bajestan, S. N., A. H. Sabouri, et al. (2006). "Association of AKT1 haplotype with the risk of schizophrenia in Iranian population." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B(4): 383-386.
- Baldin, V., J. Lukas, et al. (1993). "Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1." *Genes & development* 7(5): 812-821.
- Bamji, S. X., B. Rico, et al. (2006). "BDNF mobilizes synaptic vesicles and enhances synapse formation by disrupting cadherin-beta-catenin interactions." *J Cell Biol* 174(2): 289-299.
- Bamji, S. X., K. Shimazu, et al. (2003). "Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly." *Neuron* 40(4): 719-731.
- Banasr, M. and R. S. Duman (2008). "Keeping 'trk' of antidepressant actions." *Neuron* 59(3): 349-351.
- Banasr, M., M. Hery, et al. (2001). "Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus." *Eur J Neurosci* 14(9): 1417-1424.
- Barbash, O., P. Zamfirova, et al. (2008). "Mutations in Fbx4 inhibit dimerization of the SCF(Fbx4) ligase and contribute to cyclin D1 overexpression in human cancer." *Cancer cell* 14(1): 68-78.
- Barnea, A. and F. Nottebohm (1994). "Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23): 11217-11221.
- Barroso, I., M. Gurnell, et al. (1999). "Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension." *Nature* 402(6764): 880-883.
- Beaulieu, J. M., X. Zhang, et al. (2008). "Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(4): 1333-1338.
- Beauquis, J., P. Roig, et al. (2006). "Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurons in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment." *Eur J Neurosci* 23(6): 1539-1546.
- Benedetti, F., A. Bernasconi, et al. (2004). "A single nucleotide polymorphism in glycogen synthase kinase 3-beta promoter gene influences onset of illness in patients affected by bipolar disorder." *Neurosci Lett* 355(1-2): 37-40.
- Benedetti, F., S. Dallaspesza, et al. (2012). "Gene-gene interaction of glycogen synthase kinase 3-beta and serotonin transporter on human antidepressant response to sleep deprivation." *J Affect Disord* 136(3): 514-519.
- Benes, F. M., D. Matzilevich, et al. (2006). "The expression of proapoptosis genes is increased in bipolar disorder, but not in schizophrenia." *Mol Psychiatry* 11(3): 241-251.
- Berezovska, O., P. McLean, et al. (1999). "Notch1 inhibits neurite outgrowth in postmitotic primary neurons." *Neuroscience* 93(2): 433-439.
- Berezovska, O., M. Q. Xia, et al. (1998). "Notch is expressed in adult brain, is coexpressed with presenilin-1, and is altered in Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* 57(8): 738-745.
- Bergami, M., R. Rimondini, et al. (2008). "Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(40): 15570-15575.
- Bergstrom, A., M. N. Jayatissa, et al. (2008). "Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression; an in situ hybridization study." *Brain Res* 1196: 41-52.
- Berrettini, W. (2003). "Evidence for shared susceptibility in bipolar disorder and schizophrenia." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 123C(1): 59-64.
- Berton, O., C. A. McClung, et al. (2006). "Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress." *Science* 311(5762): 864-868.
- Berton, O. and E. J. Nestler (2006). "New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines." *Nat Rev Neurosci* 7(2): 137-151.
- Bertrand, N., D. S. Castro, et al. (2002). "Proneural genes and the specification of neural cell types." *Nature reviews. Neuroscience* 3(7): 517-530.
- Bessa, J. M., D. Ferreira, et al. (2009). "The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling." *Mol Psychiatry* 14(8): 764-773, 739.
- Bierkamp, C. and J. A. Campos-Ortega (1993). "A zebrafish homologue of the Drosophila neurogenic gene Notch and its pattern of transcription during early embryogenesis." *Mechanisms of development* 43(2-3): 87-100.

- Blendy, J. A. (2006). "The role of CREB in depression and antidepressant treatment." *Biol Psychiatry* 59(12): 1144-1150.
- Blugeot, A., C. Rivat, et al. (2011). "Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers." *J Neurosci* 31(36): 12889-12899.
- Boku, S., S. Nakagawa, et al. (2009). "Glucocorticoids and lithium reciprocally regulate the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursor cells through GSK-3beta and beta-catenin/TCF pathway." *Neuropsychopharmacology* 34(3): 805-815.
- Boldrini, M. and V. Arango (2010). "Antidepressants, age, and neuroprogenitors." *Neuropsychopharmacology* 35(1): 351-352.
- Borrell, V. and F. Calegari (2014). "Mechanisms of brain evolution: regulation of neural progenitor cell diversity and cell cycle length." *Neuroscience research* 86: 14-24.
- Bowley, M. P., W. C. Drevets, et al. (2002). "Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder." *Biol Psychiatry* 52(5): 404-412.
- Braissant, O., F. Fougère, et al. (1996). "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat." *Endocrinology* 137(1): 354-366.
- Brandenberger, R., H. Wei, et al. (2004). "Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation." *Nat Biotechnol* 22(6): 707-716.
- Brembeck, F. H., T. Schwarz-Romond, et al. (2004). "Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions." *Genes Dev* 18(18): 2225-2230.
- Bremner, J. D., M. Narayan, et al. (2000). "Hippocampal volume reduction in major depression." *Am J Psychiatry* 157(1): 115-118.
- Bremner, J. D., M. Vythilingam, et al. (2004). "Effects of glucocorticoids on declarative memory function in major depression." *Biol Psychiatry* 55(8): 811-815.
- Bremner, J. D., M. Vythilingam, et al. (2004). "Deficits in hippocampal and anterior cingulate functioning during verbal declarative memory encoding in midlife major depression." *Am J Psychiatry* 161(4): 637-645.
- Bretones, G., M. D. Delgado, et al. (2015). "Myc and cell cycle control." *Biochimica et biophysica acta* 1849(5): 506-516.
- Breunig, J. J., J. Silbereis, et al. (2007). "Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(51): 20558-20563.
- Brockington, A., C. Lewis, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor and the nervous system." *Neuropathol Appl Neurobiol* 30(5): 427-446.
- Bryja, V., G. Schulte, et al. (2007). "Wnt-3a utilizes a novel low dose and rapid pathway that does not require casein kinase 1-mediated phosphorylation of Dvl to activate beta-catenin." *Cell Signal* 19(3): 610-616.
- Bylsma, L. M., B. H. Morris, et al. (2008). "A meta-analysis of emotional reactivity in major depressive disorder." *Clin Psychol Rev* 28(4): 676-691.
- Cadigan, K. M. and R. Nusse (1997). "Wnt signaling: a common theme in animal development." *Genes Dev* 11(24): 3286-3305.
- Campbell, S. and G. Macqueen (2004). "The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression." *J Psychiatry Neurosci* 29(6): 417-426.
- Cao, L., X. Jiao, et al. (2004). "VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory." *Nat Genet* 36(8): 827-835.
- Carlezon, W. A., Jr., R. S. Duman, et al. (2005). "The many faces of CREB." *Trends Neurosci* 28(8): 436-445.
- Caspi, A., K. Sugden, et al. (2003). "Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene." *Science* 301(5631): 386-389.
- Castro, J. E., E. Varea, et al. (2010). "Role of the amygdala in antidepressant effects on hippocampal cell proliferation and survival and on depression-like behavior in the rat." *PLoS One* 5(1): e8618.
- Cavallo, R. A., R. T. Cox, et al. (1998). "Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity." *Nature* 395(6702): 604-608.
- Cerqueira, J. J., F. Maillet, et al. (2007). "The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress." *J Neurosci* 27(11): 2781-2787.
- Ciani, L. and P. C. Salinas (2005). "WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity." *Nat Rev Neurosci* 6(5): 351-362.
- Clark-Raymond, A. and A. Halaris (2013). "VEGF and depression: a comprehensive assessment of clinical data." *J Psychiatr Res* 47(8): 1080-1087.
- Clevers, H. and R. Nusse (2012). "Wnt/beta-catenin signaling and disease." *Cell* 149(6): 1192-1205.
- Coffman, C., W. Harris, et al. (1990). "Xotch, the Xenopus homolog of Drosophila notch." *Science* 249(4975): 1438-1441.
- Conboy, L., C. M. Seymour, et al. (2007). "Notch signalling becomes transiently attenuated during long-term memory consolidation in adult Wistar rats." *Neurobiology of learning and memory* 88(3): 342-351.
- Cong, F. and H. Varmus (2004). "Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2882-2887.

- Costa, R. M., T. Honjo, et al. (2003). "Learning and memory deficits in Notch mutant mice." *Current biology* : CB 13(15): 1348-1354.
- Crowner, D., M. Le Gall, et al. (2003). "Notch steers *Drosophila* ISNb motor axons by regulating the Abl signaling pathway." *Current biology* : CB 13(11): 967-972.
- Czeh, B. and P. J. Lucassen (2007). "What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated?" *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257(5): 250-260.
- Czeh, B., T. Michaelis, et al. (2001). "Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12796-12801.
- Czeh, B., J. I. Muller-Keuker, et al. (2007). "Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment." *Neuropsychopharmacology* 32(7): 1490-1503.
- Chambers, C. B., Y. Peng, et al. (2001). "Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors." *Development* 128(5): 689-702.
- Chandran, A., A. H. Iyo, et al. (2013). "Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40: 240-245.
- Chao, M. Y., J. Larkins-Ford, et al. (2005). "lin-12 Notch functions in the adult nervous system of *C. elegans*." *BMC neuroscience* 6: 45.
- Chen, A. C., Y. Shirayama, et al. (2001). "Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect." *Biol Psychiatry* 49(9): 753-762.
- Chen, G., L. D. Huang, et al. (1999). "The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3." *J Neurochem* 72(3): 1327-1330.
- Chen, T., M. Li, et al. (2009). "Identification of zinc-finger BED domain-containing 3 (Zbed3) as a novel Axin-interacting protein that activates Wnt/beta-catenin signaling." *J Biol Chem* 284(11): 6683-6689.
- Chiba, S. (2006). "Notch signaling in stem cell systems." *Stem cells* 24(11): 2437-2447.
- Choi, S. H., Y. Li, et al. (2009). "Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF." *Mol Neurodegener* 4: 52.
- Dahmen, R. P., A. Koch, et al. (2001). "Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas." *Cancer Res* 61(19): 7039-7043.
- Dann, C. E., J. C. Hsieh, et al. (2001). "Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains." *Nature* 412(6842): 86-90.
- Datson, N. A., M. C. Morsink, et al. (2008). "Central corticosteroid actions: Search for gene targets." *Eur J Pharmacol* 583(2-3): 272-289.
- de la Pompa, J. L., A. Wakeham, et al. (1997). "Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis." *Development* 124(6): 1139-1148.
- Deardorff, M. A., C. Tan, et al. (2001). "A role for frizzled 3 in neural crest development." *Development* 128(19): 3655-3663.
- Delerive, P., J. C. Fruchart, et al. (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control." *J Endocrinol* 169(3): 453-459.
- Deng, W., J. B. Aimone, et al. (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" *Nat Rev Neurosci* 11(5): 339-350.
- Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." *Endocr Rev* 20(5): 649-688.
- Diamond, D. M., A. Campbell, et al. (2004). "Preclinical research on stress, memory, and the brain in the development of pharmacotherapy for depression." *Eur Neuropsychopharmacol* 14 Suppl 5: S491-495.
- Diehl, J. A., F. Zindy, et al. (1997). "Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway." *Genes & development* 11(8): 957-972.
- Doetsch, F., J. M. Verdugo, et al. (2002). "Lack of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 results in selective increase of transit-amplifying cells for adult neurogenesis." *J Neurosci* 22(6): 2255-2264.
- Doherty, G. H. (2007). "Developmental switch in the effects of TNFalpha on ventral midbrain dopaminergic neurons." *Neurosci Res* 57(2): 296-305.
- Dominguez-Escriba, L., V. Hernandez-Rabaza, et al. (2006). "Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus." *Eur J Neurosci* 24(2): 586-594.
- Dowell, P., J. E. Ishmael, et al. (1999). "Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein." *J Biol Chem* 274(22): 15901-15907.
- Dowlatsahi, D., G. M. MacQueen, et al. (1999). "G Protein-coupled cyclic AMP signaling in postmortem brain of subjects with mood disorders: effects of diagnosis, suicide, and treatment at the time of death." *J Neurochem* 73(3): 1121-1126.
- Dowlatsahi, D., G. M. MacQueen, et al. (1998). "Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression." *Lancet* 352(9142): 1754-1755.
- Dranovsky, A. and R. Hen (2006). "Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants." *Biol Psychiatry* 59(12): 1136-1143.

- Duman, R. S., G. R. Heninger, et al. (1997). "A molecular and cellular theory of depression." *Arch Gen Psychiatry* 54(7): 597-606.
- Duman, R. S., J. Malberg, et al. (2000). "Neuronal plasticity and survival in mood disorders." *Biol Psychiatry* 48(8): 732-739.
- Duman, R. S., J. Malberg, et al. (1999). "Neural plasticity to stress and antidepressant treatment." *Biol Psychiatry* 46(9): 1181-1191.
- Duman, R. S. and L. M. Monteggia (2006). "A neurotrophic model for stress-related mood disorders." *Biol Psychiatry* 59(12): 1116-1127.
- Dvorak, H. F. (2006). "Discovery of vascular permeability factor (VPF)." *Exp Cell Res* 312(5): 522-526.
- Dwivedi, Y. (2009). "Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide." *Neuropsychiatr Dis Treat* 5: 433-449.
- Dwivedi, Y., A. C. Mondal, et al. (2006). "Differential and brain region-specific regulation of Rap-1 and Epac in depressed suicide victims." *Arch Gen Psychiatry* 63(6): 639-648.
- Egan, M. F., M. Kojima, et al. (2003). "The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function." *Cell* 112(2): 257-269.
- Eisch, A. J., C. A. Bolanos, et al. (2003). "Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression." *Biol Psychiatry* 54(10): 994-1005.
- Eissa Ahmed, A. A. and N. M. Al-Rasheed (2009). "Antidepressant-like effects of rosiglitazone, a PPARgamma agonist, in the rat forced swim and mouse tail suspension tests." *Behav Pharmacol* 20(7): 635-642.
- Elbrecht, A., Y. Chen, et al. (1996). "Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2." *Biochem Biophys Res Commun* 224(2): 431-437.
- Elfving, B., P. H. Plougmann, et al. (2010). "Differential brain, but not serum VEGF levels in a genetic rat model of depression." *Neurosci Lett* 474(1): 13-16.
- Emamian, E. S., D. Hall, et al. (2004). "Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia." *Nat Genet* 36(2): 131-137.
- Encinas, J. M., A. Vaahtokari, et al. (2006). "Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(21): 8233-8238.
- Eom, T. Y. and R. S. Jope (2009). "Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3alpha/beta impairs in vivo neural precursor cell proliferation." *Biol Psychiatry* 66(5): 494-502.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* 4(11): 1313-1317.
- Extein, I., J. Tallman, et al. (1979). "Changes in lymphocyte beta-adrenergic receptors in depression and mania." *Psychiatry Res* 1(2): 191-197.
- Fabel, K., B. Tam, et al. (2003). "VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis." *Eur J Neurosci* 18(10): 2803-2812.
- Fagotto, F., E. Jho, et al. (1999). "Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization." *J Cell Biol* 145(4): 741-756.
- Fancy, S. P., E. P. Harrington, et al. (2011). "Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination." *Nat Neurosci* 14(8): 1009-1016.
- Fearnhead, N. S., M. P. Britton, et al. (2001). "The ABC of APC." *Hum Mol Genet* 10(7): 721-733.
- Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." *Nat Med* 9(6): 669-676.
- Ferres-Coy, A., F. Pilar-Cuellar, et al. (2013). "RNAi-mediated serotonin transporter suppression rapidly increases serotonergic neurotransmission and hippocampal neurogenesis." *Transl Psychiatry* 3: e211.
- Fong, G. H., L. Zhang, et al. (1999). "Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice." *Development* 126(13): 3015-3025.
- Fournier, N. M. and R. S. Duman (2012). "Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: implications for the pathophysiology and treatment of depression." *Behav Brain Res* 227(2): 440-449.
- Frame, S., P. Cohen, et al. (2001). "A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation." *Mol Cell* 7(6): 1321-1327.
- Fujioka, T., A. Fujioka, et al. (2004). "Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus." *J Neurosci* 24(2): 319-328.
- Fukuchi, M., H. Fujii, et al. (2010). "Activation of tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its selective inhibition through Ca(2+) signals evoked via the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor." *Brain Res* 1366: 18-26.
- Fuster-Matanzo, A., M. Llorens-Martin, et al. (2013). "Dual effects of increased glycogen synthase kinase-3beta activity on adult neurogenesis." *Hum Mol Genet* 22(7): 1300-1315.
- Galceran, J., E. M. Miyashita-Lin, et al. (2000). "Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1." *Development* 127(3): 469-482.
- Gan, X. Q., J. Y. Wang, et al. (2008). "Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction." *The Journal of cell biology* 180(6): 1087-1100.

- Gao, X., P. Arlotta, et al. (2007). "Conditional knock-out of beta-catenin in postnatal-born dentate gyrus granule neurons results in dendritic malformation." *J Neurosci* 27(52): 14317-14325.
- Gardner, O. S., B. J. Dewar, et al. (2005). "Activation of mitogen-activated protein kinases by peroxisome proliferator-activated receptor ligands: an example of nongenomic signaling." *Mol Pharmacol* 68(4): 933-941.
- Garza, J. C., M. Guo, et al. (2008). "Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro." *J Biol Chem* 283(26): 18238-18247.
- Garza, J. C., M. Guo, et al. (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(8): 790-808.
- Gasbarri, A., C. Verney, et al. (1994). "Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study." *Brain Res* 668(1-2): 71-79.
- Ge, S., K. A. Sailor, et al. (2008). "Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus." *J Physiol* 586(16): 3759-3765.
- Gordon, M. D. and R. Nusse (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." *J Biol Chem* 281(32): 22429-22433.
- Gottardi, C. J. and B. M. Gumbiner (2004). "Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes." *J Cell Biol* 167(2): 339-349.
- Gottardi, C. J. and B. M. Gumbiner (2004). "Role for ICAT in beta-catenin-dependent nuclear signaling and cadherin functions." *Am J Physiol Cell Physiol* 286(4): C747-756.
- Gould, E., B. S. McEwen, et al. (1997). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation." *J Neurosci* 17(7): 2492-2498.
- Gould, T. D., G. Chen, et al. (2004). "In vivo evidence in the brain for lithium inhibition of glycogen synthase kinase-3." *Neuropsychopharmacology* 29(1): 32-38.
- Gould, T. D., H. Einat, et al. (2004). "AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test." *Int J Neuropsychopharmacol* 7(4): 387-390.
- Gould, T. D., H. Einat, et al. (2007). "Beta-catenin overexpression in the mouse brain phenocopies lithium-sensitive behaviors." *Neuropsychopharmacology* 32(10): 2173-2183.
- Gould, T. D. and H. K. Manji (2002). "Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders." *J Psychosom Res* 53(2): 687-697.
- Gould, T. D., K. C. O'Donnell, et al. (2008). "Generation and behavioral characterization of beta-catenin forebrain-specific conditional knock-out mice." *Behav Brain Res* 189(1): 117-125.
- Grandbarbe, L., J. Bouissac, et al. (2003). "Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process." *Development* 130(7): 1391-1402.
- Gray, G. E., R. S. Mann, et al. (1999). "Human ligands of the Notch receptor." *The American journal of pathology* 154(3): 785-794.
- Green, J. L., S. G. Kuntz, et al. (2008). "Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more." *Trends Cell Biol* 18(11): 536-544.
- Greene, J., M. Banasr, et al. (2009). "Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: pharmacological and cellular characterization." *Neuropsychopharmacology* 34(11): 2459-2468.
- Guillemot, F. (2007). "Cell fate specification in the mammalian telencephalon." *Prog Neurobiol* 83(1): 37-52.
- Gulyas, A. I., L. Acsady, et al. (1999). "Structural basis of the cholinergic and serotonergic modulation of GABAergic neurons in the hippocampus." *Neurochem Int* 34(5): 359-372.
- Gumbiner, B. M. (1995). "Signal transduction of beta-catenin." *Curr Opin Cell Biol* 7(5): 634-640.
- Guo, Y., K. Yang, et al. (2005). "Phosphorylation of cyclin D1 at Thr 286 during S phase leads to its proteasomal degradation and allows efficient DNA synthesis." *Oncogene* 24(16): 2599-2612.
- Guo, Y. J., Z. J. Zhang, et al. (2009). "Notch1 signaling, hippocampal neurogenesis and behavioral responses to chronic unpredictable mild stress in adult ischemic rats." *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 33(4): 688-694.
- Halmai, Z., P. Dome, et al. (2013). "Peripheral vascular endothelial growth factor level is associated with antidepressant treatment response: results of a preliminary study." *J Affect Disord* 144(3): 269-273.
- Halper, J. P., R. P. Brown, et al. (1988). "Blunted beta-adrenergic responsivity of peripheral blood mononuclear cells in endogenous depression. Isoproterenol dose-response studies." *Arch Gen Psychiatry* 45(3): 241-244.
- Hardingham, G. E., F. J. Arnold, et al. (2001). "Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity." *Nat Neurosci* 4(3): 261-267.
- Haroon, E., C. L. Raison, et al. (2012). "Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior." *Neuropsychopharmacology* 37(1): 137-162.
- Hart, M., J. P. Concordet, et al. (1999). "The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell." *Curr Biol* 9(4): 207-210.
- Hart, M. J., R. de los Santos, et al. (1998). "Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta." *Curr Biol* 8(10): 573-581.
- Hashimoto, K. (2010). "Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: an historical overview and future directions." *Psychiatry Clin Neurosci* 64(4): 341-357.

- Heine, V. M., S. Maslam, et al. (2004). "Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible." *Eur J Neurosci* 19(1): 131-144.
- Heine, V. M., J. Zareno, et al. (2005). "Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression." *Eur J Neurosci* 21(5): 1304-1314.
- Hellsten, J., M. Wennstrom, et al. (2004). "Electroconvulsive seizures induce endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus." *Biol Psychiatry* 55(4): 420-427.
- Hendrickx, M. and L. Leyns (2008). "Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors." *Dev Growth Differ* 50(4): 229-243.
- Herdegen, T. and J. D. Leah (1998). "Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins." *Brain research. Brain research reviews* 28(3): 370-490.
- Hernandez, F., J. Borrell, et al. (2002). "Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments." *J Neurochem* 83(6): 1529-1533.
- Hikasa, H., J. Ezan, et al. (2010). "Regulation of TCF3 by Wnt-dependent phosphorylation during vertebrate axis specification." *Dev Cell* 19(4): 521-532.
- Hinck, L., I. S. Nathke, et al. (1994). "Beta-catenin: a common target for the regulation of cell adhesion by Wnt-1 and Src signaling pathways." *Trends Biochem Sci* 19(12): 538-542.
- Hino, S., T. Michiue, et al. (2003). "Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin." *J Biol Chem* 278(16): 14066-14073.
- Hirschfeld, R. M. (2012). "Depression epidemiology and its treatment evolution." *J Clin Psychiatry* 73(10): e29.
- Hitomi, M. and D. W. Stacey (1999). "Cyclin D1 production in cycling cells depends on ras in a cell-cycle-specific manner." *Current biology : CB* 9(19): 1075-1084.
- Hong, S., Y. Xin, et al. (2013). "The PPARgamma agonist rosiglitazone prevents neuronal loss and attenuates development of spontaneous recurrent seizures through BDNF/TrkB signaling following pilocarpine-induced status epilepticus." *Neurochem Int* 63(5): 405-412.
- Horvitz, H. R. and P. W. Sternberg (1991). "Multiple intercellular signalling systems control the development of the *Caenorhabditis elegans* vulva." *Nature* 351(6327): 535-541.
- Hoshaw, B. A., J. E. Malberg, et al. (2005). "Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects." *Brain Res* 1037(1-2): 204-208.
- Howell, K. R., A. Kutianawalla, et al. (2011). "Long-term continuous corticosterone treatment decreases VEGF receptor-2 expression in frontal cortex." *PLoS One* 6(5): e20198.
- Hsu, W., L. Zeng, et al. (1999). "Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain." *J Biol Chem* 274(6): 3439-3445.
- Hu, J., C. X. Luo, et al. (2012). "20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF-kappaB and JNK pathways." *PLoS One* 7(12): e50764.
- Huang, H. C. and P. S. Klein (2004). "The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways." *Genome Biol* 5(7): 234.
- Hur, E. M. and F. Q. Zhou (2010). "GSK3 signalling in neural development." *Nat Rev Neurosci* 11(8): 539-551.
- Hussaini, S. M., C. I. Choi, et al. (2014). "Wnt signaling in neuropsychiatric disorders: ties with adult hippocampal neurogenesis and behavior." *Neurosci Biobehav Rev* 47: 369-383.
- Ide, M., T. Ohnishi, et al. (2006). "Failure to support a genetic contribution of AKT1 polymorphisms and altered AKT signaling in schizophrenia." *J Neurochem* 99(1): 277-287.
- Ikeda, M., N. Iwata, et al. (2004). "Association of AKT1 with schizophrenia confirmed in a Japanese population." *Biol Psychiatry* 56(9): 698-700.
- Ikeda, S., M. Kishida, et al. (2000). "GSK-3beta-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin." *Oncogene* 19(4): 537-545.
- Ikeda, S., S. Kishida, et al. (1998). "Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin." *EMBO J* 17(5): 1371-1384.
- Imayoshi, I., M. Sakamoto, et al. (2010). "Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(9): 3489-3498.
- Inkster, B., T. E. Nichols, et al. (2009). "Association of GSK3beta polymorphisms with brain structural changes in major depressive disorder." *Arch Gen Psychiatry* 66(7): 721-728.
- Ishizaki, Y., S. Ikeda, et al. (2004). "Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas." *Int J Oncol* 24(5): 1077-1083.
- Issemann, I. and S. Green (1990). "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators." *Nature* 347(6294): 645-650.
- Jaako-Movits, K., T. Zharkovsky, et al. (2006). "Decreased hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy is reversed by repeated citalopram administration." *Cell Mol Neurobiol* 26(7-8): 1559-1570.
- Jackstadt, R. and H. Hermeking (2015). "MicroRNAs as regulators and mediators of c-MYC function." *Biochimica et biophysica acta* 1849(5): 544-553.

- Jackstadt, R., A. Menssen, et al. (2013). "Genome-wide analysis of c-MYC-regulated mRNAs and miRNAs, and c-MYC DNA binding by next-generation sequencing." *Methods in molecular biology* 1012: 145-185.
- Jacobs, B. L., H. van Praag, et al. (2000). "Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression." *Mol Psychiatry* 5(3): 262-269.
- Jang, M. H., M. A. Bonaguidi, et al. (2013). "Secreted frizzled-related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis." *Cell Stem Cell* 12(2): 215-223.
- Jarskog, L. F., J. H. Gilmore, et al. (2007). "Caspase-3 activation in rat frontal cortex following treatment with typical and atypical antipsychotics." *Neuropsychopharmacology* 32(1): 95-102.
- Jayatissa, M. N., K. Henningsen, et al. (2009). "Decreased cell proliferation in the dentate gyrus does not associate with development of anhedonic-like symptoms in rats." *Brain Res* 1290: 133-141.
- Jin, K., Y. Zhu, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11946-11950.
- Johnston, S. H., C. Rauskolb, et al. (1997). "A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway." *Development* 124(11): 2245-2254.
- Jope, R. S. and G. N. Bijur (2002). "Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3beta and cell survival." *Mol Psychiatry* 7 Suppl 1: S35-45.
- Jordan, J. D., D. K. Ma, et al. (2007). "Cellular niches for endogenous neural stem cells in the adult brain." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(5): 336-341.
- Kadesch, T. (2004). "Notch signaling: the demise of elegant simplicity." *Current opinion in genetics & development* 14(5): 506-512.
- Kageyama, R. and T. Ohtsuka (1999). "The Notch-Hes pathway in mammalian neural development." *Cell research* 9(3): 179-188.
- Kaidanovich-Beilin, O., A. Milman, et al. (2004). "Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus." *Biol Psychiatry* 55(8): 781-784.
- Kallunki, T., B. Su, et al. (1994). "JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation." *Genes & development* 8(24): 2996-3007.
- Karege, F., G. Bondolfi, et al. (2005). "Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity." *Biol Psychiatry* 57(9): 1068-1072.
- Karege, F., N. Perroud, et al. (2012). "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(1-2): 185-188.
- Karege, F., G. Vaudan, et al. (2005). "Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs." *Brain Res Mol Brain Res* 136(1-2): 29-37.
- Katoh, M. (2002). "Regulation of WNT signaling molecules by retinoic acid during neuronal differentiation in NT2 cells: threshold model of WNT action (review)." *Int J Mol Med* 10(6): 683-687.
- Katoh, M. (2003). "Identification and characterization of human DAAM2 gene in silico." *Int J Oncol* 22(4): 915-920.
- Katsu, T., H. Ujike, et al. (2003). "The human frizzled-3 (FZD3) gene on chromosome 8p21, a receptor gene for Wnt ligands, is associated with the susceptibility to schizophrenia." *Neurosci Lett* 353(1): 53-56.
- Kawahara, K., T. Morishita, et al. (2000). "Down-regulation of beta-catenin by the colorectal tumor suppressor APC requires association with Axin and beta-catenin." *J Biol Chem* 275(12): 8369-8374.
- Kaya, D., Y. Gursoy-Ozdemir, et al. (2005). "VEGF protects brain against focal ischemia without increasing blood-brain permeability when administered intracerebroventricularly." *J Cereb Blood Flow Metab* 25(9): 1111-1118.
- Kemp, D. E., F. Ismail-Beigi, et al. (2012). "Use of insulin sensitizers for the treatment of major depressive disorder: a pilot study of pioglitazone for major depression accompanied by abdominal obesity." *J Affect Disord* 136(3): 1164-1173.
- Kempermann, G. (2002). "Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression." *Bipolar Disord* 4(1): 17-33.
- Kempermann, G. (2008). "The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for?" *Trends in neurosciences* 31(4): 163-169.
- Kempermann, G., E. J. Chesler, et al. (2006). "Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(3): 780-785.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn, et al. (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." *Nature* 386(6624): 493-495.
- Kempermann, G., L. Wiskott, et al. (2004). "Functional significance of adult neurogenesis." *Curr Opin Neurobiol* 14(2): 186-191.
- Kersten, S., B. Desvergne, et al. (2000). "Roles of PPARs in health and disease." *Nature* 405(6785): 421-424.
- Kidd, S., M. R. Kelley, et al. (1986). "Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors." *Molecular and cellular biology* 6(9): 3094-3108.
- Kikuchi, A. (2000). "Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 268(2): 243-248.

- Kim, W. Y., X. Wang, et al. (2009). "GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis." *Nat Neurosci* 12(11): 1390-1397.
- Kimelman, D. and W. Xu (2006). "beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective." *Oncogene* 25(57): 7482-7491.
- Kirikoshi, H., J. Koike, et al. (2000). "Molecular cloning and genomic structure of human frizzled-3 at chromosome 8p21." *Biochem Biophys Res Commun* 271(1): 8-14.
- Kishimoto, M., H. Ujike, et al. (2008). "The Frizzled 3 gene is associated with methamphetamine psychosis in the Japanese population." *Behav Brain Funct* 4: 37.
- Kitamura, Y., S. Hattori, et al. (2015). "Doxorubicin and cyclophosphamide treatment produces anxiety-like behavior and spatial cognition impairment in rats: Possible involvement of hippocampal neurogenesis via brain-derived neurotrophic factor and cyclin D1 regulation." *Behavioural brain research* 292: 184-193.
- Kiuchi, T., H. Lee, et al. (2012). "Regular exercise cures depression-like behavior via VEGF-Flk-1 signaling in chronically stressed mice." *Neuroscience* 207: 208-217.
- Klein, P. S. and D. A. Melton (1996). "A molecular mechanism for the effect of lithium on development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8455-8459.
- Kobayashi, K., S. Sagae, et al. (1999). "Mutations of the beta-catenin gene in endometrial carcinomas." *Jpn J Cancer Res* 90(1): 55-59.
- Kocabas, N. A., I. Antonijevic, et al. (2011). "Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms: influence on treatment response phenotypes of major depressive disorder." *Int Clin Psychopharmacol* 26(1): 1-10.
- Kodama, M., T. Fujioka, et al. (2004). "Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat." *Biol Psychiatry* 56(8): 570-580.
- Koenigs, M. and J. Grafman (2009). "The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex." *Behav Brain Res* 201(2): 239-243.
- Kosten, T. A., M. P. Galloway, et al. (2008). "Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures." *Neuropsychopharmacology* 33(7): 1545-1558.
- Kumar, D. U. and H. Devaraj (2012). "Expression of Wnt 3a, beta-catenin, cyclin D1 and PCNA in mouse dentate gyrus subgranular zone (SGZ): a possible role of Wnt pathway in SGZ neural stem cell proliferation." *Folia biologica* 58(3): 115-120.
- Kurihara, T., S. Ikeda, et al. (2004). "Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers." *Thyroid* 14(12): 1020-1029.
- Kuwabara, T., J. Hsieh, et al. (2009). "Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis." *Nat Neurosci* 12(9): 1097-1105.
- Kuzman, M. R., V. Medved, et al. (2009). "Genome-wide expression analysis of peripheral blood identifies candidate biomarkers for schizophrenia." *J Psychiatr Res* 43(13): 1073-1077.
- Lafuente, J. V., B. Adan, et al. (1999). "Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR-beta) in human gliomas." *J Mol Neurosci* 13(1-2): 177-185.
- Lafuente, J. V., B. Mitre, et al. (2007). "Spatio-temporal distribution of apoptosis and the modulators thereof following a cortical microinfarct in rat brain." *Neurosci Res* 57(3): 354-361.
- Laifenfeld, D., R. Karry, et al. (2005). "Antidepressants and prolonged stress in rats modulate CAM-L1, laminin, and pCREB, implicated in neuronal plasticity." *Neurobiol Dis* 20(2): 432-441.
- Latapy, C., V. Rioux, et al. (2012). "Selective deletion of forebrain glycogen synthase kinase 3beta reveals a central role in serotonin-sensitive anxiety and social behaviour." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367(1601): 2460-2474.
- Latella, L., A. Sacco, et al. (2001). "Reconstitution of cyclin D1-associated kinase activity drives terminally differentiated cells into the cell cycle." *Molecular and cellular biology* 21(16): 5631-5643.
- Lee, E. and H. Son (2009). "Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors." *BMB Rep* 42(5): 239-244.
- Lee, H. J., J. W. Kim, et al. (2001). "Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats." *Mol Psychiatry* 6(6): 610, 725-618.
- Lee, W., S. Swarup, et al. (2009). "Homeodomain-interacting protein kinases (Hipks) promote Wnt/Wg signaling through stabilization of beta-catenin/Arm and stimulation of target gene expression." *Development* 136(2): 241-251.
- Lehmann, J. M., L. B. Moore, et al. (1995). "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)." *J Biol Chem* 270(22): 12953-12956.
- Lessmann, V., K. Gottmann, et al. (2003). "Neurotrophin secretion: current facts and future prospects." *Prog Neurobiol* 69(5): 341-374.
- Li, F., Z. Z. Chong, et al. (2005). "Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system." *Curr Neurovasc Res* 2(4): 331-340.
- Li, F., Z. Z. Chong, et al. (2006). "Winding through the WNT pathway during cellular development and demise." *Histol Histopathol* 21(1): 103-124.
- Li, L., H. Yuan, et al. (1999). "Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1." *EMBO J* 18(15): 4233-4240.

- Li, N., B. Lee, et al. (2010). "mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists." *Science* 329(5994): 959-964.
- Li, X., W. Zhu, et al. (2004). "In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain." *Neuropsychopharmacology* 29(8): 1426-1431.
- Li, Y. H., C. H. Zhang, et al. (2014). "Antidepressant-like effects of Chaihu-Shugan-San via SAPK/JNK signal transduction in rat models of depression." *Pharmacognosy magazine* 10(39): 271-277.
- Lie, A. A., B. Sommersberg, et al. (2005). "Analysis of pThr286-CaMKII and CaMKII immunohistochemistry in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy." *Epilepsy Res* 67(1-2): 13-23.
- Lie, D. C., S. A. Colamarino, et al. (2005). "Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis." *Nature* 437(7063): 1370-1375.
- Lie, D. C., H. Song, et al. (2004). "Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 399-421.
- Liem, M. K., J. van der Grond, et al. (2007). "Lacunar infarcts are the main correlate with cognitive dysfunction in CADASIL." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38(3): 923-928.
- Lin, H. S., G. J. Berry, et al. (2006). "Cyclin D1 and p16 expression in recurrent nasopharyngeal carcinoma." *World journal of surgical oncology* 4: 62.
- Liu, F., D. M. Virshup, et al. (2002). "Mechanism of regulation of casein kinase I activity by group I metabotropic glutamate receptors." *J Biol Chem* 277(47): 45393-45399.
- Liu, M., F. A. Pereira, et al. (2000). "Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems." *Genes Dev* 14(22): 2839-2854.
- Liu, R., W. Dang, et al. (2012). "Citalopram alleviates chronic stress induced depression-like behaviors in rats by activating GSK3beta signaling in dorsal hippocampus." *Brain Res* 1467: 10-17.
- Liu, X., R. Cheng, et al. (2011). "Genome-wide association study identifies candidate genes for Parkinson's disease in an Ashkenazi Jewish population." *BMC Med Genet* 12: 104.
- Liu, Y., D. H. Blackwood, et al. (2011). "Meta-analysis of genome-wide association data of bipolar disorder and major depressive disorder." *Molecular psychiatry* 16(1): 2-4.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1994). "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain." *Science* 264(5162): 1145-1148.
- Lonze, B. E. and D. D. Ginty (2002). "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system." *Neuron* 35(4): 605-623.
- Lopez-Garcia, C., A. Molowny, et al. (1988). "Delayed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex of lizards." *Brain Res* 471(2): 167-174.
- Lu, B., P. T. Pang, et al. (2005). "The yin and yang of neurotrophin action." *Nat Rev Neurosci* 6(8): 603-614.
- Lucassen, P. J., E. Fuchs, et al. (2004). "Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex." *Biol Psychiatry* 55(8): 789-796.
- Lucassen, P. J., P. Meerlo, et al. (2010). "Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action." *Eur Neuropsychopharmacol* 20(1): 1-17.
- Ludka, F. K., L. C. Constantino, et al. (2014). "Atorvastatin evokes a serotonergic system-dependent antidepressant-like effect in mice." *Pharmacol Biochem Behav* 122: 253-260.
- Ludka, F. K., A. D. Zomkowski, et al. (2013). "Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels." *Eur Neuropsychopharmacol* 23(5): 400-412.
- Lugert, S., O. Basak, et al. (2010). "Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging." *Cell Stem Cell* 6(5): 445-456.
- Luscher, B. and J. Vervoorts (2012). "Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC." *Gene* 494(2): 145-160.
- Lustig, B., B. Jerchow, et al. (2002). "Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors." *Mol Cell Biol* 22(4): 1184-1193.
- Llorens-Martin, M., A. Fuster-Matanzo, et al. (2013). "GSK-3beta overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo." *Mol Psychiatry* 18(4): 451-460.
- MacDonald, B. T., K. Tamai, et al. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." *Dev Cell* 17(1): 9-26.
- Machin, P., L. Catasus, et al. (2002). "CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas." *Hum Pathol* 33(2): 206-212.
- Madsen, T. M., S. S. Newton, et al. (2003). "Chronic electroconvulsive seizure up-regulates beta-catenin expression in rat hippocampus: role in adult neurogenesis." *Biol Psychiatry* 54(10): 1006-1014.
- Madsen, T. M., A. Treschow, et al. (2000). "Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy." *Biol Psychiatry* 47(12): 1043-1049.

- Magnusson, J. P., C. Goritz, et al. (2014). "A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse." *Science* 346(6206): 237-241.
- Malberg, J. E. and R. S. Duman (2003). "Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment." *Neuropsychopharmacology* 28(9): 1562-1571.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, et al. (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." *J Neurosci* 20(24): 9104-9110.
- Malberg, J. E. and L. E. Schechter (2005). "Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs." *Curr Pharm Des* 11(2): 145-155.
- Manier, D. H., R. C. Shelton, et al. (2002). "Noradrenergic antidepressants: does chronic treatment increase or decrease nuclear CREB-P?" *J Neural Transm* 109(1): 91-99.
- Mann, J. J., J. P. Halper, et al. (1997). "Subsensitivity of adenylyl cyclase-coupled receptors on mononuclear leukocytes from drug-free inpatients with a major depressive episode." *Biol Psychiatry* 42(10): 859-870.
- Marandi, N., A. Konnerth, et al. (2002). "Two-photon chloride imaging in neurons of brain slices." *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 445(3): 357-365.
- Marti, H. J., M. Bernaudin, et al. (2000). "Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia." *Am J Pathol* 156(3): 965-976.
- Martin, G., H. Poirier, et al. (2000). "Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer-selective retinoids suggests that the peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is their molecular target." *J Biol Chem* 275(17): 12612-12618.
- Martinez-Turrillas, R., J. Del Rio, et al. (2005). "Sequential changes in BDNF mRNA expression and synaptic levels of AMPA receptor subunits in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment." *Neuropharmacology* 49(8): 1178-1188.
- Martinowich, K., H. Manji, et al. (2007). "New insights into BDNF function in depression and anxiety." *Nat Neurosci* 10(9): 1089-1093.
- Mathew, S. J., K. Keegan, et al. (2005). "Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders." *Rev Bras Psiquiatr* 27(3): 243-248.
- Mato, S., R. Vidal, et al. (2010). "Long-term fluoxetine treatment modulates cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in the rat prefrontal cortex through 5-hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanisms." *Mol Pharmacol* 77(3): 424-434.
- Matsuda, T., T. Nakamura, et al. (1999). "STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells." *EMBO J* 18(15): 4261-4269.
- Matsuno, M., J. Horiuchi, et al. (2009). "The Drosophila cell adhesion molecule klongon is required for long-term memory formation and is regulated by Notch." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(1): 310-315.
- Matsushime, H., D. E. Quelle, et al. (1994). "D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells." *Molecular and cellular biology* 14(3): 2066-2076.
- Maurer, M. H., W. K. Tripps, et al. (2003). "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells." *Neurosci Lett* 344(3): 165-168.
- Mazzola-Pomietto, P., J. M. Azorin, et al. (1994). "Relation between lymphocyte beta-adrenergic responsivity and the severity of depressive disorders." *Biol Psychiatry* 35(12): 920-925.
- McGahan, L., A. M. Hakim, et al. (1998). "Hippocampal Myc and p53 expression following transient global ischemia." *Brain Res Mol Brain Res* 56(1-2): 133-145.
- McGuffin, P., K. Tandon, et al. (2003). "Linkage and association studies of schizophrenia." *Curr Psychiatry Rep* 5(2): 121-127.
- Mehta-Grigoriou, F., D. Gerald, et al. (2001). "The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity." *Oncogene* 20(19): 2378-2389.
- Menn, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2006). "Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain." *J Neurosci* 26(30): 7907-7918.
- Menninger, J. A. and B. Tabakoff (1997). "Forskolin-stimulated platelet adenylyl cyclase activity is lower in persons with major depression." *Biol Psychiatry* 42(1): 30-38.
- Meshi, D., M. R. Drew, et al. (2006). "Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment." *Nat Neurosci* 9(6): 729-731.
- Meyer, N. and L. Z. Penn (2008). "Reflecting on 25 years with MYC." *Nature reviews. Cancer* 8(12): 976-990.
- Miele, L. and B. Osborne (1999). "Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis." *Journal of cellular physiology* 181(3): 393-409.
- Miller, J. R., A. M. Hocking, et al. (1999). "Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca2+ pathways." *Oncogene* 18(55): 7860-7872.
- Miller, L. D., K. S. Park, et al. (2001). "Silencing of Wnt signaling and activation of multiple metabolic pathways in response to thyroid hormone-stimulated cell proliferation." *Mol Cell Biol* 21(19): 6626-6639.
- Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." *Annu Rev Neurosci* 28: 223-250.
- Minichiello, L., A. M. Calella, et al. (2002). "Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation." *Neuron* 36(1): 121-137.

- Mirescu, C., J. D. Peters, et al. (2004). "Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress." *Nat Neurosci* 7(8): 841-846.
- Molteni, R., F. Calabrese, et al. (2006). "Chronic treatment with fluoxetine up-regulates cellular BDNF mRNA expression in rat dopaminergic regions." *Int J Neuropsychopharmacol* 9(3): 307-317.
- Monsalve, E. M., M. S. Garcia-Gutierrez, et al. (2014). "Abnormal expression pattern of Notch receptors, ligands, and downstream effectors in the dorsolateral prefrontal cortex and amygdala of suicidal victims." *Molecular neurobiology* 49(2): 957-965.
- Monteggia, L. M., M. Barrot, et al. (2004). "Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29): 10827-10832.
- Monteleone, P., C. Serritella, et al. (2008). "Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders." *Bipolar Disord* 10(1): 95-100.
- Moon, R. T., B. Bowerman, et al. (2002). "The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin." *Science* 296(5573): 1644-1646.
- Moran, J. L., S. H. Johnston, et al. (1999). "Genomic structure, mapping, and expression analysis of the mammalian Lunatic, Manic, and Radical fringe genes." *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 10(6): 535-541.
- Moreno, S., S. Farioli-Vecchioli, et al. (2004). "Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS." *Neuroscience* 123(1): 131-145.
- Morgan, T. H. (1917). "Goodale's Experiments on Gonadectomy of Fowls." *Science* 45(1168): 483-484.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." *Science* 275(5307): 1787-1790.
- Morley-Fletcher, S., J. Mairesse, et al. (2011). "Chronic agomelatine treatment corrects behavioral, cellular, and biochemical abnormalities induced by prenatal stress in rats." *Psychopharmacology (Berl)* 217(3): 301-313.
- Mostany, R., E. M. Valdzan, et al. (2008). "A role for nuclear beta-catenin in SNRI antidepressant-induced hippocampal cell proliferation." *Neuropharmacology* 55(1): 18-26.
- Mulinari, S. (2012). "Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research." *J Hist Neurosci* 21(4): 366-392.
- Nakagawa, S., J. E. Kim, et al. (2002). "Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein." *J Neurosci* 22(9): 3673-3682.
- Nakai, M., Z. H. Qin, et al. (2000). "Kainic acid-induced apoptosis in rat striatum is associated with nuclear factor-kappaB activation." *J Neurochem* 74(2): 647-658.
- Namiecinska, M., K. Marciniak, et al. (2005). "[VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor]." *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 59: 573-583.
- Nelson, W. J. and R. Nusse (2004). "Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways." *Science* 303(5663): 1483-1487.
- Nestler, E. J., M. Barrot, et al. (2002). "Neurobiology of depression." *Neuron* 34(1): 13-25.
- Nestler, E. J., R. Z. Terwilliger, et al. (1989). "Chronic antidepressant administration alters the subcellular distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in rat frontal cortex." *J Neurochem* 53(5): 1644-1647.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (2002). "The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis." *Trends Cardiovasc Med* 12(1): 13-19.
- Newton, S. S., E. F. Collier, et al. (2003). "Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors." *J Neurosci* 23(34): 10841-10851.
- Nibuya, M., S. Morinobu, et al. (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." *J Neurosci* 15(11): 7539-7547.
- Nibuya, M., E. J. Nestler, et al. (1996). "Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus." *J Neurosci* 16(7): 2365-2372.
- Nickoloff, B. J., B. A. Osborne, et al. (2003). "Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents." *Oncogene* 22(42): 6598-6608.
- Nilsson, M., E. Perfilieva, et al. (1999). "Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory." *J Neurobiol* 39(4): 569-578.
- Norton, N., H. J. Williams, et al. (2007). "Association analysis of AKT1 and schizophrenia in a UK case control sample." *Schizophr Res* 93(1-3): 58-65.
- Notaridou, M., L. Quayle, et al. (2011). "Common alleles in candidate susceptibility genes associated with risk and development of epithelial ovarian cancer." *Int J Cancer* 128(9): 2063-2074.
- Nowacka, M. M. and E. Obuchowicz (2012). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: a new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action." *Neuropeptides* 46(1): 1-10.
- Nusse, R., A. Brown, et al. (1991). "A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family." *Cell* 64(2): 231.
- Nusse, R. and H. E. Varmus (1992). "Wnt genes." *Cell* 69(7): 1073-1087.
- Nyfeler, Y., R. D. Kirch, et al. (2005). "Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal." *The EMBO journal* 24(19): 3504-3515.

- O'Brien, W. T., A. D. Harper, et al. (2004). "Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium." *J Neurosci* 24(30): 6791-6798.
- Odagaki, Y., J. A. Garcia-Sevilla, et al. (2001). "Cyclic AMP-mediated signaling components are upregulated in the prefrontal cortex of depressed suicide victims." *Brain Res* 898(2): 224-231.
- Ogunshola, O. O., A. Antic, et al. (2002). "Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system." *J Biol Chem* 277(13): 11410-11415.
- Oh, D. H., Y. C. Park, et al. (2010). "Increased glycogen synthase kinase-3beta mRNA level in the hippocampus of patients with major depression: a study using the stanley neuropathology consortium integrative database." *Psychiatry Investig* 7(3): 202-207.
- Ohtsuki, T., T. Inada, et al. (2004). "Failure to confirm association between AKT1 haplotype and schizophrenia in a Japanese case-control population." *Mol Psychiatry* 9(11): 981-983.
- Okamoto, H., B. Voleti, et al. (2010). "Wnt2 expression and signaling is increased by different classes of antidepressant treatments." *Biol Psychiatry* 68(6): 521-527.
- Olefsky, J. M. and A. R. Saltiel (2000). "PPAR gamma and the treatment of insulin resistance." *Trends Endocrinol Metab* 11(9): 362-368.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, et al. (2006). "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(5): 359-371.
- Ongur, D., W. C. Drevets, et al. (1998). "Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13290-13295.
- Orford, K., C. Crockett, et al. (1997). "Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin." *J Biol Chem* 272(40): 24735-24738.
- Palacios, J. and C. Gamallo (1998). "Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas." *Cancer Res* 58(7): 1344-1347.
- Palmer, C. N., M. H. Hsu, et al. (1995). "Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling." *J Biol Chem* 270(27): 16114-16121.
- Palmer, T. D., A. R. Willhoite, et al. (2000). "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis." *J Comp Neurol* 425(4): 479-494.
- Pandey, G. N., P. Sudershan, et al. (1985). "Beta adrenergic receptor function in depression and the effect of antidepressant drugs." *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 56 Suppl 1: 66-79.
- Park, S., D. Kim, et al. (2005). "Molecular cloning and characterization of the human AKT1 promoter uncovers its up-regulation by the Src/Stat3 pathway." *J Biol Chem* 280(47): 38932-38941.
- Pascual-Brazo, J., E. Castro, et al. (2012). "Modulation of neuroplasticity pathways and antidepressant-like behavioural responses following the short-term (3 and 7 days) administration of the 5-HT(4) receptor agonist RS67333." *Int J Neuropsychopharmacol* 15(5): 631-643.
- Patapoutian, A. and L. F. Reichardt (2000). "Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance." *Curr Opin Neurobiol* 10(3): 392-399.
- Peifer, M., S. Orsulic, et al. (1993). "A model system for cell adhesion and signal transduction in *Drosophila*." *Dev Suppl*: 163-176.
- Peifer, M. and P. Polakis (2000). "Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus." *Science* 287(5458): 1606-1609.
- Peltier, J., A. O'Neill, et al. (2007). "PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation." *Dev Neurobiol* 67(10): 1348-1361.
- Pencea, V., K. D. Bingaman, et al. (2001). "Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain." *Exp Neurol* 172(1): 1-16.
- Penzes, P., M. E. Cahill, et al. (2011). "Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders." *Nat Neurosci* 14(3): 285-293.
- Pereira, P. A., M. A. Bicalho, et al. (2014). "Genetic variant of AKT1 and AKTIP associated with late-onset depression in a Brazilian population." *International journal of geriatric psychiatry* 29(4): 399-405.
- Perera, T. D., S. Park, et al. (2008). "Cognitive role of neurogenesis in depression and antidepressant treatment." *Neuroscientist* 14(4): 326-338.
- Perez-Canellas, M. M. and J. M. Garcia-Verdugo (1996). "Adult neurogenesis in the telencephalon of a lizard: a [3H]thymidine autoradiographic and bromodeoxyuridine immunocytochemical study." *Brain Res Dev Brain Res* 93(1-2): 49-61.
- Peterson, D. A. (2002). "Stem cells in brain plasticity and repair." *Curr Opin Pharmacol* 2(1): 34-42.
- Pilar-Cuellar, F., R. Vidal, et al. (2013). "Neural plasticity and proliferation in the generation of antidepressant effects: hippocampal implication." *Neural Plast* 2013: 537265.
- Pilar-Cuellar, F., R. Vidal, et al. (2012). "Subchronic treatment with fluoxetine and ketanserin increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor, beta-catenin and antidepressant-like effects." *Br J Pharmacol* 165(4b): 1046-1057.
- Pittenger, C. and R. S. Duman (2008). "Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms." *Neuropsychopharmacology* 33(1): 88-109.
- Pitzer, M. R., C. E. Sortwell, et al. (2003). "Angiogenic and neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor (VEGF165): studies of grafted and cultured embryonic ventral mesencephalic cells." *Exp Neurol* 182(2): 435-445.

- Plate, K. H., G. Breier, et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo." *Nature* 359(6398): 845-848.
- Pliakos, A. M., R. R. Carlson, et al. (2001). "Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens." *J Neurosci* 21(18): 7397-7403.
- Polakis, P. (2012). "Drugging Wnt signalling in cancer." *EMBO J* 31(12): 2737-2746.
- Polter, A., E. Beurel, et al. (2010). "Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances." *Neuropsychopharmacology* 35(8): 1761-1774.
- Popoli, M., Z. Yan, et al. (2012). "The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission." *Nat Rev Neurosci* 13(1): 22-37.
- Price, J. L. and W. C. Drevets (2010). "Neurocircuitry of mood disorders." *Neuropsychopharmacology* 35(1): 192-216.
- Proitsi, P., T. Li, et al. (2008). "Positional pathway screen of wnt signaling genes in schizophrenia: association with DKK4." *Biol Psychiatry* 63(1): 13-16.
- Purro, S. A., L. Ciani, et al. (2008). "Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli." *J Neurosci* 28(34): 8644-8654.
- Qi, H., M. D. Rand, et al. (1999). "Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian." *Science* 283(5398): 91-94.
- Qu, Q., G. Sun, et al. (2010). "Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal." *Nat Cell Biol* 12(1): 31-40; sup pp 31-39.
- Quinn, T. P., K. G. Peters, et al. (1993). "Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(16): 7533-7537.
- Radtke, F. and K. Raj (2003). "The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?" *Nature reviews. Cancer* 3(10): 756-767.
- Rajkowska, G., J. J. Miguel-Hidalgo, et al. (1999). "Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression." *Biol Psychiatry* 45(9): 1085-1098.
- Redmond, L., S. R. Oh, et al. (2000). "Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development." *Nature neuroscience* 3(1): 30-40.
- Reif, A., S. Fritzen, et al. (2006). "Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression." *Mol Psychiatry* 11(5): 514-522.
- Revest, J. M., D. Dupret, et al. (2009). "Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors." *Mol Psychiatry* 14(10): 959-967.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* 255(5052): 1707-1710.
- Rijsewijk, F., M. Schuermann, et al. (1987). "The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." *Cell* 50(4): 649-657.
- Ripke, S., N. R. Wray, et al. (2013). "A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder." *Mol Psychiatry* 18(4): 497-511.
- Roose, J., M. Molenaar, et al. (1998). "The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors." *Nature* 395(6702): 608-612.
- Rosel, P., B. Arranz, et al. (2004). "Altered 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>4</sub> postsynaptic receptors and their intracellular signalling systems IP<sub>3</sub> and cAMP in brains from depressed violent suicide victims." *Neuropsychobiology* 49(4): 189-195.
- Rubinfeld, B., I. Albert, et al. (1996). "Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly." *Science* 272(5264): 1023-1026.
- Rubinfeld, B., D. A. Tice, et al. (2001). "Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1epsilon." *J Biol Chem* 276(42): 39037-39045.
- Ruhe, H. G., N. S. Mason, et al. (2007). "Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies." *Mol Psychiatry* 12(4): 331-359.
- Ruiz de Almodovar, C., D. Lambrechts, et al. (2009). "Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system." *Physiol Rev* 89(2): 607-648.
- Russo-Neustadt, A. A. and M. J. Chen (2005). "Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity." *Curr Pharm Des* 11(12): 1495-1510.
- Saarelainen, T., P. Hendolin, et al. (2003). "Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects." *J Neurosci* 23(1): 349-357.
- Sadaghiani, M. S., M. Javadi-Paydar, et al. (2011). "Antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice: the role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway." *Behav Brain Res* 224(2): 336-343.
- Sadot, E., I. Simcha, et al. (1998). "Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15339-15344.
- Sahay, A. and R. Hen (2007). "Adult hippocampal neurogenesis in depression." *Nat Neurosci* 10(9): 1110-1115.

- Sakanaka, C., J. B. Weiss, et al. (1998). "Bridging of beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta by axin and inhibition of beta-catenin-mediated transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 3020-3023.
- Sala, C. F., E. Formenti, et al. (2000). "Identification, gene structure, and expression of human frizzled-3 (FZD3)." *Biochem Biophys Res Commun* 273(1): 27-34.
- Salahshor, S. and J. R. Woodgett (2005). "The links between axin and carcinogenesis." *J Clin Pathol* 58(3): 225-236.
- Saldanha, J., J. Singh, et al. (1998). "Identification of a Frizzled-like cysteine rich domain in the extracellular region of developmental receptor tyrosine kinases." *Protein Sci* 7(8): 1632-1635.
- Santarelli, L., M. Saxe, et al. (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." *Science* 301(5634): 805-809.
- Saxena, S., A. L. Brody, et al. (2001). "Cerebral metabolism in major depression and obsessive-compulsive disorder occurring separately and concurrently." *Biol Psychiatry* 50(3): 159-170.
- Scott, B. W., J. M. Wojtowicz, et al. (2000). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures." *Exp Neurol* 165(2): 231-236.
- Schanzer, A., F. P. Wachs, et al. (2004). "Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor." *Brain Pathol* 14(3): 237-248.
- Schildkraut, J. J. (1965). "The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence." *Am J Psychiatry* 122(5): 509-522.
- Schloesser, R. J., G. Chen, et al. (2007). "Neurogenesis and neuroenhancement in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder." *Int Rev Neurobiol* 77: 143-178.
- Schmidt, H. D. and R. S. Duman (2010). "Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models." *Neuropsychopharmacology* 35(12): 2378-2391.
- Scholtyssek, C., J. Katzenbeisser, et al. (2013). "PPARbeta/delta governs Wnt signaling and bone turnover." *Nat Med* 19(5): 608-613.
- Schwab, S. G., B. Hoefgen, et al. (2005). "Further evidence for association of variants in the AKT1 gene with schizophrenia in a sample of European sib-pair families." *Biol Psychiatry* 58(6): 446-450.
- Segi-Nishida, E., J. L. Warner-Schmidt, et al. (2008). "Electroconvulsive seizure and VEGF increase the proliferation of neural stem-like cells in rat hippocampus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(32): 11352-11357.
- Sen, S., R. Duman, et al. (2008). "Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications." *Biol Psychiatry* 64(6): 527-532.
- Sen, S., R. M. Nesse, et al. (2003). "A BDNF coding variant is associated with the NEO personality inventory domain neuroticism, a risk factor for depression." *Neuropsychopharmacology* 28(2): 397-401.
- Sestan, N., S. Artavanis-Tsakonas, et al. (1999). "Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling." *Science* 286(5440): 741-746.
- Shahsavarian, A., S. Javadi, et al. (2014). "Antidepressant-like effect of atorvastatin in the forced swimming test in mice: the role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway." *Eur J Pharmacol* 745: 52-58.
- Shalaby, F., J. Rossant, et al. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." *Nature* 376(6535): 62-66.
- Shaywitz, A. J. and M. E. Greenberg (1999). "CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals." *Annu Rev Biochem* 68: 821-861.
- Sheline, Y. I., M. H. Gado, et al. (2003). "Untreated depression and hippocampal volume loss." *Am J Psychiatry* 160(8): 1516-1518.
- Sheline, Y. I., P. W. Wang, et al. (1996). "Hippocampal atrophy in recurrent major depression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 3908-3913.
- Sherr, C. J. (1996). "Cancer cell cycles." *Science* 274(5293): 1672-1677.
- Sherrin, T., T. Blank, et al. (2011). "c-Jun N-terminal kinases in memory and synaptic plasticity." *Reviews in the neurosciences* 22(4): 403-410.
- Shirayama, Y., A. C. Chen, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression." *J Neurosci* 22(8): 3251-3261.
- Shitashige, M., S. Hirohashi, et al. (2008). "Wnt signaling inside the nucleus." *Cancer Sci* 99(4): 631-637.
- Shtutman, M., J. Zhurinsky, et al. (1999). "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(10): 5522-5527.
- Sirerol-Piquer, M., P. Gomez-Ramos, et al. (2011). "GSK3beta overexpression induces neuronal death and a depletion of the neurogenic niches in the dentate gyrus." *Hippocampus* 21(8): 910-922.
- Siuciak, J. A., C. Boylan, et al. (1996). "BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration." *Brain Res* 710(1-2): 11-20.
- Siuciak, J. A., D. R. Lewis, et al. (1997). "Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)." *Pharmacol Biochem Behav* 56(1): 131-137.
- Soker, S., S. Takashima, et al. (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." *Cell* 92(6): 735-745.
- Son, H., M. Banasr, et al. (2012). "Neuritin produces antidepressant actions and blocks the neuronal and behavioral deficits caused by chronic stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(28): 11378-11383.

- Spana, E. P. and C. Q. Doe (1996). "Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates." *Neuron* 17(1): 21-26.
- Storkebaum, E., D. Lambrechts, et al. (2004). "VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection." *Bioessays* 26(9): 943-954.
- Storkebaum, E., D. Lambrechts, et al. (2005). "Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS." *Nat Neurosci* 8(1): 85-92.
- Stump, G., A. Durrer, et al. (2002). "Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain." *Mechanisms of development* 114(1-2): 153-159.
- Sui, L., J. Wang, et al. (2008). "Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex." *Learn Mem* 15(10): 762-776.
- Sun, Y., M. Aiga, et al. (2009). "Scribble interacts with beta-catenin to localize synaptic vesicles to synapses." *Mol Biol Cell* 20(14): 3390-3400.
- Surget, A., M. Saxe, et al. (2008). "Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal." *Biol Psychiatry* 64(4): 293-301.
- Tachibana, K., Y. Kobayashi, et al. (2005). "Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing different PPAR isoforms." *Nucl Recept* 3: 3.
- Taliaz, D., A. Loya, et al. (2011). "Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor." *J Neurosci* 31(12): 4475-4483.
- Tamburella, A., V. Micale, et al. (2009). "Antidepressant properties of the 5-HT4 receptor partial agonist, SL65.0155: behavioral and neurochemical studies in rats." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(7): 1205-1210.
- Tamura, K., Y. Taniguchi, et al. (1995). "Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H)." *Current biology* : CB 5(12): 1416-1423.
- Tan, H. Y., K. K. Nicodemus, et al. (2008). "Genetic variation in AKT1 is linked to dopamine-associated prefrontal cortical structure and function in humans." *J Clin Invest* 118(6): 2200-2208.
- Tanapat, P., N. B. Hastings, et al. (2005). "Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner." *J Comp Neurol* 481(3): 252-265.
- Tanapat, P., N. B. Hastings, et al. (2001). "Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism." *J Comp Neurol* 437(4): 496-504.
- Taniguchi, K., L. R. Roberts, et al. (2002). "Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas." *Oncogene* 21(31): 4863-4871.
- Tardito, D., J. Perez, et al. (2006). "Signaling pathways regulating gene expression, neuroplasticity, and neurotrophic mechanisms in the action of antidepressants: a critical overview." *Pharmacol Rev* 58(1): 115-134.
- Tashiro, A., H. Makino, et al. (2007). "Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage." *J Neurosci* 27(12): 3252-3259.
- Thiriet, N., S. Jayanthi, et al. (2001). "Methamphetamine increases expression of the apoptotic c-myc and L-myc genes in the mouse brain." *Brain Res Mol Brain Res* 90(2): 202-204.
- Thiselton, D. L., V. I. Vladimirov, et al. (2008). "AKT1 is associated with schizophrenia across multiple symptom dimensions in the Irish study of high density schizophrenia families." *Biol Psychiatry* 63(5): 449-457.
- Thoenen, H. (1995). "Neurotrophins and neuronal plasticity." *Science* 270(5236): 593-598.
- Thome, J., N. Sakai, et al. (2000). "cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment." *J Neurosci* 20(11): 4030-4036.
- Tochigi, M., K. Iwamoto, et al. (2008). "Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains." *Neurosci Res* 60(2): 184-191.
- Todorova, V. K., A. D. Elbein, et al. (2003). "Increased expression of c-Jun transcription factor in cerebellar vermis of patients with schizophrenia." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28(8): 1506-1514.
- Tokunaga, A., J. Kohyama, et al. (2004). "Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain." *Journal of neurochemistry* 90(1): 142-154.
- Tordera, R. M., A. L. Garcia-Garcia, et al. (2011). "Chronic stress and impaired glutamate function elicit a depressive-like phenotype and common changes in gene expression in the mouse frontal cortex." *Eur Neuropsychopharmacol* 21(1): 23-32.
- Tsai, S. J., Y. T. Gau, et al. (2008). "Association study of brain-derived neurotrophic factor and apolipoprotein E polymorphisms and cognitive function in aged males without dementia." *Neurosci Lett* 433(2): 158-162.
- Ueda, S., S. Sakakibara, et al. (2005). "Effect of long-lasting serotonin depletion on environmental enrichment-induced neurogenesis in adult rat hippocampus and spatial learning." *Neuroscience* 135(2): 395-402.
- Umbhauer, M., A. Djiane, et al. (2000). "The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling." *EMBO J* 19(18): 4944-4954.
- Vaidya, V. A., G. J. Marek, et al. (1997). "5-HT2A receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex." *J Neurosci* 17(8): 2785-2795.

- Vaidya, V. A., R. M. Terwilliger, et al. (1999). "Role of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the stress-induced down-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus." *Neurosci Lett* 262(1): 1-4.
- Valdizan, E. M., R. Diez-Alarcia, et al. (2010). "alpha(2)-Adrenoceptor functionality in postmortem frontal cortex of depressed suicide victims." *Biol Psychiatry* 68(9): 869-872.
- Valdizan, E. M., O. Gutierrez, et al. (2003). "Adenylate cyclase activity in postmortem brain of suicide subjects: reduced response to beta-adrenergic stimulation." *Biol Psychiatry* 54(12): 1457-1464.
- Valverde, O., T. Mantamadiotis, et al. (2004). "Modulation of anxiety-like behavior and morphine dependence in CREB-deficient mice." *Neuropsychopharmacology* 29(6): 1122-1133.
- van Gijn, M. E., M. J. Daemen, et al. (2002). "The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease." *Cardiovasc Res* 55(1): 16-24.
- van Praag, H., B. R. Christie, et al. (1999). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13427-13431.
- Verhagen, M., A. van der Meij, et al. (2010). "Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity." *Mol Psychiatry* 15(3): 260-271.
- Vidal-Puig, A., M. Jimenez-Linan, et al. (1996). "Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents." *J Clin Invest* 97(11): 2553-2561.
- Vidal, R., E. M. Valdizan, et al. (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(3): 1120-1127.
- Vidal, R., E. M. Valdizan, et al. (2010). "Reduced signal transduction by 5-HT<sub>4</sub> receptors after long-term venlafaxine treatment in rats." *Br J Pharmacol* 161(3): 695-706.
- Videbech, P., B. Ravnikilde, et al. (2001). "The Danish PET/depression project: PET findings in patients with major depression." *Psychol Med* 31(7): 1147-1158.
- Viiikki, M., S. Anttila, et al. (2010). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphism is associated with treatment resistant depression." *Neurosci Lett* 477(3): 105-108.
- Viola, H., M. Furman, et al. (2000). "Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty." *J Neurosci* 20(23): RC112.
- Vivar, C. and H. van Praag (2013). "Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus." *Front Neural Circuits* 7: 15.
- Vollmayr, B., C. Simonis, et al. (2003). "Reduced cell proliferation in the dentate gyrus is not correlated with the development of learned helplessness." *Biol Psychiatry* 54(10): 1035-1040.
- Vythilingam, M., E. Vermetten, et al. (2004). "Hippocampal volume, memory, and cortisol status in major depressive disorder: effects of treatment." *Biol Psychiatry* 56(2): 101-112.
- Wada, A., H. Yokoo, et al. (2005). "Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases." *J Pharmacol Sci* 99(4): 307-321.
- Wada, K., A. Nakajima, et al. (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation." *J Biol Chem* 281(18): 12673-12681.
- Wallace, T. L., K. E. Stellitano, et al. (2004). "Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety." *Biol Psychiatry* 56(3): 151-160.
- Wang, J. W., D. J. David, et al. (2008). "Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells." *J Neurosci* 28(6): 1374-1384.
- Wang, W. and G. Struhl (2004). "Drosophila Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch." *Development* 131(21): 5367-5380.
- Wang, X., E. L. Goode, et al. (2008). "Association of genetic variation in genes implicated in the beta-catenin destruction complex with risk of breast cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(8): 2101-2108.
- Wang, Y., N. Thekdi, et al. (2002). "Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS." *J Neurosci* 22(19): 8563-8573.
- Warner-Schmidt, J. L. and R. S. Duman (2006). "Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment." *Hippocampus* 16(3): 239-249.
- Warner-Schmidt, J. L. and R. S. Duman (2007). "VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11): 4647-4652.
- Warner-Schmidt, J. L. and R. S. Duman (2008). "VEGF as a potential target for therapeutic intervention in depression." *Curr Opin Pharmacol* 8(1): 14-19.
- Warton, S. S. and D. G. Jones (1985). "Postnatal development of the superficial layers in the rat superior colliculus: a study with Golgi-Cox and Kluver-Barrera techniques." *Experimental brain research* 58(3): 490-502.
- Watts, V. J. and K. A. Neve (2005). "Sensitization of adenylate cyclase by G<sub>alpha</sub> i/o-coupled receptors." *Pharmacol Ther* 106(3): 405-421.
- Weinmaster, G., V. J. Roberts, et al. (1991). "A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development." *Development* 113(1): 199-205.
- Wesolowska, A. (2008). "The anxiolytic-like effect of the selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB-399885: the impact of benzodiazepine receptors." *Eur J Pharmacol* 580(3): 355-360.

- Wesolowska, A. (2010). "Potential role of the 5-HT<sub>6</sub> receptor in depression and anxiety: an overview of preclinical data." *Pharmacol Rep* 62(4): 564-577.
- Wesolowska, A. and A. Nikiforuk (2007). "Effects of the brain-penetrant and selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB-399885 in animal models of anxiety and depression." *Neuropharmacology* 52(5): 1274-1283.
- Wexler, E. M., D. H. Geschwind, et al. (2008). "Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation." *Mol Psychiatry* 13(3): 285-292.
- Wexler, E. M., A. Paucer, et al. (2009). "Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency." *Stem Cells* 27(5): 1130-1141.
- Wick, A., W. Wick, et al. (2002). "Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt." *J Neurosci* 22(15): 6401-6407.
- Willson, T. M., P. J. Brown, et al. (2000). "The PPARs: from orphan receptors to drug discovery." *J Med Chem* 43(4): 527-550.
- Wise, M. G. and S. E. Taylor (1990). "Anxiety and mood disorders in medically ill patients." *J Clin Psychiatry* 51 Suppl: 27-32.
- Wong, H. C., A. Bourdelas, et al. (2003). "Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled." *Mol Cell* 12(5): 1251-1260.
- Woo, N. H., H. K. Teng, et al. (2005). "Activation of p75<sup>NTR</sup> by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression." *Nat Neurosci* 8(8): 1069-1077.
- Wu, J., T. J. Klein, et al. (2004). "Subcellular localization of frizzled receptors, mediated by their cytoplasmic tails, regulates signaling pathway specificity." *PLoS Biol* 2(7): E158.
- Wu, J. Y. and Y. Rao (1999). "Fringe: defining borders by regulating the notch pathway." *Current opinion in neurobiology* 9(5): 537-543.
- Wu, R., Y. Zhai, et al. (2001). "Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas." *Cancer Res* 61(22): 8247-8255.
- Xia, Z., J. W. DePierre, et al. (1996). "Dysregulation of bcl-2, c-myc, and Fas expression during tricyclic antidepressant-induced apoptosis in human peripheral lymphocytes." *Journal of biochemical toxicology* 11(4): 203-204.
- Xie, K., D. Wei, et al. (2004). "Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor." *Cytokine Growth Factor Rev* 15(5): 297-324.
- Xing, Y., W. K. Clements, et al. (2003). "Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex." *Genes Dev* 17(22): 2753-2764.
- Xu, Y., P. A. Barish, et al. (2012). "Animal models of depression and neuroplasticity: assessing drug action in relation to behavior and neurogenesis." *Methods Mol Biol* 829: 103-124.
- Yamada, S., M. Yamamoto, et al. (2003). "Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder." *J Neural Transm* 110(6): 671-680.
- Yamaguchi, M., T. Suzuki, et al. (2004). "Repetitive cocaine administration decreases neurogenesis in adult rat hippocampus." *Ann N Y Acad Sci* 1025: 351-362.
- Yau, S. Y., B. W. Lau, et al. (2011). "Hippocampal neurogenesis and dendritic plasticity support running-improved spatial learning and depression-like behaviour in stressed rats." *PLoS One* 6(9): e24263.
- Ye, Y., G. Wang, et al. (2011). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression." *Neurosci Lett* 503(1): 15-19.
- Yokoyama, N. and C. C. Malbon (2007). "Phosphoprotein phosphatase-2A docks to Dishevelled and counterregulates Wnt3a/beta-catenin signaling." *J Mol Signal* 2: 12.
- Yost, C., M. Torres, et al. (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(12): 1443-1454.
- You, H., W. Lu, et al. (2013). "The relationship between statins and depression: a review of the literature." *Expert Opin Pharmacother* 14(11): 1467-1476.
- Yu, H., D. D. Wang, et al. (2012). "Variant brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism alters vulnerability to stress and response to antidepressants." *J Neurosci* 32(12): 4092-4101.
- Yu, J. J., Y. Zhang, et al. (2013). "Inhibition of calcineurin in the prefrontal cortex induced depressive-like behavior through mTOR signaling pathway." *Psychopharmacology (Berl)* 225(2): 361-372.
- Yu, X. and R. C. Malenka (2003). "Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis." *Nat Neurosci* 6(11): 1169-1177.
- Zachary, I. (2003). "VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1171-1177.
- Zaghetto, A. A., S. Paina, et al. (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(36): 9757-9768.
- Zandi, P. P., P. L. Belmonte, et al. (2008). "Association study of Wnt signaling pathway genes in bipolar disorder." *Arch Gen Psychiatry* 65(7): 785-793.
- Zeller, K. I., A. G. Jegga, et al. (2003). "An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets." *Genome biology* 4(10): R69.

- Zeng, X., K. Tamai, et al. (2005). "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation." *Nature* 438(7069): 873-877.
- Zeng, Z. Y., Y. H. Zhou, et al. (2007). "Gene expression profiling of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway." *Hum Pathol* 38(1): 120-133.
- Zhang, H. T. (2009). "Cyclic AMP-specific phosphodiesterase-4 as a target for the development of antidepressant drugs." *Curr Pharm Des* 15(14): 1688-1698.
- Zhang, L. H., M. Li, et al. (2011). "[Association of the schizophrenia susceptible gene DKK4 with brain volume in Chinese populations]." *Dongwuxue Yanjiu* 32(1): 62-65.
- Zhang, Z. G., L. Zhang, et al. (2000). "VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain." *J Clin Invest* 106(7): 829-838.
- Zhou, C. J., C. Zhao, et al. (2004). "Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities." *J Neurosci* 24(1): 121-126.
- Zubenko, G. S., B. Maher, et al. (2003). "Genome-wide linkage survey for genetic loci that influence the development of depressive disorders in families with recurrent, early-onset, major depression." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 123B(1): 1-18.
- Zubenko, G. S., B. S. Maher, et al. (2004). "Genome-wide linkage survey for genetic loci that affect the risk of suicide attempts in families with recurrent, early-onset, major depression." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129B(1): 47-54.
- Zupanc, G. K. and I. Horschke (1995). "Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study." *J Comp Neurol* 353(2): 213-233.